Nanoparticules d'oxyde de fer pour l'amélioration du traitement du glioblastome : étude de leur efficacité sous irradiation synchrotron et optimisation de leur mode d'administration

Solveig Reymond

▶ **To cite this version:**

Solveig Reymond. Nanoparticules d'oxyde de fer pour l'amélioration du traitement du glioblastome : étude de leur efficacité sous irradiation synchrotron et optimisation de leur mode d'administration. Biotechnologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAS047 . tel-02628555

HAL Id: tel-02628555

https://theses.hal.science/tel-02628555

Submitted on 26 May 2020

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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Solveig Reymond

Thèse dirigée par **Hélène ELLEAUME (EDISCE)**, INSERM, et codirigée par **Jean-Luc RAVANAT (CSV)**, CEA

préparée au sein du **Laboratoire Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale**
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement**

Nanoparticules d'oxyde de fer pour l'amélioration du traitement du glioblastome : étude de leur efficacité sous irradiation synchrotron et optimisation de leur mode d'administration.

Thèse soutenue publiquement le **20 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Madame Hélène ELLEAUME (EDISCE)
Directeur de Recherche, Rayonnement Synchrotron et Recherche médicale, Directeur de thèse
Monsieur Dominique ARDAIL
Maître de conférences des universités - praticien hospitalier, Equipe PRISME- IPNL Lyon, Rapporteur
Madame Brigitte RENIERS
Associate Professor, Research group NuTeC, research institute CMK, Rapporteur
Monsieur Vincent SOL
Professeur, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN), Examinateur
Monsieur Jacques BALOSSO
Professeur, Crlcc François Baclesse - Caen, Président du Jury
Monsieur Jean-Luc RAVANAT
Ingénieur de Recherche, INAC/SyMMES/CIBEST, Co-directeur de thèse
Monsieur Raphaël SERDUC
Chargé de Recherche, Rayonnement Synchrotron et Recherche médicale, Co-encadrant de thèse (invité)

Table des matières

Remerciements **1**

Liste des abréviations et acronymes **8**

I État de l'art **15**

1 Le glioblastome : thérapies actuelles et limites des traitements **17**
1.1 Le cerveau, origine et environnement des gliomes 18
1.1.1 Organisation du système nerveux 18
1.1.2 Composition et fonctions de la glie 19
1.1.3 Origine des cellules gliales 19
1.2 Le glioblastome, tumeur cérébrale maligne 20
1.2.1 Métabolisme et homéostasie 20
1.2.2 Les tumeurs cérébrales, rares mais agressives 21
1.2.3 Classification des tumeurs cérébrales 21
1.2.4 Le cas du glioblastome multiforme 22
1.3 Solutions thérapeutiques 25
1.3.1 Le traitement conventionnel du GBM 25
1.3.2 Limites des options thérapeutiques actuelles 25
1.3.3 Pistes thérapeutiques actuelles : diverses stratégies de ciblage 29
1.3.4 Pistes d'optimisation de la radiothérapie 35
1.4 Le Chapitre 1 en quelques mots 44

2 Potentiel de l'utilisation des NPs pour améliorer la radiothérapie **47**
2.1 Interactions entre les photons et la matière 48
2.1.1 Interaction photons/matière : du photon à l'électron 48
2.1.2 Généralités et définitions 51
2.1.3 Interactions entre les électrons émis et la matière 52
2.1.4 Dommages biologiques 53

2.1.5 Mort cellulaire . . . 56
2.1.6 En résumé : du photon à la mort cellulaire . . . 58
2.2 Des éléments à haut Z pour augmenter le dépôt de dose dans la tumeur . . . 58
2.2.1 La motivation : création d'un différentiel entre la tumeur et le tissu sain . . . 58
2.2.2 Origine et évolution de la SSRT appliquée à l'augmentation de dose par éléments lourds . . . 61
2.2.3 Etat de l'art : les NPs pour augmenter la dose à la tumeur . . . 66
2.2.4 Utilisation de NPs de fer en radiothérapie . . . 68
2.2.5 Résumé : effets physiques, chimiques et biologiques de l'irradiation d'une tumeur ayant accumulé des NPs de fer . . . 69
2.3 Le Chapitre 2 en quelques mots . . . 70

3 Traverser la BHE **73**
3.1 Comment franchir la Barrière Hémato-Encéphalique ? . . . 74
3.1.1 Barrière Hémato-Encéphalique et Barrière Hémato-Tumorale . . . 74
3.1.2 Traitement local, traitement systémique et effet EPR . . . 75
3.1.3 Quelques méthodes employées . . . 77
3.2 Un Cheval de Troie pour améliorer le traitement des tumeurs . . . 82
3.2.1 Macrophages associés aux Tumeurs : de Dr Jekyll à Mr Hyde . . . 82
3.2.2 Les macrophages comme Chevaux de Troie pour traverser la Barrière Hémato-Tumorale . . . 85
3.3 Utilisation des ultrasons pour ouvrir localement la BHE . . . 91
3.4 Le Chapitre 3 en quelques mots . . . 92

Problématique **94**

II Résultats et discussion : partie photoactivation **99**

4 Résultats *in silico* : simulations Monte-Carlo **101**
4.1 La simulation Monte-Carlo appliquée aux interactions photons-matière . . . 102
4.1.1 Le code PENELOPE, fondé sur la méthode Monte-Carlo . . . 102
4.1.2 Application à l'augmentation de dose par atomes lourds . . . 103
4.1.3 Stratégies utilisées dans ces travaux . . . 104
4.2 Résultats : dose dans un cube homogène de 1 cm de côté . . . 107
4.2.1 Influence de l'élément . . . 108
4.2.2 Influence de l'énergie . . . 108
4.2.3 Influence de la concentration . . . 109
4.2.4 Utilisation de ces résultats . . . 109

4.3 Résultats : spectre des particules émises par la NP cylindrique . . . 109
4.3.1 Spectre d'"émission" à 30 keV . . . 109
4.3.2 Evolution du spectre d'"émission" selon l'énergie d'irradiation . . . 111
4.4 Rayons d'action des électrons secondaires : l'outil *Tracks* . . . 114
4.4.1 Cartes 2D des trajectoires des électrons . . . 114
4.4.2 Parcours théoriques des électrons : combinaison avec données PSF . . . 116
4.4.3 Portée des interactions . . . 117
4.5 Discussions autour des simulations . . . 120
4.6 Le Chapitre 4 en quelques mots . . . 121

5 Caractérisation des NPs Fe_3O_4 coréennes 123
5.1 Matériels et méthodes . . . 124
5.1.1 Matériels . . . 124
5.1.2 Méthodes . . . 125
5.2 Résultats : taille des nanoparticules . . . 125
5.2.1 Discussion : taille des NPs, sonication et reproductibilité . . . 129
5.3 Concentration de la solution mère de NPs Fe . . . 132
5.3.1 Mesure de la concentration par ICP-MS . . . 132
5.3.2 Discussion : concentration de la solution mère de NPs Fe . . . 133
5.4 Discussion : autres caractéristiques des NPs Fe coréennes . . . 133
5.5 Adaptation des protocoles : "correspondance volume/surface" . . . 134
5.6 Le chapitre 5 en quelques mots . . . 135

6 Interactions entre NPs Fe et cellules tumorales : résultats *in vitro* 137
6.1 Matériels et méthodes . . . 138
6.1.1 NPs Fe, agents de contraste et cellules . . . 138
6.1.2 Méthodes expérimentales . . . 138
6.2 Résultats : interactions entre NPs Fe et cellules . . . 139
6.2.1 Les cellules tumorales internalisent les NPs Fe . . . 140
6.2.2 Distribution des NPs Fe dans les cellules tumorales . . . 141
6.2.3 Conséquences de l'internalisation des NPs sur les cellules . . . 143
6.3 Discussions sur l'interaction entre les NPs et les cellules tumorales . . . 145
6.3.1 Internalisation du fer dans les cellules tumorales . . . 145
6.3.2 Distribution du fer dans les cellules tumorales . . . 148
6.3.3 Radiosensibilisation des NPs Fe ? . . . 149
6.3.4 Externalisation des nanoparticules ? . . . 153
6.3.5 Etude comparative : influence des agents de contraste au Gd sur les cellules de gliome de rat . . . 154

6.4 Le Chapitre 6 en quelques mots . . . 159

7 Augmentation de dose liée aux NPs Fe : résultats *in vitro* 161

7.1 Matériels et méthodes . . . 162
7.1.1 Irradiation des cellules . . . 162
7.1.2 Mesure de la survie cellulaire . . . 163
7.2 Résultats : potentiel des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose lors d'une irradiation 169
7.2.1 Expérience 1 : test clonogénique et suivi MTT . . . 169
7.2.2 Expérience 2 : test clonogénique et suivi MTT . . . 172
7.3 Discussion . . . 173
7.3.1 Dépendance du SER mesuré à l'énergie d'irradiation . . . 173
7.3.2 Dépendance du SER mesuré à la concentration en NPs Fe dans le milieu de culture . . . 175
7.3.3 Conséquences de l'internalisation des NPs Fe par les cellules : quel impact sur la survie cellulaire après irradiation ? . . . 176
7.3.4 Influence du protocole d'irradiation : irradiation en plaques . . . 179
7.3.5 Comparaison avec les simulations : du DEF au SER . . . 181
7.3.6 Irradiation de cellules exposées aux agents de contraste au Gd : augmentation de dose ou radiosensibilisation ? . . . 184
7.4 Importance de l'outil de mesure de la survie cellulaire . . . 187
7.4.1 Test ATP-lite et suivi IncuCyte . . . 187
7.4.2 Comparaison test clonogénique et MTT . . . 187
7.4.3 Quels outils pour les NPs ? . . . 192
7.5 Le Chapitre 7 en quelques mots . . . 192

8 Etude préclinique : augmentation de dose par injection de NPs Fe chez le rat porteur de gliome F98 195

8.1 Matériels et Méthodes . . . 195
8.2 Résultats et discussion . . . 196

III Résultats et discussion : transport et délivrance des NPs 199

9 Approche Cheval de Troie : résultats *in vitro* 201

9.1 Matériels et méthodes . . . 203
9.2 Résultats : exposition des Mo/Ma au FerInject . . . 203
9.2.1 Internalisation des NPs Fe par les macrophages de lignées . . . 203
9.2.2 Quantification de la masse de fer internalisée par les monocytes/macrophages 205
9.2.3 Impact de l'internalisation du FerInject sur la viabilité des cellules . . . 206
9.3 Discussion . . . 206

9.3.1 Internalisation des NPs Fe par les macrophages de lignées . . . 206
9.3.2 Impact de l'internalisation du FerInject sur les monocytes-macrophages . . . 208
9.4 Le Chapitre 9 en quelques mots . . . 209

10 Approche Cheval de Troie : résultats *in vivo* 211
10.1 Matériels et méthodes . . . 212
10.1.1 Irradiation des animaux . . . 213
10.1.2 Stratégies pour suivi *in vivo* des macrophages . . . 213
10.1.3 Injection des Mo/Ma . . . 214
10.1.4 Analyse des coupes de cerveau . . . 214
10.2 Utilisation de lignées commerciales comme Chevaux de Troie . . . 214
10.2.1 Résultats : expérimentation de la migration des lignées de Mo/Ma commerciales dans la tumeur 9L chez le rat Fischer . . . 215
10.2.2 Discussion : raisons possibles de l'échec de la migration de Mo/Ma . . . 215
10.2.3 Conclusion : les Mo/Ma de lignée ne migrent pas dans notre modèle non immuno-déprimé . . . 216
10.3 Utilisation de Mo/Ma primaires comme Chevaux de Troie . . . 217
10.3.1 Résultats : injection systémique de Mo/Ma primaires . . . 217
10.3.2 Résultats : injection intratumorale de Mo/Ma primaires chez le rat Fischer porteur de tumeur 9L . . . 218
10.4 Discussion finale et conclusion . . . 220
10.4.1 Localisation des Mo/Ma primaires injectés par voie intraveineuse : où ont-ils migré ? . . . 220
10.4.2 Optimisation et choix du marqueur . . . 221
10.4.3 Nombre de Mo/Ma nécessités pour transporter une quantité suffisante de composés dans les tumeurs . . . 224
10.4.4 Influence de présence de la BHE dans la migration des Mo/Ma primaires vers les tumeurs . . . 225
10.4.5 Origine des Mo/Ma endogènes recrutés sur les sites d'inflammation . . . 226
10.4.6 Conclusion générale . . . 227
10.5 Le Chapitre 10 en quelques mots . . . 228

11 Approche Ultra-sons : ouverture 229
11.1 Matériels et méthodes . . . 230
11.1.1 Protocole d'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés . . . 230
11.1.2 Imagerie IRM et détection indirecte de la présence de NPs Fe . . . 231
11.2 La motivation : une étude pilote sur deux rats sains . . . 233
11.2.1 Résultats : ouverture de la BHE suivie d'une injection de NPs Fe . . . 233
11.2.2 Discussion suite à cette expérience pilote . . . 233

11.3 Résultats : ouverture locale de la BHE chez le rat sain ou porteur de tumeur F98 pour améliorer la répartition des NPs Fe . . . 235
11.3.1 Ouverture de la BHE chez le rat sain . . . 236
11.3.2 Injection des NPs Fe par voie intraveineuse après ouverture de la BHE chez le rat sain . . . 236
11.3.3 Injection intraveineuse de NPs Fe après ouverture de la BHE chez le rat porteur de gliome F98 . . . 238
11.4 Discussion générale : ouverture de la BHE par ultrasons focalisés . . . 240
11.4.1 Reproductibilité du tir et ciblage de la tumeur . . . 240
11.4.2 Accumulation des NPs Fe dans la zone perméabilisée ? . . . 240
11.4.3 Ajout d'étapes au protocole expérimental pour résoudre le problème des "cas litigieux" . . . 241
11.4.4 Influence de la sonication . . . 241
11.4.5 Optimisation des paramètres du protocole . . . 242
11.4.6 Possibilité de transfert de cette méthode à l'accumulation d'un agent de contraste au Gd . . . 242
11.5 Conclusion et perspectives . . . 244
11.6 Le Chapitre 11 en quelques mots . . . 245

IV Bilan général, conclusion et perspectives **247**

A Matériel expérimental **265**
A.1 Nanoparticules . . . 266
A.1.1 Le FerInject® . . . 266
A.1.2 Les NPs Fe de l'équipe coréenne . . . 267
A.2 Culture cellulaire . . . 268
A.2.1 Cellules tumorales de rat . . . 268
A.2.2 Monocytes et macrophages . . . 269
A.3 Agents de contraste . . . 272
A.4 Modèles tumoraux . . . 274
A.4.1 Rôle des modèles animaux pour l'étude des tumeurs . . . 274
A.4.2 Le modèle tumoral F98 . . . 275
A.4.3 Le modèle tumoral 9L . . . 275
A.4.4 Le modèle tumoral C6 . . . 276
A.5 Sources de rayons X disponibles . . . 277
A.5.1 Tube à rayons X conventionnel . . . 277
A.5.2 L'ESRF, source de rayonnement synchrotron . . . 278

B Méthodes **285**

B.1 Nanoparticules . . . 286
B.1.1 Mesure de la taille des NPs par TEM . . . 286
B.1.2 Mesure de la taille par *Dynamic Light Scattering* . . . 287
B.1.3 Mesure de la concentration par tomographie X synchrotron . . . 291
B.1.4 Sonication . . . 291
B.2 Culture cellulaire . . . 292
B.2.1 Repiquage des cellules . . . 292
B.2.2 Congélation des cellules . . . 292
B.2.3 Décongélation des cellules . . . 293
B.3 Etude de la survie cellulaire . . . 293
B.3.1 Irradiation au générateur de rayons X . . . 293
B.3.2 Test ATP-lite . . . 293
B.3.3 Test MTT . . . 294
B.3.4 Impact de l'exposition des NPs Fe sur les cellules . . . 294
B.3.5 *Live cell imaging* . . . 294
B.3.6 Etude du cycle cellulaire . . . 295
B.4 Mesures de la masse de fer internalisée par ICP-MS . . . 296
B.5 Echantillons pour imagerie . . . 298
B.5.1 Imagerie SR-XRF sur la ligne ID-16 . . . 298
B.5.2 Localisation des NPs par TEM dans les cellules . . . 301
B.5.3 Coloration au Bleu de Prusse . . . 301
B.6 Expérimentation animale . . . 302
B.6.1 Modèle orthotopique de gliome . . . 302
B.6.2 Culture des macrophages primaires . . . 302
B.6.3 Coloration des macrophages primaires . . . 303
B.6.4 Ouverture de la BHE par ultrasons . . . 305

Résumé de la thèse **306**

Abstract **309**

Remerciements

Pour commencer, je remercie sincèrement Dominique Ardail, Brigitte Reniers, Vincent Sol et Jacques Balosso d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour votre regard nouveau que vous avez pu apporter au sujet, ouvrant encore d'autres perspectives.

Merci, Hélène, pour ton soutien et ta ténacité,

Et pour ton optimisme que tu aurais souhaité encore plus me communiquer !

Durant ces trois ans, j'ai beaucoup appris ; je crois avoir grandi.

J'espère que ces travaux t'auront aussi permis de rajouter quelques pages à ton encyclopédie !

Aujourd'hui, la thèse est soutenue, à vous d'en inventer la suite,

Je te souhaite un futur clément et plein de réussites !

Jean-Luc, merci pour ton aide et ta bienveillance,

Toujours prêt à m'éclairer de tes connaissances,

Car la réparation de l'ADN était pour moi un concept vaste et intrigant,

Et aujourd'hui, c'est devenu un concept plus vaste encore et passionnant.

De n'avoir pas plus travaillé à tes côtés, je le regrette,

Mais regardons vers l'avenir : heureux et épanouissant je te le souhaite !

La biologie demande une logique bien mystérieuse,

Pour ceux qui n'ont que la physique comme formation.

Merci Raph pour ta patience et ton aide précieuse,

Jalonnant le cours de mes pérégrinations.

Je te souhaite bonne chance pour ton HDR,

Et pour la suite de tes recherches, avec (on ne sait jamais !) ou sans fer.

Un grand merci, ensuite, à toute l'équipe RSRM, qui, implantée à l'ESRF,

A vu cette thèse doucement se dérouler, avec ses sursauts et ses reliefs !

François, c'est grâce à toi que cette longue aventure à commencé,

"Cher Monsieur Estève"... à Hélène, mon mail tu as transféré.

Merci pour ces discussions, qui m'ont toujours fait réfléchir par la suite,

Et merci à Sam, qui aujourd'hui rassemble tous ces chercheurs cosmopolites.

Merci à Mélanie de m'avoir donné les armes pour apprendre à avancer,

Tenant bon malgré mes faux pas et nos moult expériences mouvementées.

Malgré tes conseils, j'avoue n'être toujours pas un modèle d'organisation,

Et que, parfois, l'archéologie s'impose pour

retrouver d'une manip les conditions !

Merci à Paul, qui a initié une naïve physicienne à l'utilisation de la trypsine,

Ainsi que -ô désespoir- aux nanoparticules qui s'agglutinent !

Merci à Caroline de m'avoir appris les tréfonds des secrets du test MTT,

Et d'avoir ingénieusement pensé à y associer les cookies en cas de manip ratée.

Merci, Jeff, pour avoir assuré la dosi, le dénouage de noeuds dans le cerveau et l'itinéraire sur la Pinéa,

Ainsi qu'à Jayde, discrète alliée ayant ce puissant pouvoir de gérer les aléas.

Audrey, je te remercie pour tes conseils, ton soutien et tes cours de savoir dire non,

Je me rappellerai de cette dernière répèt de soutenance, avec sur les genoux, un chat à poils longs !

Merci à Laura, qui m'a vaillamment enseigné l'art et la manière de la suture,

Et à Anne-Laure, maîtrisant celui de subtilement conserver les échantillons à des températures à geler le mercure.

Alexandre, grand merci pour tout et bon courage pour la suite !

Prends confiance, de ta main de maître, ta thèse est conduite.

Merci Nicolas, pour ta générosité et ton dévouement pendant les expériences,

Lorsque même les détecteurs abandonnaient, tu gardais (mais comment ?) patience.

Merci à Anne-Marie Charvet,

Pour son soutien, ses conseils et la si convoitée recette du crystal violet !

Les ordinateurs sont des êtres indépendants dont je peine à trouver les clefs.

En quête de simulations, j'ai eu la chance d'être fort bien entourée.

Merci Rachel, grâce à toi les subtilités du PSF se sont laissées apprivoiser,

Et je pourrais, les yeux fermés, lancer le calcul d'un DEF dans un cube de 1 cm de côté.

Merci Dimitri pour tes mille et unes leçons sur PENELOPE,

Avec toi, suivre les péripéties d'un électron semblait aussi simple que vider une chope.

Merci à Juan-Carlos Garcia Hernandez, qui, dans la bataille des électrons 17, m'a épaulée,

Et avec qui j'ai grandement apprécié converser et échanger.

Ces tonnes de données, dans des fichiers .txt rassemblées,

Demandent ensuite d'être patiemment triées, classées, traitées.

Merci à Mattia, qui maîtrise aussi bien les boucles *for*

Que la traversée des arêtes enneigées en crampons.

Merci Manu, pour avoir eu le courage d'enseigner le Python

A de fébriles débutants, développeurs en plein essor (ou pas !).

"Mais où donc sont stockées ces nanoparticules ?"

Voilà une question qui, bien loin d'être ridicule,

Nous plonge aussitôt à l'échelle de la cellule.

Sur la ligne ID-16, épuisés et noctambules,

Sylvain et Murielle se sont relayés, imageant sans en omettre,

Tous les détails des F98, nanomètre après nanomètre.

Merci pour ces expériences uniques et si précises,

Qui en plus d'être utiles, offrent des illustrations exquises.

Les tests de clonogénicité demandent sang froid et courage,

Et leur analyse en requiert encore autant, voire davantage.

Merci Thierry pour ta précieuse aide sur le compteur de colonies,

Et à Alberto Mittone pour ta patience à comprendre le logiciel et contourner ses facéties.

Un grand merci à Charlène, Loïc et Angélique

D'avoir pris soin de nos petits rats,

Si mon souvenir de ces expériences ne me rend guère nostalgique,

La sincérité des moments partagés me manquera.

Dur labeur que de gérer la sécurité et ses aléas.

Merci donc à Hélène et Alexandra, et à Véronique, Constance et Laura.

Car remplir des *safety forms* est tout un art,

Et sans repères, cette étape peut rapidement devenir un rempart !

Merci aux vaillants occupants du 18.1.26, peu importe la météo,

Pénélope, Paolo, l'entente fut pacifique (mais presque !) dans ce petit bureau. :-)

Bravo à Clémence d'avoir à la fois survécu

A mon premier TP, et à ce bureau dans lequel le temps s'écoule finalement plus vite que prévu.

Merci à Ludo, plus connu sous son nom de scène Dr. Broche,

Capable de grimper du 15d+ ou faire tourner un code sans anicroche.

Warren, une fois ta tasse lavée et luisante comme une boule à facettes,

Je te remercie encore pour ton aide à apprivoiser les sigmoïdes (sales bêtes !) !

Merci à Andréa et à Mathylde de m'avoir accompagnée dans mes débuts en histo

Car, plus qu'une technique, c'est un art que de couper des tranches de 20 μm de cerveau !

Merci Christian pour tes conseils et ton soutien musical,

Behind Blue Eyes me rappelle maintenant de bons souvenirs où résonnent un accent provençal.

Merci, Elke, pour ta main toujours tendue, ta générosité et ton dynamisme,

Une femme de sciences, une femme au grand coeur, nous entraînant comme par magnétisme.

Samira et Montserrat, grand merci pour votre gentillesse,

Pour chacun, vous souleviez des montagnes avec hardiesse.

Merci à Herwig pour les réglages au faisceau, et à Veronica pour ces joyeuses discussions animées.

Merci à l'ESRF pour les précieux *beamtimes*, espérés et rentabilisés !

Caractériser ces nanoparticules de fer

N'est pas une mince affaire

Sans que cela ne se mue en enfer.

N'en ayant jamais trop à faire,

A la paillasse, sans succès, je m'affaire.

N'ayant nulle connaissance de ferrailleur,

J'ai donc appris à le faire ailleurs.

Merci donc à Marie Carrière et à Petite Marie (Dorier)

De m'avoir enseigné l'art délicat de caractériser les nanoparticules et de les imager.

Merci à David Béal pour m'avoir appris, de la culture cellulaire, ses mille et uns remèdes.

Merci à Sylvain Caillat, souriant même si, tôt le matin, je venais quérir de l'aide.

Merci à Jérôme Planes, Morgane, Camille et à toute l'équipe SyMMES-CIBEST du CEA,

Donnant cette douce impression de faire partie de l'équipe alors que je n'étais jamais là-bas.

Ce sujet de thèse est, par essence, pluridisciplinaire.

A mon grand dam, mes petits monsieurs, je

ne possédais pas la science infuse,

Aucun moyen d'y accéder, même en invoquant les muses.

Merci à tous ceux qui, par leur expertise, mon étude éclairèrent.

Merci à Olivier Renard de m'avoir formée sur cet outil qu'est le ZetaSizer,

Et à Emmanuelle Soleilhac d'avoir tenté l'aventure "NPs + IncuCyte" sans compter ses heures.

Merci à Bastien Dalzon, Catherine Aude-Garcia et Thierry Rabilloud,

Maîtres en la différenciation de macrophages et dont le savoir est un indéniable atout.

Merci à l'équipe coréenne, J. Kun et G.H. Choi et J.K. Kim,

Qui détiennent de la synthèse des NPs les secrets les plus intimes.

Merci à Werner Graber, Jean-Albert Laissue et Valentin Djonov d'avoir pris part à l'aventure

En imageant, par TEM ou en optique, les F98 et J774A.1 sous toutes leurs coutures.

Merci à l'équipe de Karine Pernet-Gallay d'avoir analysé les grilles porteuses de NPs, malgré un microscope un peu réticent,

Et à Véronique Collin-Faure et son aide précieuse pour étudier, d'une cellule, son cycle et ses tourments.

Merci à Norah Collomb, Vasile Stupar, Anthony Delalande et Emmanuel Barbier,

L'ouverture de la BHE est un sujet passionnant et prometteur que j'ai eu grand plaisir à aborder.

Merci à Jean-Philippe Kléman, de la biologie connaissant l'obscure dialecte,

Nous ayant permis d'observer le comportement des F98 *in live and direct*.

Merci à Josiane Arnaud, Benoît Chovelon et Domonique André qui, à grands renforts d'acide nitrique,

Ont eu le courage d'analyser mes nombreux échantillons si peu esthétiques.

Merci à Marlène et Elisa pour avoir partagé avec moi ces expériences,

Je vous souhaite tout le succès dans votre chemin à travers les sciences.

L'administratif étant une science à part, isolée,

Pour laquelle l'école d'ingé ne m'avait guère armée,

Je souhaiterais maintenant remercier ceux qui m'ont aidée à sortir

De ces méandres tortueux sans trop en souffrir.

Merci au LabEx PRIMES d'avoir financé ce projet,

Ainsi qu'à Jean-Baptiste Mourgues et à Béatrice Rayet.

Merci côté Inserm à Margaret Pras, et côté CEA à la patiente Zohra,

Et à l'EDISCE, grand merci à Orélie Garzena.

Grand merci à Laurence et Didier, ainsi qu'à toutes ces belles âmes croisées,

Partageant un repas, un gâteau, un café ou un thé,

Et contribuant à faire, au cours de ces trois ans,

Du synchrotron un endroit humain et vivant.

Un merci tout spécial à Karsten Plamann, tuteur puis ami,

Pour son aide et son soutien, ses paroles qui enlèvent les poids.

Car si j'en suis là, c'est aussi grâce à lui,

Pour m'avoir orientée vers un des milles chemins qui se présentaient à moi.

Une pensée à tous les rats Diateur, Molly,

Stafari, Msès2, Plapla, Comodé, Tatouille, Chidadati, ...

Sans eux, tout ce travail eut été impossible...

Enfin, merci à la bouilloire,

Centre névralgique du secteur 18 et soutien inconditionnel en cas de chute d'espoir !

****

Enfin, bien que longs, ces remerciements sont pour moi le moment

De dire merci à ceux qui m'ont portée, traînée, tractée, mouflée,

Re-portée, lue, re-lue, re-re-relue,

Et qui ont subi les affres de la thèse plus ou moins directement.

Merci tout d'abord à toi, toi qui ne sera peut être pas nommé par la suite

Fatiguée, sache que lorsque m'apparaîtra mon oubli,

Je m'en mordrai les doigts c'est promis.

Merci à la Team Rhinovar et rencontres d'Autrans,

Et à Grenoble, cette fine équipe de doctorants,

Bonne suite à vous tous, continuez sans abdication,

J'espère que nos chemins tortueux se recroiseront !

Un bigzerr merci à Roms, Guigui et compagnie,

A nos journées pétanque - ski !

Merci aux compagnons des équipes Jeunes Alpi,

Ainsi qu'à Rob', mon maître Jedi aguerri.

Merci à Marieke, Pipo, Thibault et Océ et à leur poésie déjantée,

Sous une cascade ou dans une arche, "confortablement" (heu) installés.

A ces moments inoubliables dans une courte vie !

Merci à Thaïs et aux compagnons circassiens du mardi !

Christelle, Quentin, Victor, à mes amis d'antan,

Que votre chemin soit beau ; mais n'oubliez pas d'en sortir de temps en temps :-)

3 ans sur le plateau de Saclay, cela laisse des souvenirs de journées bien remplies,

Je ne peux citer tout le monde, mais à tous, grand merci !

Merci à Gilles, Omar, Marine, Yoann, Héloïse, Marius et Quentin,

Que d'anecdotes entremêlées dans l'attente de se retrouver !

Merci aussi à Pierre, Mireia, Philippe et Aurélien,

Et merci à Esteban et Florian, que le hasard a, à Grenoble, amenés !

Mayotte, Simon et Ysalis, le trio du bonheur,

Que votre chemin se poursuive dans les chants... et les pirochkis en fleurs !

(rooooh elle a fait une faute tu crois ? ou alors c'est fait exprès ?)

Antoine, Benjamin, Maugan et Nathan,

Clément, Agathe, Kristiane et nouveaux amis rencontrés,

Je ne vous ai pas oubliés,

Merci pour ces moments partagés

Au détour d'un lac, d'un chantier,

D'une prise en résine ou d'une ambrée !

A Aude et Gaël, joie et amour aux jeunes mariés !

A Yacine : "n'hésite jamais !", au risque de me répéter.

Mais je crois que de mes quelques conseils énoncés

-Complexes, fractions, périmètres et vecteur u-

C'est bien celui que tu auras le moins retenu !

Stoustou, Lulu *and* Ze Baluchon, plein de joie à vous trois,

J'espère bien qu'avant dix-sept ans, l'on se

reverra ;-) !

Grand merci aux inimitables Vincent et Vincent, bouquetins fous des sommets,

Pour les aventures en Vercors, en Chartreuse, et à nos nouveaux projets !

Merci à Noémie et Clément qui, confiants, ont prêté les clefs de leur appartement.

Je n'y ais pas (encore) tout cassé, heureusement,

Et pour la rédaction ce fut un vrai havre de paix,

Entre deux miaulements et un ravalement de façade au bord des quais !

Un grand, immense, merci du fond du coeur

A P.-A., qui est -sans nul doute- du monde le meilleur assureur,

Et à Yann, le Confucius aux Boules d'Or (il s'agit ici de pétanque, ne nous méprenons pas !),

Affrontant courageusement mes vaines tentatives de l'envoyer dans le décor !

René, Odette, précieuses rencontres chères à mon coeur,

Merci pour vos encouragements et pour ces mots qui réconfortent.

Car il faut parfois laisser ses pieds marcher au-dehors du seuil de la porte

Pour vivre ensemble des instants simples de bonheur.

A Clémence,

Petit elfe de la science,

A Chloé,

Son sourire épanoui et ces belles soirées,

A Mouna,

Encadrante de toujours dont je suis lentement les pas,

A Clara, amie depuis la cour des petits,

A ces moments, anciens ou plus récents,

Que jamais l'on oublie,

Quand le banjo résonne et que les pas rythment les reprises de la Carter Family.

Un grand MERCI à ma famille, même si parfois les mots ne sortent pas,

Ce respect discret qui rassemble et guide chacun de nos pas.

Merci à mon oncle et ma tante d'avoir partagé ce jour particulier,

Et à Florence, Quentin, Lisa et ma belle famille qui m'ont soutenue et accompagnée.

Merci à mon Père pour cette passion qu'il m'a, je crois, communiquée,

Ce goût d'apprendre, encore et toujours, qu'il m'a enseignée.

Il est plus aisé de savoir qu'au-dessus des nuages brille le soleil,

Quand on sait qu'auprès de nous, sa Mère-Veille...

A mes grands-mères et mes grands-pères :

Merci pour ces précieux moments de partage, ces racines qui relient à la Terre,

A ces moments dans le Golfe, ces embruns, la salicorne et les poissons grillés

Et la scie à métaux pour les découper.

A ces moments devant Rochebrune la Majestueuse,

Roïboos et grille pain, parties de pétanque musculeuses !

Merci à mon frangin et à Billie, musiciens beaux comme des sous neufs,

Ca braille, ça braille, mais ça braille avec des voies tièrcées

Continuez à savourer la vie comme un Gelato Al Limone (ou quatre) !

Au plaisir d'une pamiggiana, d'un bloc ou d'une improvisation en G#m7 sus4 add9 !

Enfin, merci à celui qui a été là de plein de manières,

Immuable, comme la course des nuages ou le voyage de l'eau sur la pierre.

Sache que si avec une tente, j'arrive à me débrouiller sans toit
En aucun cas cela ne me tente de poursuivre le chemin sans toi.
Pour tout, et son contraire,
Cimer Albert !

Liste des abréviations et acronymes

AC Agent de contraste
AC Gd Agent de contraste au gadolinium
ADN Acide désoxyribonucléique
AMM Autorisation de Mise sur le Marché
ANOVA *ANalysis Of VAriance*
BB *BroadBeam*, faisceau plein
BSA Albumine de sérum bovin
CDB Cassure Double Brin
CED *Convection Enhanced Delivery*
CFSE *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
CSB Cassure Simple Brin
CT-scan *Computerized Tomography*, tomodensitométrie (appareil : scanner)
DDAO-SE 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)
DLS *Dynamic Light Scattering*
DMEM *Dulbecco Modified Eagle's Medium*
DO / OD Densité Optique / *Optical Density*
EPR *Enhanced Permeability and Retention*
ESRF *European Synchrotron Radiation Facility*
FISH *Fluorescence in situ hybridization*
GA Glutaraldéhyde
GFP *Green Fluorescent Protein*
Gy Gray
H & E Hématoxyline et Eosine (ou Erythrosine)
ICP-MS *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*
i.c. intra-cérébral
IO *Iron Oxyde*
IRM Imagerie par Résonance Magnétique
i.v. intra-vasculaire
i.t. intra-tumoral

Ma Macrophage
Mo Monocyte
MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MRT *Microbeam Radiation Therapy*
NP40 Tergitol-type NP-40
NPs Nanoparticules
NPs Fe Nanoparticules de fer
PBS *Phosphate-Buffered Saline*
PEG Polyéthylène glycol
PFA Paraformaldéhyde
PTX Paclitaxel
ROS *Reactive Oxygen Species*
SNC Système Nerveux Central
SR-XRF spectrométrie de fluorescence de rayons X
SSC Citrate sodique de sel
SVF Sérum de Veau Foetal
TEM Microscopie électronique par transmission

Introduction générale

Malgré le développement de nouveaux traitements anticancéreux, l'espérance de vie des patients atteints du glioblastome multiforme (GBM), la tumeur la plus agressive du cerveau, n'a augmenté que de quelques mois depuis ces 25 dernières années. Le traitement standard proposé aux patients associe trois techniques : la résection chirurgicale, la chimiothérapie et la radiothérapie [Stup 14]. Cependant, le bénéfice thérapeutique est modéré et le traitement ne reste, la plupart du temps, que palliatif. En plus de leur caractère invasif et de leur résistance intrinsèque aux traitements, les gliomes sont localisés dans une zone fragile et difficilement atteignable du corps humain. La résection chirurgicale n'est pas toujours possible et ne permet pas de retirer les cellules infiltrées dans les tissus sains. De plus, les gliomes sont naturellement "protégés" des médicaments chimiothérapeutiques par la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Cette barrière protectrice est formée par les parois des vaisseaux sanguins irriguant le cerveau. Elle filtre très sélectivement les substances passant du sang vers le cerveau, empêchant les agents potentiellement dangereux de rejoindre cette zone sensible. Cependant, cette même barrière empêche aussi une infiltration suffisante de la plupart des médicaments antitumoraux dans les tumeurs cérébrales.

L'utilisation de la radiothérapie standard est elle aussi limitée, car la dose requise pour stériliser ces cellules tumorales souvent très résistantes entraîne aussi la nécrose du tissu sain se trouvant sur la trajectoire du faisceau. En effet, les particules ionisantes déposent indifféremment leur énergie dans la tumeur et dans les tissus qui l'entourent ; les dommages ne sont donc pas ciblés sur le gliome. Une piste d'amélioration serait de "concentrer" l'effet de la radiothérapie sur la tumeur, tout en épargnant le plus possible le cerveau sain. Les éléments de haut Z (Z>50) ont l'intérêt d'absorber davantage les photons de basses énergies (30-100 keV) que les tissus : les probabilités d'interaction peuvent être jusqu'à deux ordres de grandeur supérieures à celles des tissus. Cet effet est par ailleurs à l'origine de l'augmentation du contraste obtenue dans les images scanner grâce aux agents de contraste.

Une solution thérapeutique consiste donc à charger la tumeur en atomes lourds. Lors de l'irradiation, les rayons X interagissent avec ces atomes lourds et leur arrache des électrons. Ces électrons dits "secondaires" causent ensuite des dommages supplémentaires dans un rayon limité à quelques cellules. L'idée de tirer profit des atomes lourds date des années 1980, après une observation fortuite par Adams et Norman qui remarquent que les angiocardiographies induisent des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes du sang après injection d'iode. Cet effet néfaste a rapidement été détourné par Santos Mello et Norman dans un objectif thérapeutique [Mell 83, Norm 97]. Depuis, de nombreux efforts de recherche ont été déployés *in vitro*, *in vivo* et en simulations pour comprendre les mécanismes derrière ce phénomène. L'effet thérapeutique s'est révélé dépendant de la nature de l'atome lourd, de sa concentration intratumorale et subcellulaire, de l'énergie et du dispositif d'irradiation.

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans l'équipe Rayonnement Synchrotron et Recherche

Médicale (RSRM) implantée sur la ligne biomédicale ID-17 de l'ESRF en collaboration avec l'équipe SyMMES-CIBEST du CEA de Grenoble. L'équipe RSRM travaille depuis plus de quinze ans dans le domaine de l'augmentation de dose par éléments lourds [Adam 03a, Edou 10]. Le faisceau produit par le synchrotron permet de sélectionner une longueur d'onde de basse énergie tout en gardant un flux de photons adapté à la radiothérapie. Le travail avec un faisceau monochromatique s'est en effet révélé bénéfique pour optimiser la distribution de dose et limiter la dose à l'os. Cette stratégie thérapeutique utilisée dans le cadre d'un synchrotron est connue sous le nom de SSRT (*Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy*). Lors d'études précliniques, l'équipe a ainsi pu montrer que l'utilisation d'agents de contraste iodés associés à une radiothérapie de 15 Gy à 50 keV permettait d'augmenter significativement la survie de rats porteurs de gliomes F98 (augmentation de 44% de la survie contre 20% pour la radiothérapie seule [Adam 03b]). Cette stratégie thérapeutique est aujourd'hui en phases I et II d'essais cliniques (investigateur principal : Pr. J. Balosso, NCT01640509). En parallèle de ces travaux sur les agents de contraste iodés, l'équipe RSRM s'intéresse aussi à de nouveaux composés susceptibles d'améliorer encore le dépôt de dose par rapport à l'iode.

Parmi ces nouveaux composés, les nanoparticules (NPs) font l'objet d'un nombre croissant d'études. En 2004, Hainfeld *et al.* publièrent un article pionnier dans lequel ils rapportèrent l'efficacité d'un traitement combiné de radiothérapie (26 Gy à 250 kVp) et d'une injection de nanoparticules d'or par voie intraveineuse. Ce traitement permit une importante augmentation de la survie de souris porteuses de tumeurs sous-cutanées avec 86% de survie à long terme [Hain 04]. Depuis, de nombreuses équipes ont exploré les capacités de l'or et d'autres métaux (argent, gadolinium, platine, ...) à augmenter l'effet de la radiothérapie dans les tumeurs. Bien que tous les mécanismes en jeu ne soient pas complètement élucidés, le regroupement des atomes lourds sous forme de NPs favorise l'internalisation de ces composés par les cellules et permet de modifier le dépôt de dose à l'échelle nanoscopique lors de l'irradiation. Les dommages locaux qu'ils induisent sont donc plus proches des parties vitales de la cellule (ADN, mitochondrie). L'équipe RSRM a précédemment étudié le potentiel des NPs d'or, de platine et de gadolinium [Boby 10, Taup 13, Delo 17]. Au cours des travaux de thèse de Paul Gimenez [Gime 15], il s'est avéré que des NPs d'oxyde de fer, un métal alors sous-estimé pour ce type de traitement, arrivaient à se concentrer *in vitro* dans les cellules de manière telle que les effets attendus après irradiation permettraient de détruire deux à trois fois plus de cellules tumorales qu'une radiothérapie seule.

Ces travaux de thèse visaient donc tout d'abord à poursuivre l'étude des nanoparticules d'oxyde de fer (NPs Fe) comme composé permettant de renforcer l'effet de la radiothérapie dans les gliomes. Dans cet objectif, des études *in vitro* sur la lignée cellulaire F98 ont été réalisées en exposant des cellules aux NPs Fe, puis en les irradiant avec un faisceau monochromatique de basse énergie. Les NPs Fe proviennent d'une collaboration avec l'équipe coréenne de J.-K. Kim (Université de Daegu, Corée). Une étude de simulations (code Monte-Carlo PENELOPE) a été menée pour tenter d'apporter quelques informations supplémentaires sur les processus physiques mis en jeu.

Une des limites de la SSRT réside dans l'accumulation suffisante des composés dans la tumeur. Tout comme les médicaments chimiothérapeutiques, les NPs ou agents de contraste peinent à s'accumuler dans les gliomes du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique. Celle-ci est un peu plus perméable au niveau de la zone tumorale, permettant l'infiltration modérée des composés injectés par voie intraveineuse, mais l'accumulation qui en résulte reste néanmoins insuffisante pour espérer obtenir un bénéfice thérapeutique. Ces travaux de thèse ont exploré une stratégie pour contourner le problème de la BHE en utilisant des cellules immunitaires chargées en NPs Fe pour traverser cette barrière et transporter les composés jusque dans la tumeur. Après étude de cette stratégie *in vitro*, la capacité de ces cellules immunitaires pour migrer dans la tumeur

ont été expérimentés *in vivo*.

Ces travaux ont principalement été conduits dans l'équipe RSRM implantée à l'ESRF (Grenoble), en collaboration avec le laboratoire CIBEST du CEA de Grenoble. Toutefois, les études pluridisciplinaire présentées dans ce manuscrit n'auraient pas pu être réalisées sans collaborations, que ce soit pour l'utilisation d'instruments que nous ne possédions pas ou pour des conseils sur les protocoles ou les simulations. Ce travail de thèse n'aurait donc pas pu avancer sans ces collaborateurs, qui seront nommés dans les chapitres correspondants.

Ce manuscrit est composé de trois parties. Tout d'abord, une **première partie** "bibliographie et état de l'art" abordera les problématiques de la thèse selon trois axes directeurs : les gliomes et les limites des traitements actuels, l'utilisation de NPs pour renforcer le dépôt de dose, et enfin le transport et la distribution des NPs dans les gliomes. Cette première partie tente de donner quelques éléments au lecteur non averti pour prendre du recul sur les méthodes actuelles, leur fonctionnement et leurs limites.

Dans une **deuxième partie**, nous aborderons les résultats des études visant à étudier le potentiel de l'oxyde de fer pour augmenter la dose dans la tumeur. Les interactions physiques lors de l'irradiation de NPs Fe seront discutées dans un premier chapitre consacré aux simulations Monte-Carlo. Puis, après un chapitre traitant de la caractérisation des NPs Fe, les conséquences de l'exposition des cellules aux NPs Fe sans irradiation seront présentées et discutées. L'effet des NPs lors d'une irradiation monochromatique à basse énergie de cellules chargées sera ensuite évalué. Deux méthodes de mesure de la survie cellulaire ont été employées dans ces travaux, et le choix de leur utilisation fera aussi l'objet d'une discussion. Cette étude s'achèvera avec la présentation d'une expérience pilote visant à étudier le potentiel des NPs Fe pour augmenter la dose dans un gliome F98 chez le rat.

Enfin, une **troisième partie** aura pour sujet les résultats relatifs aux stratégies de transport des NPs à travers la barrière hémato-encéphalique. Ces travaux de thèse se sont concentrés sur l'utilisation de cellules immunitaires, les monocytes/macrophages, comme vecteurs des NPs capables de s'infiltrer à travers la BHE jusque dans la tumeur. Après avoir exposé les résultats de la méthode "Cheval de Troie" *in vitro*, les résultats obtenus *in vivo* chez le rat porteur de gliome F98 seront décrits et discutés. Les résultats préliminaires d'une méthode d'ouverture mécanique de la BHE par ultrasons seront présentés à titre d'ouverture.

Une discussion générale tentera finalement de rassembler l'ensemble de ces travaux dans une dernière analyse, avant d'achever ce manuscrit par une conclusion et l'évocation de quelques perspectives.

Première partie

État de l'art

Chapitre 1

Le glioblastome : thérapies actuelles et limites des traitements

Sommaire

1.1 Le cerveau, origine et environnement des gliomes 18
1.1.1 Organisation du système nerveux 18
1.1.2 Composition et fonctions de la glie 19
1.1.3 Origine des cellules gliales 19
1.2 Le glioblastome, tumeur cérébrale maligne 20
1.2.1 Métabolisme et homéostasie 20
1.2.2 Les tumeurs cérébrales, rares mais agressives 21
1.2.3 Classification des tumeurs cérébrales 21
1.2.4 Le cas du glioblastome multiforme 22
1.3 Solutions thérapeutiques 25
1.3.1 Le traitement conventionnel du GBM 25
1.3.2 Limites des options thérapeutiques actuelles 25
1.3.3 Pistes thérapeutiques actuelles : diverses stratégies de ciblage 29
1.3.4 Pistes d'optimisation de la radiothérapie 35
1.4 Le Chapitre 1 en quelques mots 44

Le glioblastome est une tumeur cérébrale très agressive pour laquelle aucune option thérapeutique n'aboutit aujourd'hui à la guérison. Ce premier chapitre présente la maladie et le traitement actuel proposé aux patients ainsi que les limites de ce traitement. Quelques améliorations et nouvelles options thérapeutiques seront ensuite présentées, puis les efforts de recherche pour l'optimisation de la radiothérapie seront approfondis.

1.1 Le cerveau, origine et environnement des gliomes

1.1.1 Organisation du système nerveux

Les actions d'un être vivant sont coordonnées par le système nerveux qui communique avec les différentes parties du corps *via* des signaux électrochimiques. Il s'organise en deux parties : le système nerveux central, comprenant l'encéphale [1] et la moëlle épinière, et le système nerveux périphérique, composé des nerfs et des ganglions nerveux (Fig. 1.1).

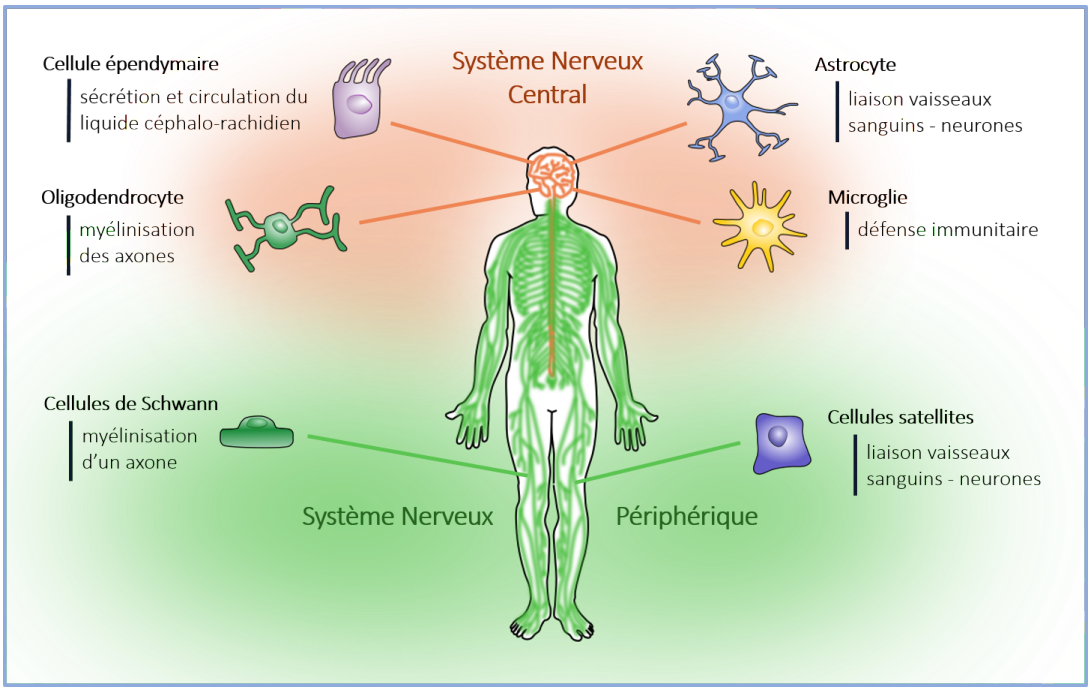


Figure 1.1 – *Description des cellules gliales associées aux systèmes nerveux central et périphérique.*

L'unité fonctionnelle du système nerveux est le neurone, qui transmet et traite les signaux grâce à une longue fibre, l'axone. Le cerveau humain compte environ 85 milliards de neurones [Azev 09], organisés en un réseau ordonné et liés entre eux par leurs nombreuses ramifications terminales. En plus des neurones, le système nerveux contient aussi d'autres cellules qui, elles, ne sont pas excitables électriquement : ces cellules ne peuvent donc pas conduire l'influx nerveux. Elles furent découvertes au XIXe siècle par les neurochirurgiens Rudolf Virchow, Santiago Ramón y Cajal et Pío del Río-Hortega, qui les considérèrent d'abord comme étant une sorte de ciment pour les neurones. C'est pourquoi elles furent nommées "cellules gliales", du grec *glia* signifiant "colle". Par la suite, il s'est avéré que les cellules gliales étaient bien plus qu'un liant et qu'elles jouaient en fait un rôle crucial dans le soutien des neurones, leur apportant entre autre oxygène et nutriments. Elles sont ainsi parfois désignées comme les "cellules nourricières" des neurones. Le détail de leurs rôles est encore mal connu aujourd'hui et chaque avancée prouve que les cellules gliales assurent des fonctions encore bien plus variées et interviennent par exemple dans le nettoyage des cellules mortes, la destruction des pathogènes ou la production de myéline.

Pendant plusieurs siècles, le nombre de cellules gliales était estimé à plusieurs centaines de

1. L'encéphale comprend le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral.

milliards, soit 10 fois le nombre de neurones. Ce ratio est aujourd'hui très controversé et le nombre de cellules gliales se rapprocherait en réalité du nombre de neurones, malgré le fait que certains chercheurs maintiennent encore les hypothèses antérieures [Bart 16, Azev 09].

1.1.2 Composition et fonctions de la glie

Depuis la découverte des cellules gliales, de nombreuses équipes ont œuvré pour comprendre leur rôle au sein du système nerveux. L'étude microscopique de la forme et de la structure de ces cellules a montré que l'on pouvait les classer en plusieurs catégories. On différencie aujourd'hui quatre types de cellules gliales (Fig. 1.1) :

- les **astrocytes**, de forme étoilée, sont de réelles plate-formes entre le sang et les neurones au sein du système nerveux central. Ils s'assurent de la bonne alimentation des neurones en oxygène et en nutriments et interviennent même dans la neurotransmission. Dans le système nerveux périphérique, les cellules satellites semblent effectuer un rôle similaire.
- les **cellules de la microglie** composent la principale défense immunitaire du système nerveux central. Elles ont les mêmes origines que les cellules immunitaires usuellement connues sous le nom de "globules blancs".
- les **oligodendrocytes** sont des cellules du système nerveux central et ont pour principale fonction de recouvrir les axones d'une gaine de myéline. Cette gaine permet d'augmenter la vitesse de propagation des influx nerveux. Un seul oligodendrocyte peut "myéliniser" plusieurs dizaines d'axones en même temps. Dans le système nerveux périphérique, ce rôle est assuré par les cellules de Schwann, qui elles ne peuvent "myéliniser" qu'un unique axone à la fois.
- les **cellules épendymaires** tapissent les cavités du système nerveux central. Elles sécrètent et favorisent la circulation du liquide cérébro-spinal, c'est-à-dire le liquide dans lequel baignent le cerveau et la moëlle épinière et qui amortit les chocs qui pourraient les endommager.

1.1.3 Origine des cellules gliales

Les quatre types de cellules gliales n'ont pas toutes la même origine : les cellules de la *microglie* proviennent de l'hématopoïèse, c'est-à-dire du processus de production des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (Fig. 1.2). Les cellules souches hématopoïétiques se trouvent dans la moëlle osseuse après la naissance. Elles peuvent proliférer et se différencier en cellules de plus en plus spécialisées, dont l'étape finale est l'une des cellules présentes dans le sang (globules blancs, globules rouges ou plaquettes). Il est intéressant de noter que les cellules perdent peu à peu leur capacité de prolifération au fur et à mesure de leur maturation.

Les *trois autres types de cellules gliales* proviennent des cellules souches neurales de l'embryon [Rowi 10]. Tout comme les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches neurales peuvent proliférer et se différencier en cellules plus matures. Ainsi, les cellules souches neurales peuvent se différencier en glie radiaire, qui elle-même, après plusieurs générations de précurseurs et progéniteurs, se spécialise en neuroblaste puis en neurone, ou en cellule épendymaire, ou encore en précurseur glial qui se différenciera ensuite en oligodendrocyte ou en astrocyte [Gran 03]. Il est à noter que cette généalogie, représentée dans la figure 1.2, décrit très schématiquement les phénomènes supposés et que les processus réels sont bien plus complexes et encore mal connus.

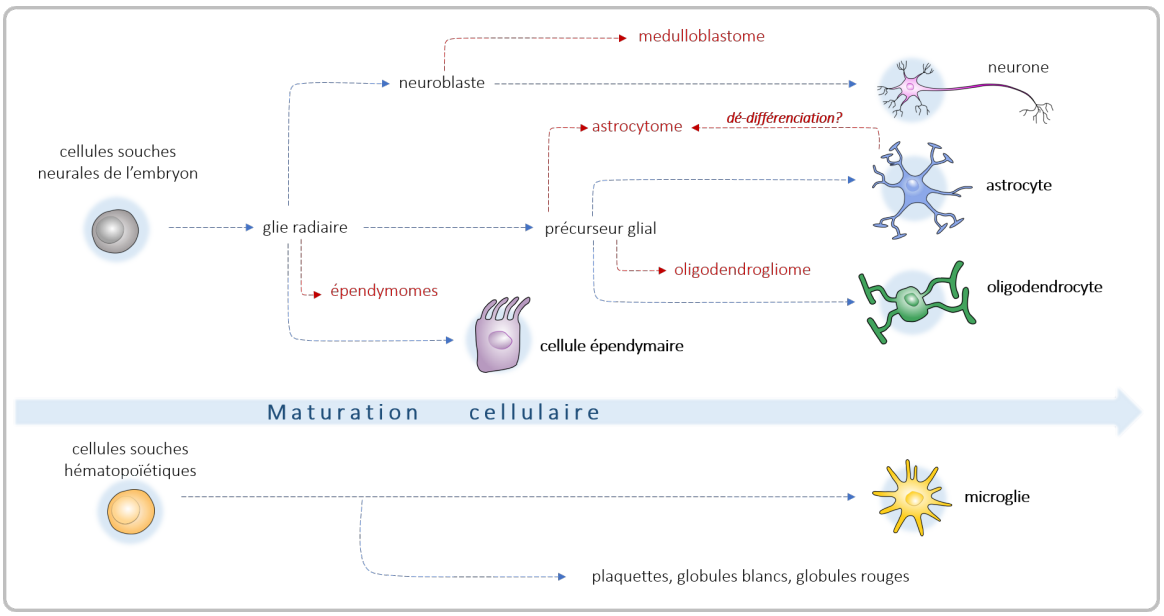


Figure 1.2 – *Origine schématique des cellules gliales et des cellules tumorales qui en dérivent, d'après [Rowi 10, Gran 03].*

1.2 Le glioblastome, tumeur cérébrale maligne

1.2.1 Métabolisme et homéostasie

Dans des conditions normales de métabolisme, les cellules communiquent entre elles et ont un cycle de vie très strictement contrôlé, décrit dans les gènes se trouvant dans l'ADN. Les gènes constituent une vraie bibliothèque dans laquelle le comportement des cellules est précisément détaillé depuis leur naissance jusqu'à leur mort : par exemple, le déroulement régulé de l'apoptose (*i.e.* la mort cellulaire programmée) permet de recycler proprement le matériel contenu dans chaque cellule après sa mort. L'ensemble de ces mécanismes contribue au développement harmonieux de notre organisme, malgré les menaces quotidiennes imposées par son environnement hostile. Cet équilibre délicat est appelé ***homéostasie***. Malheureusement, le système de régulation cellulaire n'est pas sans failles. Suite à une agression de l'extérieur, un ou plusieurs gènes peuvent être modifiés. L'ADN subit aussi quotidiennement des dégâts de façon intrinsèque : à titre d'exemple, l'ADN d'une cellule de mammifère est altérée plus de 60 000 fois par jour [Bern 13]. De nombreux mécanismes entrent en jeu pour réparer ces dommages ou pour commander à la cellule de mourir si les dommages sont trop importants afin de préserver l'homéostasie. Malgré tout, il se peut que quelques cellules échappent aux mécanismes de contrôle rigoureux et développent un comportement anormal. Si elles ne sont pas éliminées, ces cellules indisciplinées peuvent proliférer de manière anarchique. Cela donne alors naissance à un groupe de cellules tumorales qui se développe jusqu'au moment où le système immunitaire finit par le détecter et l'éliminer. Néanmoins, quand la prolifération devient trop chaotique, la tumeur grandit de manière incontrôlable, s'étend et envahit les tissus sains qui l'environnent. On dit qu'un groupe de cellules devient une tumeur lorsqu'il compte plus de 100 000 cellules [Je m 14].

Ce groupe de cellules déréglées peut constituer une simple anormalité qui ne menace *a priori* pas la vie de l'être vivant : on dit alors que la tumeur est ***bénigne***. Une tumeur bénigne devient

maligne, c'est-à-dire dangereuse, quand les cellules tumorales commencent leur migration dans les zones voisines au lieu de rester confinées. Les cellules tumorales peuvent ensuite envahir de nouvelles parties du corps et s'y installer pour proliférer à nouveau, engendrant des métastases. Lorsqu'elles envahissent les tissus sains, les cellules tumorales détruisent leur environnement, menaçant ainsi la vie de l'être vivant.

Les causes du cancer sont complexes et mal comprises mais il semble que deux voies puissent déclencher son développement : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque [Soli 09]. La voie intrinsèque met en jeu des altérations géniques, tandis que la voie extrinsèque est initiée par des infections virales ou bactériennes ou des maladies auto-immunes, créant une zone inflammée qui s'associe au développement du cancer. L'environnement (mode de vie, pollution, ...) est aussi un facteur exogène clef, même si l'origine précise d'un cancer reste souvent inexpliquée.

1.2.2 Les tumeurs cérébrales, rares mais agressives

Le cancer est la cause principale de mortalité dans les pays développés et la deuxième cause de mortalité dans les pays en voie de développement [Jema 11] : il est à l'origine d'environ environ 13% des décès dans le monde [WHO 10]. L'incidence d'un type de cancer est à différencier de sa mortalité. Certains cancers, comme le cancer de la prostate, sont fréquemment diagnostiqués mais ont une mortalité "faible" : souvent, il s'agit de cancers pour lesquels les méthodes actuelles de thérapie sont efficaces. Au contraire, d'autres cancers, comme le cancer du pancréas ou les tumeurs cérébrales, sont plus rares mais sont mortels. La guérison pour ces types de cancer reste singulière et la thérapie est généralement palliative. Le *Scottish Cancer Registry* classifie les tumeurs cérébrales comme le second type de cancer ayant le taux de survie le plus bas pour les personnes d'âge compris entre 15 et 99 ans.

On distingue, parmi les tumeurs cérébrales [2], les tumeurs primitives et les tumeurs secondaires. Une tumeur cérébrale est dite ***primitive*** lorsque la tumeur est amorcée par les cellules du cerveau qui, après plusieurs mutations, se mettent à proliférer de manière anarchique. Une ***tumeur cérébrale secondaire***, aussi appelée métastase cérébrale, est formée par des cellules dérivant d'un autre organe (fréquemment le poumon ou le sein) ayant migré jusqu'au cerveau. Les tumeurs cérébrales secondaires sont beaucoup plus fréquentes que les tumeurs cérébrales primitives et compliquent l'évolution de 20% des cancers.

Depuis le lancement des *Plans Cancer* en 2003, l'Institut National pour le Cancer (INCa) et ses collaborateurs recensent et publient des données sur les causes médicales des décès dus au cancer. Pour l'année 2010, le nombre estimé de nouveaux cas de tumeurs cérébrales en France était de 4 570, soit 1,3% des nouveaux cas de cancers. La même année, le nombre de décès estimés était de 2 940, soit 2% de l'ensemble des décès par cancer. Bien que le pic d'apparition des tumeurs cérébrales soit de 59 ans [Amer 18], celles-ci touchent les adultes à tout âge ainsi que les enfants. Les tumeurs cérébrales représentent 23% des cancers pédiatriques. Il s'agit donc de la deuxième cause de décès liée à un cancer pour les jeunes de moins de 20 ans, après la leucémie.

1.2.3 Classification des tumeurs cérébrales

Il existe plus de 120 types de tumeurs cérébrales [Amer 18]. Bailey et Cushing proposèrent en 1926 un premier classement des tumeurs cérébrales [Bail 26] en se fondant sur l'observation

2. On parle indifféremment de tumeurs cérébrales, de tumeurs du cerveau, de tumeurs intracrâniennes ou encore de tumeurs du système nerveux central pour désigner les tumeurs qui se développent à l'intérieur du crâne.

microscopique des cellules tumorales. Les tumeurs sont alors classifiées selon leur ressemblance avec une cellule du système nerveux ou de son précurseur. Par exemple, si la tumeur est composée de cellules s'apparentant aux astrocytes, elle sera nommée "astrocytome" (voir Fig. 1.2). Ils distinguent alors les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les épendymomes, ressemblant aux cellules gliales éponymes, et les médulloblastomes, ressemblant aux précurseurs des neurones [Misc 04].

Même si les travaux récents montrent que les processus sous-jacents sont bien plus complexes, la convention de ce premier classement est restée comme fil directeur. Aujourd'hui, le classement de référence est celui de l'Organisation Mondiale de la Santé [Loui 07], qui comporte quatre éditions : la première édition a été publiée par Zülch en 1979, et la dernière date de 2016. Ce classement est couplé avec une évaluation de la malignité des tumeurs, c'est-à-dire de leur agressivité : pour cela, chaque tumeur est associée à un grade indiquant leur degré de malignité.

- Les tumeurs de grade I prolifèrent lentement, ne sont pas malignes et sont associées à une survie des patients à long terme élevée.
- Les tumeurs de grade II prolifèrent relativement lentement, mais rechutent parfois comme les tumeurs de haut grade. Elles peuvent être malignes ou non.
- Les tumeurs de grade III sont malignes et rechutent souvent comme les tumeurs de haut grade.
- Les tumeurs de grade IV prolifèrent rapidement. Ce sont des tumeurs malignes très agressives.

1.2.4 Le cas du glioblastome multiforme

1.2.4.1 Le glioblastome, astrocytome de grade IV

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différents types de tumeurs cérébrales. Celles-ci portent généralement le nom des cellules à partir desquelles elles se développent : les gliomes, les tumeurs cérébrales les plus fréquentes, se forment à partir des cellules gliales. Il existe plusieurs types de gliomes, dont certains sont bénins et d'autres malins. Le type de gliome le plus fréquent est l'astrocytome. Comme son nom l'indique, il s'agit donc d'une tumeur qui s'est développée à partir des astrocytes, les cellules nourricières des neurones (voir Fig. 1.3). Selon la base de données de l'INCa, les astrocytomes représentent environ 90% des gliomes. Ils sont généralement infiltrants : les cellules tumorales quittent la masse compacte et se disséminent dans le tissu environnant, effaçant la limite entre la tumeur et le cerveau sain. Ces tumeurs croissent plus ou moins rapidement selon leur grade.

Si l'on suit la classification de l'OMS, on peut attribuer un grade à chaque type d'astrocytome (voir Table 1.1) : les astrocytomes pilocytiques (grade I), sont bénins et généralement curables. A partir du grade II, les astrocytomes sont malins mais leur prise en charge est différente selon le degré de malignité. Un astrocytome de bas grade peut donc évoluer, dans un délai variable, en astrocytome de haut grade. Les astrocytomes de bas grade (grade II) sont appelés astrocytomes diffus. Les astrocytomes de haut grade regroupent les astrocytomes anaplasiques, de grade III, et les glioblastomes multiformes, de grade IV. L'adjectif "multiforme" représente bien l'hétérogénéité de ce type de tumeur, que ce soit dans les gènes exprimés par la tumeur ou dans sa réponse au traitement.

Il est intéressant de noter que les tumeurs les plus malignes, les tumeurs de grades III et IV, sont composées de cellules qui ressemblent à leurs précurseurs peu différenciés. L'***anaplasie***, c'est-

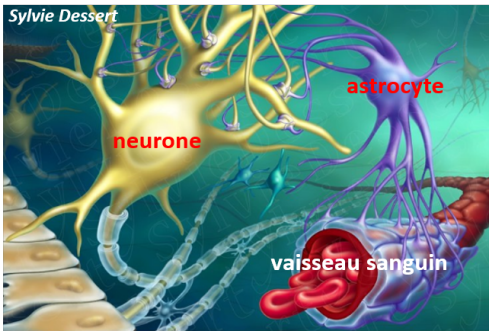


Figure 1.3 – *L'astrocyte établit un lien entre les neurones et les vaisseaux sanguins (d'après l'illustration de Sylvie Dessert).*

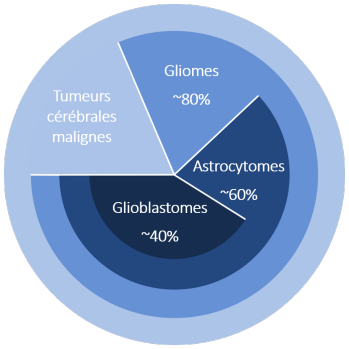


Figure 1.4 – *Pourcentage des différents types de gliomes dans les tumeurs cérébrales (figure réalisée d'après [Amer 18]).*

Astrocytome	Grade	Fréquence
Astrocytome pilocytique	grade I (bénin)	environ 5%
Astrocytome diffus	bas grade II	environ 15%
Astrocytome anaplasique	haut grade III	20 à 30%
Glioblastome	haut grade IV	60 à 70%

Table 1.1 – *Tableau résumant les principaux types d'astrocytomes ainsi que leur grade et leur fréquence.*

à-dire la perte de certaines capacités acquises lors de la spécialisation des cellules, est synonyme d'agressivité tumorale. Si l'anaplasie est déjà observée pour les astrocytomes de bas grade, ces cellules tumorales restent par contre peu capables de mitose [3] et la tumeur peine à promouvoir la vascularisation nécessaire à son approvisionnement en oxygène et en nutriments. Dans le cas du glioblastome multiforme, les cellules sont très anaplasiques et capables de proliférer massivement. La tumeur se constitue un micro-environnement propre où la synthèse de néovaisseaux est accrue et où certaines zones, trop éloignées de la circulation sanguine à force de croissance tumorale, ne parviennent plus à se développer et deviennent nécrotiques.

1.2.4.2 Epidémiologie

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes, constituant plus de 60% des tumeurs cérébrales chez les adultes. Ils peuvent être contractés à tout âge mais l'incidence principale se situe entre 55 et 60 ans [Hani 17]. Le glioblastome multiforme (GBM) est la principale cause de décès due au cancer pour les enfants de moins de 15 ans, et la deuxième cause pour les enfants et adultes entre 15 et 34 ans [Misc 04]. Chez les adultes, le GBM est en proportion moins fréquent que d'autres types de cancer, mais la durée moyenne de survie après diagnostic stagne à environ 14 mois, malgré les traitements anti-cancéreux agressifs.

1.2.4.3 Causes

Les causes précises du développement du GBM sont inconnues et les facteurs de prédisposition demeurent mal identifiés. Le seul facteur de risque dont l'impact ait été prouvé est l'exposition à de

3. La mitose est le processus par lequel une cellule mère se divise en deux cellules filles.

fortes doses de radiations ionisantes, notamment lors d'une radiothérapie. Le risque de contracter un GBM est donc clairement accru pour les enfants atteints de leucémie et traités par radiothérapie [Fish 07]. Si des fortes doses de radiations ionisantes sont un facteur de risque, il se pose alors la question de l'impact de doses plus faibles d'exposition aux radiations, par exemple au cours d'une imagerie médicale pour un diagnostic. Pour le moment, aucune étude ne semble montrer que ces faibles doses puissent déclencher un GBM. D'autres facteurs de risques environnementaux sont aussi suspectés mais aucune corrélation significative n'a pu être montrée à ce jour, laissant ces hypothèses fortement controversées [Hani 17] : parmi ces facteurs peuvent être cités la proximité d'ondes radio-fréquence comme les téléphones portables, ou encore l'exposition régulière à certains pesticides. De plus, même si le GBM semble parfois se transmettre dans certaines familles, le ou les gène(s) sensibles n'ont pas encore été mis au jour.

A l'échelle cellulaire, il existe deux mécanismes potentiels sous-jacents à cette maladie : dans la première théorie, la tumeur est composée de cellules équipotentes, qui, selon leurs modifications géniques, contribuent à la croissance tumorale. Il s'agit de cellules dérivant des cellules gliales matures, qui se seraient dé-différenciées au cours de mutations : elles retrouveraient ainsi certaines capacités perdues lors de leur spécialisation, comme la capacité de proliférer. Selon la seconde théorie, les tumeurs se développent à partir des cellules progénitrices (dites *cellules souches cancéreuses*) ayant subi des mutations pendant leur développement [Paul 17]. Elles auraient donc gardé certaines capacités dont la prolifération. Ces deux théories sont illustrées sur la Fig. 1.2.

Le GBM est une tumeur très hétérogène, variant d'un patient à l'autre et exhibant elle-même une architecture complexe. L'une ou l'autre des théories, ou encore les deux à la fois, pourraient donc s'appliquer selon les patients. En effet, le GBM n'est pas une masse tumorale constituée de cellules identiques se divisant de manière anarchique. Il existe une population de cellules spécifiques, les cellules souches cancéreuses, qui possèdent des capacités de prolifération accrues et montrent une forte résistance aux traitements. Cette fraction de cellules, à elle seule, serait responsable de l'agressivité du GBM [Jovc 13].

1.2.4.4 Symptômes

C'est souvent l'apparition plus ou moins soudaine des symptômes découlant du GBM qui amènent les patients à consulter. Le développement d'un GBM est fréquemment associé à la perte progressive de mémoire, à la dégradation de la personnalité et/ou à un déficit neurologique. Ces symptômes sont notamment causés par ce que l'on appelle l'effet de masse : un œdème se forme autour de la tumeur et augmente la pression intracrânienne, engageant le cerveau sain voisin. Cet effet de masse a aussi pour conséquence d'autres symptômes fréquents du GBM comme les crises épileptiques, la somnolence, les maux de têtes, les troubles de la vision, de la parole ou de la motricité, des nausées et des vomissements. Les symptômes dépendent plutôt de l'endroit du cerveau où la tumeur s'est développée que de la tumeur elle-même et de ses propriétés : il peut arriver qu'une tumeur atteigne une grande taille sans être symptomatique.

Le diagnostic en imagerie est principalement réalisé par IRM : un glioblastome est suspecté lorsque certaines zones du cerveau prennent anormalement le contraste (images T1 avec et sans gadolinium et images T2, voir Fig. 1.5). Si les patients ne peuvent être imagés par IRM, un scan CT avec rehaussement de contraste est utilisé. A l'observation, un glioblastome peut être constitué d'un ou de plusieurs foyers, ou être diffus. La majorité des GBM ne comporte qu'un seul foyer et se développe dans les lobes frontaux, une zone située à l'avant du cerveau, notamment siège du

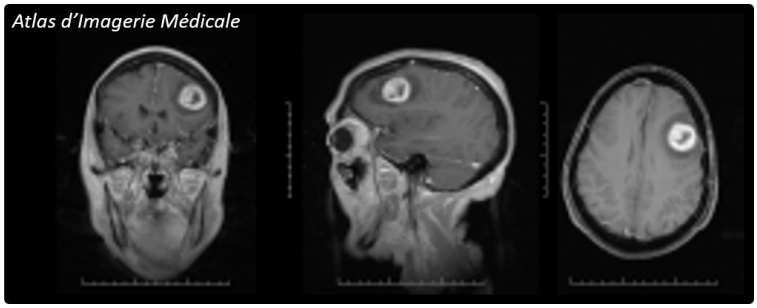


Figure 1.5 – *Image T1 d'un glioblastome après injection de Gadolinium.*

langage et du mouvement.

1.3 Solutions thérapeutiques

Le traitement du glioblastome est composé à la fois d'une thérapie anti-tumorale visant à détruire la tumeur, et de soins réduisant les symptômes pour améliorer la qualité de vie du patient. Il s'agit en général d'anticonvulsivants, contre l'épilepsie, et de corticostéroïdes, permettant de réduire l'œdème et de soulager le patient des conséquences de l'effet de masse.

La thérapie du GBM à proprement parler est abordée dans la suite : malgré les efforts de recherche, celle-ci reste d'une efficacité relative car le GBM récidive dans la plupart des cas.

1.3.1 Le traitement conventionnel du GBM

Il existe principalement trois options thérapeutiques possibles pour le traitement du glioblastome :

- lorsque c'est possible, la tumeur est excisée lors d'une opération chirurgicale dite de "résection",
- la chimiothérapie fait intervenir des médicaments ciblant les cellules à développement rapide,
- la radiothérapie consiste à irradier la tumeur avec des rayons X afin de la détruire.

Une combinaison de ces trois options est habituellement utilisée pour maximiser l'efficacité du traitement. Le traitement standard actuel validé en Europe et aux Etats Unis est connu sous le nom de "protocole de Stupp" (Fig. 1.6). Il est proposé aux patients atteints d'un GBM nouvellement diagnostiqué [Stup 14]. Il consiste d'abord en une résection chirurgicale de la tumeur, quand celle-ci est possible, suivie par une radio-chimiothérapie sur 6 semaines de 30 sessions de 2 Gy et des prises simultanées de Temodal, une molécule autorisée pour le traitement des patients depuis l'année 2000. Six cycles de 5 jours de chimiothérapie suivent cette période de radio-chimiothérapie, espacés de 23 jours [Stup 14].

1.3.2 Limites des options thérapeutiques actuelles

L'objectif des traitements est d'obtenir l'élimination de la totalité des cellules tumorales tout en préservant les tissus sains. Cependant, l'environnement sensible qu'est le tissu cérébral impose certaines limitations à l'utilisation des différents traitements. En effet, il est complexe de faire subir un fort traitement à la tumeur sans en délivrer une part dommageable au tissu cérébral. De surcroît, ce type de tumeur se révèle particulièrement résistant aux traitements.

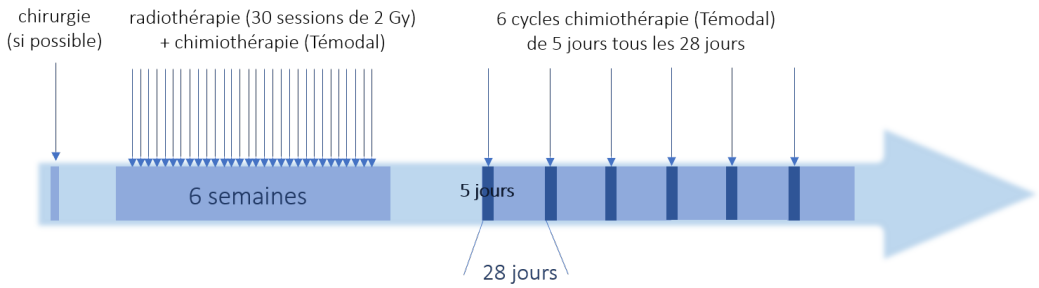


Figure 1.6 – *Chronologie du "Protocole de Stupp", le traitement actuel du GBM.*

Dans les premières sections de ce chapitre, il a été expliqué par des termes simplifiés que la thérapie visait à "détruire" la tumeur ou encore à "tuer" les cellules tumorales. De façon à mieux comprendre ce que chaque option thérapeutique cherche à cibler pour affaiblir la tumeur, il m'avait été agréable de commencer par connaître quelques notions sommaires et je souhaitais donc en faire de même pour ceux qui en seraient au même point : ***comment s'y prend-on pour tuer une cellule ?*** Il existe évidemment de nombreuses solutions possibles et celles qui vont nous intéresser principalement s'attaquent au fonctionnement interne de la cellule. En endommageant l'ADN qui dicte le comportement de la cellule, il est possible de créer un blocage dans le cycle cellulaire. La cellule arrête de se diviser et peut mourir si les dommages sont trop importants. En plus de l'ADN, il est possible d'endommager d'autres "*organes*" vitaux de la cellule, comme les mitochondries qui lui procurent son énergie, ou de léser les membranes, la faisant éclater. Enfin, une dernière solution parmi tant d'autres s'appuie sur la capacité de certaines cellules immunitaires à se débarrasser des corps étrangers ou à détruire les cellules ayant trop muté : certaines études visent donc à "aider" ces cellules immunitaires à reconnaître et détecter les cellules tumorales et ainsi encourager leur destruction.

La chimiothérapie et la radiothérapie s'appuient sur ces principes, bien qu'expliqués ici de manière très schématique, et s'attaquent notamment à l'ADN des cellules. Dans cette section, les principales limites des trois options thérapeutiques seront présentées.

1.3.2.1 La chirurgie

La chirurgie n'est pas toujours possible selon la localisation de la tumeur. De plus, elle n'est efficace que lorsque la tumeur est diagnostiquée dans un état initial, dans lequel les cellules tumorales sont encore groupées et n'ont pas trop infiltré les tissus sains environnants. L'équipe d'Urhie en 2018 [Urhi 18] confirme dans ses études l'existence d'un seuil dans le volume tumoral à ôter pour maximiser les effets bénéfiques de la résection : les meilleurs effets sur la survie sont obtenus en enlevant plus de 98% de la tumeur [Lacr 01].

Cependant, dès un stade avancé, certaines cellules tumorales du GBM quittent la tumeur et pénètrent peu à peu dans le tissu sain. Il reste possible d'exciser la masse tumorale compacte, mais une fois l'opération terminée, les cellules infiltrées dans les zones saines non retirées lors de la chirurgie prolifèrent et forment de nouvelles tumeurs, engendrant des rechutes du cancer. La solution serait donc d'élargir la zone à exciser et de retirer la tumeur et le tissu sain adjacent contenant les cellules qui auraient migré, mais cela est risqué pour le patient car retirer des parties saines du cerveau peut engendrer des séquelles. Pour cela, certains centres proposent une chirurgie éveillée, pendant laquelle les chirurgiens retirent la tumeur et le tissu tout en testant en direct les

fonctions cognitives du patient. Cela permet de retirer un volume plus important tout en évitant les séquelles. Stummer publia en 2006 les résultats d'un essai clinique proposant une autre solution pour aider les chirurgiens à retirer un volume tumoral maximal [Stum 06] : cette solution s'appuie sur l'utilisation d'une molécule, l'acide 5-aminolevulinique, qui mène à l'accumulation intracellulaire de porphyrines naturellement fluorescentes dans les gliomes malins. Les chirurgiens sont donc guidés lors de l'opération par un microscope permettant de rendre les parties cancéreuses fluorescentes en les excitant à la bonne longueur d'onde. Grâce à cette méthode, la zone tumorale visible en IRM a pu être totalement retirée pour 65% des patients, contre seulement 36% des patients avec la méthode actuelle. Cependant, si ces avancées contribuent à améliorer la survie des patients, elles ne permettent toujours pas d'atteindre les cellules tumorales plus profondément infiltrées.

1.3.2.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à inhiber la prolifération des cellules tumorales en endommageant certaines parties de l'ADN : cela stoppe la division et peut entraîner la mort cellulaire. Les composés de chimiothérapie manquent cependant de spécificité et ne permettent pas de cibler uniquement les cellules tumorales : toutes les cellules à forte prolifération sont aussi atteintes par le traitement. La chimiothérapie du glioblastome consiste, depuis les études de Stupp [Stup 14], en des prises orales de Témodal (Témozolomide). Ce médicament a la particularité de subir une hydrolyse à pH physiologique : un des produits de cette hydrolyse est un composé de faible durée de vie qui provoque l'inhibition de la réplication de l'ADN et l'arrêt de la division cellulaire.

Néanmoins, de nombreux gliomes se révèlent très résistants à la chimiothérapie, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le Témodal perd en efficacité à cause d'interactions indésirables avec d'autres composés pris par le patient (*e.g.* les antiépileptiques), pourtant nécessaires eux aussi. De plus, les tumeurs cérébrales ont une grande résistance intrinsèque à la chimiothérapie : une des raisons principales est la sur-expression de l'enzyme MGMT par les cellules de glioblastome. L'enzyme MGMT est une enzyme de réparation de l'ADN qui répare les dommages du Témodal et diminue son effet [Lee 16]. Certaines études couplent donc l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes MGMT (ou inhibiteurs d'autres enzymes de réparation) avec l'utilisation du Témodal pour diminuer la résistance des cellules tumorales.

Enfin, la chimiothérapie des tumeurs cérébrales doit faire face à un obstacle propre au cerveau, la ***Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)***. Cette barrière protectrice sépare le cerveau de la circulation sanguine de façon à filtrer sélectivement les molécules pouvant y pénétrer. Elle est formée par les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins : celles-ci sont très jointives au niveau du cerveau et rendent la paroi des vaisseaux imperméable. Ainsi, la BHE empêche de nombreux agents potentiellement dangereux d'entrer dans le cerveau. Elle empêche cependant aussi une infiltration suffisante des médicaments dans les tumeurs cérébrales. L'utilisation de corticoïdes par le patient diminue encore cette perméabilité. Il reste possible d'ouvrir cette barrière, *via* des composés chimiques comme le Mannitol ou la Bradykinine, ou grâce à l'utilisation d'ultrasons, mais cette solution peut avoir des conséquences non maîtrisées : les cellules tumorales peuvent notamment passer plus facilement dans le sang et métastaser. De façon à contourner l'obstacle de la BHE, l'équipe de Brem *et al.* utilise des disques de polymères dans lesquels un médicament, la carmustine, est incorporée. Ces disques sont implantés à la place de la tumeur juste après la résection chirurgicale : les médicaments sont donc délivrés de façon locale et continue et la toxicité aux autres organes est ainsi évitée [Brem 95]. Cette méthode permit d'augmenter de 50% la survie à 6 mois lors d'essais cliniques et les disques sont maintenant commercialisés sous le nom de *Gliadel Wafers* [Perr 07].

1.3.2.3 La radiothérapie

La radiothérapie consiste à irradier la tumeur par des rayons X de façon à endommager les cellules cancéreuses pour entraîner leur mort. La première radiothérapie de l'histoire date de 1896, un an après l'obtention du prix Nobel de physique pour la découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen. L'initiative fut prise par un médecin français, Victor Despeignes, qui traita cette année-là un patient atteint d'un cancer de l'estomac en utilisant des rayons X. Aujourd'hui, la radiothérapie est, avec la chirurgie, le traitement le plus fréquent des cancers et peut entraîner une rémission nette à elle seule. Elle est utilisée pour traiter plus des 2/3 des patients atteints de cancer [Moha 17].

Walker fut le premier à prouver l'intérêt de la radiothérapie, couplée ou non à de la chimiothérapie, dans le cadre du glioblastome. Lors d'une étude clinique publiée en 1978 (Fig. 1.7), la survie moyenne, alors de 14 semaines, fut augmentée à 35 semaines grâce à la radiothérapie [Walk 78]. Toutefois, selon les résultats alors publiés, l'association de la radiothérapie et de la chimiothérapie semblait avoir un effet sur le plus long terme mais n'avait pas permis de changer de façon significative la survie moyenne par rapport à la radiothérapie seule.

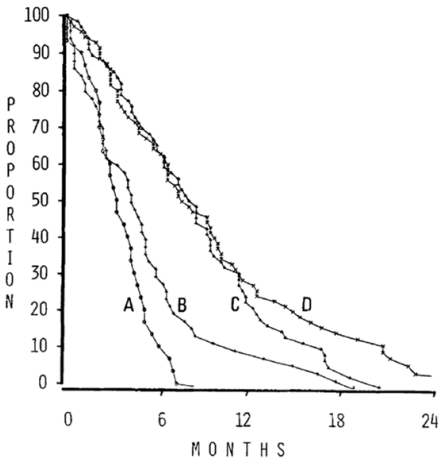


Figure 1.7 – *Courbes de survie des patients ayant reçu : A) les meilleurs soins conventionnels possibles mais ni radiothérapie, ni chimiothérapie, B) BCNU (chimiothérapie), C) radiothérapie, ou D) BCNU et radiothérapie [Walk 78].*

La radiothérapie est limitée par son manque de ciblage des cellules tumorales. En effet, lors du traitement, un faisceau de rayons X dépose de l'énergie dans les cellules qu'il traverse, endommageant l'ADN et bloquant la prolifération cellulaire. Pour atteindre la tumeur, ce faisceau traverse nécessairement des tissus sains, qui subissent des dégâts tout comme les cellules tumorales. Même si les cellules saines sont plus efficaces que les cellules cancéreuses pour réparer ces dommages, et souffrent donc moins du traitement que les cellules tumorales, cela peut mener à de graves complications si la dose délivrée est trop importante. La figure 1.8 schématise bien ce compromis à trouver entre le contrôle du volume tumoral désiré et les dommages infligés aux tissus sains qui en résultent. En A, les tissus sains ne subissent aucun dégât, mais seulement une petite partie de la tumeur est détruite par la radiothérapie. A l'inverse, en C, nous observons que la dose requise pour détruire la majeure partie de la tumeur engendre aussi d'importants dommages au tissu cérébral sain. Aujourd'hui, la limite pratique est fixée à une dose totale de 60 Gy, fractionnée en 30 sessions de 2 Gy. L'utilisation de l'hadronthérapie par exemple permet de minimiser cet effet de dépôt de dose dans les tissus sains : nous aborderons cette méthode dans la suite du chapitre.

Le protocole actuel de traitement du GBM combine les trois options thérapeutiques : résection

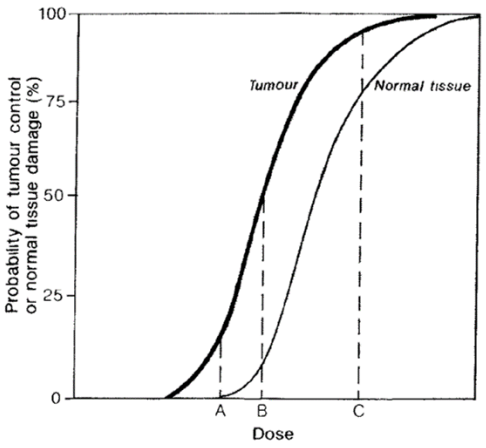


Figure 1.8 – *Relation entre la dose délivrée et les conséquences de la radiothérapie. Il existe un équilibre à trouver entre le contrôle tumoral et les complications suite aux dommages au tissu sain [With 92].*

Chirurgie	Chimiothérapie	Radiothérapie
• localisation de la tumeur	• mécanismes de réparation de l'ADN	• tolérance du tissu sain
• infiltration cellulaire	• Barrière Hémato-Encéphalique	• radiorésistance des cellules tumorales
	• compatibilité avec les autres médicaments	

Table 1.2 – *Tableau résumant les principales limites des traitements actuels utilisés pour le Protocole de Stupp.*

chirurgicale, chimiothérapie et radiothérapie. L'application de ces options thérapeutiques au traitement du GBM est limitée par plusieurs paramètres, notamment la présence de barrières biologiques, la difficulté de l'accès à la tumeur ou encore la fragilité du tissu sain environnant (Fig. 1.2). La survie médiane sans traitement est de trois mois après diagnostic. Le traitement permet d'augmenter la survie médiane jusqu'à approximativement 14 mois après diagnostic [Stup 15]. Malgré ce protocole de traitement, seulement 5% des patients atteints de GBM vivent plus de 5 ans après diagnostic [Gall 15].

1.3.3 Pistes thérapeutiques actuelles : diverses stratégies de ciblage

Les efforts de recherche s'étendent aujourd'hui sur des pistes thérapeutiques variées pour améliorer le traitement du GBM. Dans cette section, différentes solutions seront présentées. Le but n'est pas de donner une liste exhaustive des options actuelles, mais plutôt d'illustrer comment les différentes particularités du glioblastome sont ciblées. Avec l'avancée des connaissances sur ce type de cancer et la compréhension accrue de ses modes de résistance, de nouveaux angles d'attaque sont révélés. Bien que ces autres pistes ne soient pas au cœur de mon projet de recherche, il m'était important de leur consacrer une courte section. D'une part, l'étude de ces nouveaux résultats témoigne de ce qu'il est possible et réalisable de faire cliniquement, et d'autre part, cela permet de connaître les obstacles rencontrés par les autres stratégies qui peuvent tout aussi bien s'appliquer à notre travail. Enfin, en gardant du recul sur ces nouvelles technologies, il peut par la suite être intéressant de coupler deux traitements dont l'un permet de pallier les difficultés rencontrées par l'autre.

Comme il a été vu précédemment, le GBM est particulièrement résistant aux traitements grâce

à certaines de ses propriétés : les cellules tumorales ont des capacités anormales de prolifération, échappent aux processus de mort cellulaire programmée et sont capables d'envahir les tissus sains environnants. La tumeur construit son propre micro-environnement où elle inhibe la réponse immunitaire qui pourrait la détruire et commande la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour s'approvisionner en oxygène et en nutriments. Les techniques présentées à la suite ciblent ces processus de développement et/ou de résistance de la tumeur (Fig. 1.9).

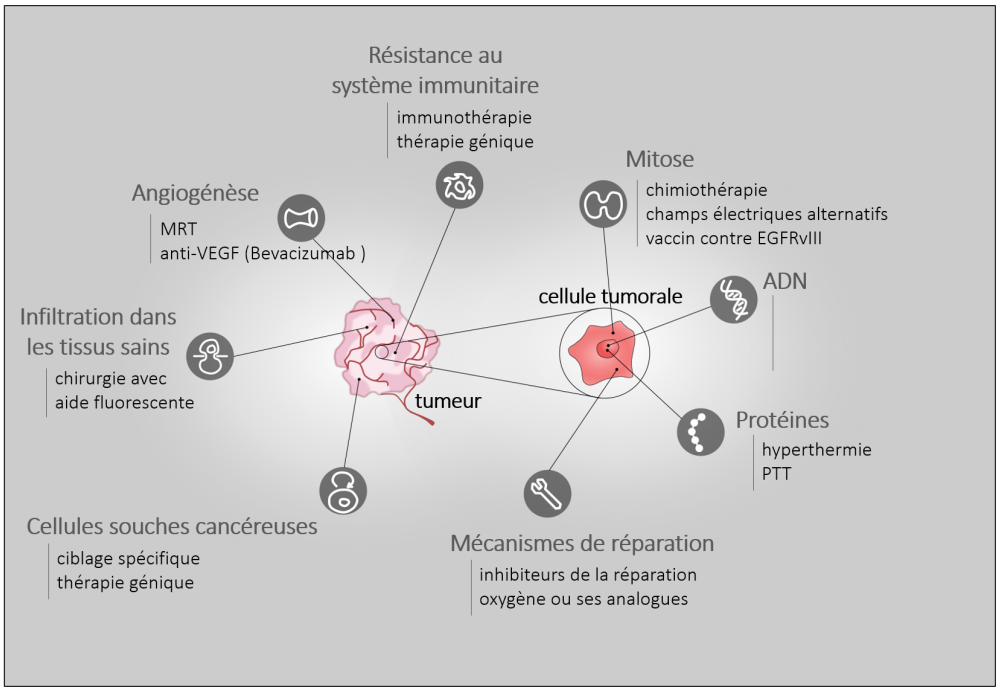


Figure 1.9 – *Schéma de synthèse : quelques cibles et processus de résistance du GBM ainsi que des exemples de thérapies associées.*

1.3.3.1 S'attaquer aux cellules les plus résistantes : les cellules souches cancéreuses

Toutes les cellules tumorales ne sont pas identiques et il existe une population de cellules tumorales ayant des propriétés semblables à celles des cellules souches. Ces cellules, appelées cellules souches cancéreuses, seraient particulièrement résistantes aux radio- et chimio-thérapies grâce à leurs capacités de réparation de l'ADN accrues et seraient responsables de la survie de la tumeur malgré les traitements agressifs. Parmi les facteurs en cause des rechutes des GBM, nombreux sont ceux qui seraient liés à la présence de ces cellules souches cancéreuses [Schm 16]. En effet, il suffirait de 100 de ces cellules implantées *in vivo* dans des modèles précliniques pour déclencher le développement d'un GBM [Bao 06].

L'isolation de ces cellules souches, porteuses du marqueur CD133+, a permis d'approfondir les études cherchant à comprendre leur origine et leur fonctionnement. Les cellules souches cancéreuses ont des propriétés communes avec les cellules souches neurales, comme la prolifération et l'aptitude à se différencier en plusieurs types de cellules spécifiques. Comme nous l'avions abordé dans la section 1.2.4.3, leur origine exacte n'est pas déterminée : elles pourraient résulter de cellules neurales peu différenciées ayant muté, ou de cellules différenciées qui récupèreraient des propriétés qu'elles

auraient perdu. Bao *et al.* ont prouvé que certains astrocytes pouvaient recouvrer les propriétés des cellules souches cancéreuses en se dé-différenciant lors de mutations *in vitro* [Bao 06]. Ces astrocytes mutés synthétisent en grande quantité l'enzyme de réparation MGMT et sont résistantes au Témodal.

Dans les prochaines années, les cellules souches cancéreuses constitueront une des problématiques centrales pour le développement de médicaments contre le glioblastome. Des méthodes variées et prometteuses pour les détruire ou changer leur comportement sont employées, qu'il s'agisse de stratégies de ciblage diverses, de composés empêchant le fonctionnement des enzymes de réparation, d'immunothérapie (c'est-à-dire de stimulation des défenses immunitaires du patient contre ces cellules spécifiques, par exemple en aidant les cellules immunitaires à reconnaître les cellules souches cancéreuses) ou de thérapie génique (où les gènes mutés défectueux des cellules souches cancéreuses seraient compensés par l'injection d'autres gènes permettant de rééquilibrer la situation) [Adam 09].

1.3.3.2 Cibler les cellules à prolifération rapide autrement que par chimiothérapie

Nous l'avons vu, la chimiothérapie permet de stopper et détruire les cellules à prolifération rapide, mais son manque de ciblage des cellules tumorales impacte aussi les autres cellules à forte capacité de division du corps humain. Une autre manière de bloquer les cellules à prolifération rapide consiste à délivrer des champs électriques alternatifs au cerveau : ces champs perturberaient les cellules dans leur division en empêchant le fonctionnement normal des protéines nécessaires à la mitose, et ainsi ralentirait voire arrêterait la division cellulaire.

Cette technique est locale et peu invasive : le patient porte une sorte de bonnet, constitué de disques en céramiques posés sur son crâne rasé et connectés à l'appareil qui délivre des champs électriques alternatifs de faible intensité entre 100 et 300 kHz. L'appareil doit être porté au moins 18h par jour pour observer un bénéfice thérapeutique. Les ondes se propagent uniquement dans le cerveau, ce qui est intéressant car la plus grande partie des cellules cérébrales ne se divise pas et ne seraient donc pas affectées par la thérapie. En n'agissant que sur les cellules en division du cerveau, c'est-à-dire en grande partie les cellules tumorales, de nombreux effets secondaires de la chimiothérapie seraient évités. Cette méthode a été portée par Stupp *et al.* en essai clinique [Stup 15] entre 2009 et 2014. Depuis, cette thérapie a été approuvée en Europe et aux Etats-Unis bien que son efficacité réelle reste controversée. L'appareil, appelé Optune, est vendu par la société Novocure.

1.3.3.3 Utiliser d'autres rayonnements que les rayonnements ionisants de la radiothérapie conventionnelle

La radiothérapie est notamment limitée par le fait que les rayons X se propagent à travers tout le cerveau, et donc déposent aussi leur énergie dans les tissus sains sur leur trajet. Une idée serait alors d'utiliser un autre type de rayonnement, moins nocif pour les tissus sains et capable de créer des dommages dans la tumeur. Au contraire des rayons X utilisés en radiothérapie qui "traversent" le cerveau, la lumière visible et infra-rouge est rapidement absorbée par les tissus et ne pénètre pas en profondeur. Lorsqu'ils sont amenés à se propager dans l'eau, les infra-rouges lointains délivrent toute leur énergie dans les premiers 200 µm, et les proches infrarouges sont totalement absorbés après quelques millimètres de propagation. Ainsi, l'énergie est délivrée localement sans impacter le tissu sain adjacent.

Cependant, une question se pose alors : si ces types de rayonnement sont absorbés après quelques

millimètres de propagation, comment est-il possible d'"irradier" la tumeur depuis l'extérieur du crâne du patient ? La solution la plus couramment adoptée consiste à amener le faisceau directement dans la tumeur en le guidant avec une ou plusieurs fibres optiques. Une fois arrivée à l'extrémité de la fibre optique, la lumière infra-rouge se propage dans le milieu tumoral et est alors rapidement absorbée.

La ***thérapie photodynamique*** (PDT, de *PhotoDynamic Therapy*) utilise le plus souvent le rayonnement infrarouge. Cette technique est fondée sur l'utilisation de substances chimiques dites "photosensibilisantes", qui deviennent toxiques une fois exposées à la lumière. Pour fonctionner, la PDT nécessite trois éléments : une source de lumière, un photosensibilisant et de l'oxygène, présent naturellement dans les cellules. Lorsque le photosensibilisant se retrouve dans un état excité par la source de lumière, il cherche à revenir dans un état plus stable et transfère pour cela son énergie au milieu environnant. Ce dépôt d'énergie conduit notamment à la production d'oxygène dans son état singulet, très toxique pour les cellules [Quir 15] (Fig. 1.10).

Les cellules tumorales de GBM sont capables d'accumuler certains composés en grande quantité, ce qui constitue un argument supplémentaire pour l'utilisation de ce type de traitement : en effet, une concentration importante de photosensibilisants à l'intérieur des cellules rend la thérapie bien plus efficace. Plusieurs équipes mènent actuellement des essais cliniques de cette méthode, certains étant portés jusqu'à la Phase III [Quir 15], mais les résultats, bien qu'encourageants par rapport aux contrôles, sont souvent encore incomplets pour le moment [Elja 10].

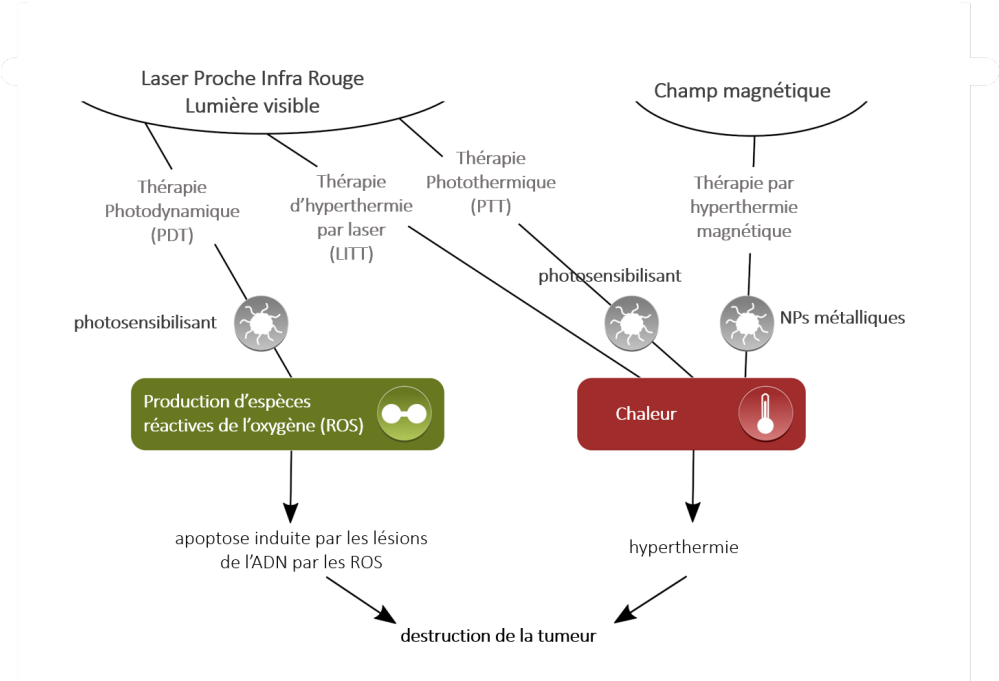


Figure 1.10 – *Techniques thérapeutiques fondées sur l'utilisation d'autres sources énergétiques que les rayons X (figure réalisée d'après [Wang 15, Son 16]).*

La PDT est intéressante en de nombreux points mais la nécessité de la présence de l'oxygène pour observer un effet thérapeutique la rend moins efficace dans les zones en hypoxie de la tumeur, souvent les plus difficiles à traiter. L'***hypoxie***, c'est-à-dire le manque en oxygène, apparaît lorsque l'approvisionnement par les vaisseaux sanguins n'est plus suffisant pour alimenter une zone de la

tumeur. A force de divisions, les cellules forment une masse compacte et les cellules restées au centre de la masse se retrouvent donc de plus en plus éloignées des vaisseaux environnants. On estime qu'une cellule est en hypoxie chronique lorsqu'elle est éloignée de plus de 70 à 100 µm d'un vaisseau sanguin [Hara 11]. Cette zone se retrouve souvent en hypoxie, jusqu'à ce qu'elle soit vascularisée par la suite grâce aux néovaisseaux créés par la tumeur.

1.3.3.4 Augmenter localement la température pour détruire les tissus tumoraux

Une autre thérapie, dérivée de la PDT, fonctionne aussi avec une source de lumière mais les dégâts aux cellules sont réalisés cette fois par la transmission de l'énergie sous forme de chaleur. L'augmentation locale de température (jusqu'à 50 degrés environ grâce aux méthodes thérapeutiques actuelles) mène à la dénaturation des protéines ainsi qu'à leur agrégation et conduit à la mort cellulaire. Cette méthode permet de s'affranchir de la nécessité d'une bonne oxygénation du tissu pour observer l'effet bénéfique du traitement. Cette thérapie s'appelle la ***thérapie photothermale*** (en anglais, *PhotoThermal Therapy*, PTT) et un essai clinique avec 4 patients a été réalisé dans l'équipe de Carpentier entre 2007 et 2010. Comme dit précédemment, à l'inverse des rayons X de radiothérapie, la lumière est absorbée en moins de quelques millimètres. Il faut donc trouver un moyen de lui faire traverser le crâne et le cerveau sain jusqu'à la tumeur. Pour délivrer le faisceau localement et de la façon la moins invasive possible, une ou plusieurs fibres optiques ont été insérées jusque dans la tumeur par une procédure stéréotaxique [4] réalisée sous anesthésie locale. Toute l'opération a pu être guidée par IRM. L'équipe n'a cependant pas observé de résultats aussi significatifs que prévu selon la littérature et conclut que cette méthode, bien que peu invasive et sans trop d'effets secondaires, n'est pas la plus optimale pour le traitement du GBM. Elle ne serait indiquée que comme "dernier recours" permettant de gagner quelques semaines de survie avec un jour de thérapie additionnel. Cependant, son application à d'autres types de gliomes semble adaptée.

En parallèle, d'autres équipes travaillent sur une combinaison de la PDT et de la PTT pour coupler les deux effets thérapeutiques. Cette méthode fait intervenir un photosensibilisant (*e.g.* des nanotubes de carbone [Son 16] ou des nanocristaux [Wang 15]) qui absorbe l'énergie de la lumière et la restitue soit sous forme de chaleur (PTT), soit en créant des radicaux libres qui vont endommager l'ADN (PDT). Le choix de ce photosensibilisant est critique, car il est difficile de trouver des composés efficaces et non toxiques. Bien que les résultats *in vitro* et *in vivo* soient encourageants, seules les études portées à l'essai clinique permettront de comparer ces méthodes aux autres techniques employées.

L'énergie nécessaire à l'augmentation locale de la température peut être apportée autrement que par la lumière. C'est le cas de la thérapie par ***hyperthermie magnétique***, qui repose sur l'utilisation d'un composé magnétique accumulé ou injecté dans la tumeur. Lorsqu'il est soumis à un champ magnétique alternatif, ce composé emmagasine de l'énergie et la restitue sous forme de chaleur par pertes hystérésis. De cette façon, les zones contenant le composé subissent une augmentation de température ciblée. Un essai clinique a déjà été réalisé en employant cette méthode [Mahm 18] et un composé, NanoTherm, a été approuvé récemment pour le traitement du GBM en combinaison avec la radiothérapie.

4. La stéréotaxie est une méthode chirurgicale permettant au chirurgien d'atteindre très précisément des zones du cerveau. Grâce à l'imagerie médicale, les zones cibles sont repérées dans un espace de référence, puis le crâne du patient est fixé dans un cadre mécanique qui permet de guider le chirurgien jusqu'aux zones en suivant leurs coordonnées.

Il est intéressant de noter que toutes les méthodes énoncées (PDT, PTT, PTT couplée à la PDT, hyperthermie magnétique) reposent sur l'utilisation d'un composé qui doit être présent dans la tumeur. Toutes montrent des résultats encourageants *in vitro* et *in vivo*, même s'ils sont parfois controversés, mais toutes rencontrent le même problème : ***comment répartir, de façon homogène et spécifique, le composé dans la tumeur cérébrale ?***

1.3.3.5 Vers une médecine personnalisée

Au fil des recherches pour améliorer le traitement du GBM, les connaissances sur l'origine et le développement de cette tumeur s'enrichissent. De nombreux évènements contribuent en effet à l'évolution de la tumeur, et parmi eux, les mutations géniques et les signaux moléculaires jouent un rôle essentiel. Certaines thérapies se sont donc intéressées non pas à la destruction directe des cellules de glioblastome, mais à la neutralisation des mécanismes sous-jacents à la croissance tumorale.

La tumeur est en constant besoin d'approvisionnement en oxygène et nutriments. Elle acquiert généralement la capacité de créer de nouveaux vaisseaux sanguins pour irriguer sa masse grandissante. Le facteur clé de la genèse des vaisseaux est le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), une molécule sécrétée par les cellules tumorales qui déclenche la formation des vaisseaux sanguins. Pour neutraliser ce processus, un médicament, le bevacizumab, a notamment été développé : il s'agit d'un anti-corps anti VEGF, c'est-à-dire une protéine capable de se lier spécifiquement au VEGF, ce qui l'empêche d'être reconnu par les cellules et inhibe son effet. Ainsi, la tumeur se retrouve appauvrie en vaisseaux et sa croissance se réduit. Après des essais cliniques de phase III [Chin 14], l'utilisation du bevacizumab n'a pas permis d'améliorer la survie des patients, mais a contribué significativement au maintien de la qualité de vie et au prolongement de la durée pendant laquelle l'état se stabilisait après l'opération.

Un autre facteur jouant souvent un rôle clef dans le développement du GBM est le facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*, EGF), une molécule qui amplifie l'activité mitotique -donc la division- des cellules. La cellule reconnaît ces signaux de croissance grâce à ses récepteurs spécifiques à l'EGF qui s'activent quand une molécule d'EGF s'y fixe. Or, les récepteurs de cette molécule, appelés EGFR (R pour *Receptor*) sont beaucoup plus nombreux que la normale dans les cellules de glioblastome : celles-ci reçoivent donc une stimulation de division cellulaire accrue. Différentes tentatives pour inhiber l'effet de l'EGF ont été testées, en utilisant des anti-corps monoclonaux, des petites molécules inhibitrices ou encore des approches immunologiques, mais les résultats sont pour le moment plutôt décevants [West 17]. Un vaccin, le Rindopepimut, a notamment été développé pour stimuler le système immunitaire contre une mutation très fréquente du récepteur à l'EGF dans les GBM, nommée l'EGFRvIII. Le vaccin a été mené jusqu'en phase IV d'essai clinique avant d'être abandonné car il ne permettait finalement pas d'augmenter significativement la survie [Well 17]. Si le ciblage de l'EGFR pour inhiber les signaux de prolifération est aujourd'hui un peu moins étudié, l'attrait thérapeutique pour ce récepteur est par contre toujours d'actualité : il permettrait en effet d'agir comme une "porte d'entrée" pour faire rentrer des médicaments dans les cellules *via* l'internalisation des récepteurs par la cellule [West 17].

Ces exemples permettent d'illustrer le principe des méthodes thérapeutiques fondées sur les mécanismes moléculaires intervenant dans le développement du GBM. Cependant, les cellules tumorales de glioblastome peuvent subir de si nombreuses mutations variées au cours de l'évolution de la maladie qu'il est très peu probable que l'on puisse trouver un seul gène ou une seule molécule qui puisse être ciblé pour tous les patients. Les thérapies futures demanderont donc à s'intéresser

individuellement aux caractéristiques de chaque tumeur et au génotype ou aux protéines qu'elle exprime [Misc 04], afin de délivrer au patient le traitement multimodal le plus adapté possible.

1.3.4 Pistes d'optimisation de la radiothérapie

La radiothérapie actuelle est encore loin d'une radiothérapie idéale dans laquelle la tumeur subirait de forts dommages et les tissus sains seraient totalement épargnés. En réalité, un compromis est à trouver entre le contrôle tumoral désiré et les dégâts pouvant être tolérés par le tissu sain. L'optimisation de la radiothérapie est une constante recherche d'un meilleur ciblage des zones à détruire, tout en épargnant les structures critiques que l'on veut protéger [Rome 05]. Cette section présente différentes pistes actuelles d'optimisation, selon deux principes directeurs : le premier consiste à mieux concentrer le dépôt de dose dans la tumeur, et le second à rendre les cellules tumorales plus sensibles à la radiothérapie.

1.3.4.1 Mieux cibler la tumeur pour épargner les tissus sains

Une façon de n'endommager que la tumeur lors du traitement consiste à placer la source de rayonnement directement à l'emplacement de la tumeur après la résection chirurgicale. Cette méthode, appelée la brachythérapie, a été appliquée au cas des tumeurs cérébrales dès les années 1910. Plus récemment, un procédé, Gliasite, a été approuvé par la FDA (*US Food and Drug Administration*) : il s'agit d'un ballon implanté sur le site de la tumeur au moment de la résection et relié à un cathéter. La dose de radiations est ensuite délivrée localement en injectant une solution d'iode 125 dans le ballon [Chan 05]. L'iode 125 est un isotope radioactif de l'iode, qui se désintègre en émettant des rayons X (raie principale : 27 keV) et gamma (raie principale : 35 keV) de basse énergie ainsi que des électrons. Les électrons résultant de la désintégration déposent leur énergie dans les cellules juxtaposées au ballon. Les rayons X et gamma permettent de délivrer la dose aux tissus proches du ballon et sont rapidement absorbés -à l'inverse des rayons X utilisés en radiothérapie, qui eux, ont une énergie suffisante pour "traverser" le cerveau. Le dépôt d'énergie est donc très local et n'impacte que peu le tissu sain.

L'enthousiasme pour la brachythérapie tend néanmoins à se limiter. En effet, cette méthode, bien que généralement tolérée, peut induire une nécrose des tissus après traitement et n'aurait finalement qu'un gain thérapeutique modéré. La brachythérapie semblait idéale en raison de son impact plutôt faible sur le cerveau sain, cet aspect constituant une limite reconnue de la radiothérapie "usuelle" dans laquelle la tumeur est irradiée depuis l'extérieur du crâne. Cependant, ces dernières années, de nombreux progrès ont été faits dans ce sens afin d'optimiser la radiothérapie, et ce en jouant principalement sur deux paramètres : le fractionnement temporel et une meilleure gestion de la distribution de dose dans l'espace.

Première piste : tirer profit du temps.

Comme dit précédemment, les cellules saines ont de meilleures capacités de réparation que les cellules tumorales. Si l'on délivre une dose de radiothérapie au cerveau et que l'on attend 24h, les cellules saines auront donc réparé plus efficacement les dommages à l'ADN que les cellules tumorales, ce qui induit une différence dans la survie des différents tissus. Estimons qu'après cette première dose, 60% des cellules saines survivent, contre seulement 50% des cellules tumorales [With 92]. En délivrant une nouvelle dose à 24h, à nouveau 60% des cellules saines restantes survivent, ce qui représente 36% des cellules saines de départ, contre 50% des cellules tumorales restantes, c'est-à-dire 25% des cellules tumorales de départ. Au bout de plusieurs fractions de dose délivrées, on

obtient un important différentiel thérapeutique.

Le principe du fractionnement temporel a été initié par Claudius Regaud dans les années 1920 : il observa alors que délivrer plusieurs fractions de dose moyenne plutôt qu'une seule forte dose permettait d'observer le même effet "thérapeutique" (la stérilisation d'un lapin en l'occurrence) tout en diminuant les effets secondaires dans le tissu sain. Henri Coutard reprit cette idée pour traiter un cancer du larynx puis développa un protocole de fractionnement temporel en 1934 qui sert encore de principe fondateur aux protocoles actuels. Pour expliquer les bénéfices du fractionnement temporel, Withers illustre par sa "Règle des 4 R" les différents facteurs intervenant dans le processus :

- Le premier facteur entrant en jeu est la **Réparation des dommages** produits par les radiations. Schématiquement, les cellules saines, plus efficaces, auront le temps de réparer leur ADN entre deux doses délivrées, tandis que les cellules tumorales accumuleront au fur et à mesure du traitement les dommages qu'elles ne parviennent pas à réparer, menant à la mort cellulaire.
- Le deuxième facteur concerne la **Redistribution des cellules dans le cycle cellulaire**. Les cellules en division évoluent selon un cycle cellulaire très contrôlé (voir Fig. 1.11), où elles commencent par une phase de croissance (G1), copient leur ADN de manière à en avoir un exemplaire pour chaque future cellule fille (S), se réarrangent spatialement pour répartir le matériel génétique équitablement lors de la division (G2), puis se divisent lors de la mitose (M). Des "*checkpoints*" de contrôle ont lieu à différents moments du cycle pour éviter la propagation d'éventuelles anomalies génétiques. Pendant les phases G1 et G2, les mécanismes de réparation œuvrent pour réparer les dommages à l'ADN, quitte à bloquer les cellules dans ces phases jusqu'à la fin de la réparation. Un *checkpoint* important a lieu juste avant la duplication de l'ADN en phase S : si les lésions ne sont pas suffisamment réparées, la cellule peut s'arrêter définitivement en G1 et déclencher la mort programmée pour sauvegarder l'homéostasie du tissu. Il est à noter que de nombreuses cellules tumorales ignorent cette mort programmée suite à la mutation de la protéine p53 [5] qui est en partie responsable de cet arrêt : leur contenu génétique devient alors de plus en plus instable jusqu'à la mort cellulaire.

  Pour en revenir à la Redistribution, il est maintenant connu que les cellules sont plus ou moins sensibles à la radiothérapie selon les phases du cycle dans lesquelles elles se trouvent. Elles sont plus résistantes en phase S, et beaucoup plus sensibles en phase G2/M [Pawl 04]. Lorsqu'elles subissent une radiothérapie, les cellules se bloquent en G2, ou en S puis en G1, afin de réparer les lésions. Délivrer une deuxième dose d'irradiation permet alors d'atteindre des cellules qui étaient radioprotégées au moment de la première dose et qui se trouvent maintenant en G2/M où elles sont plus sensibles [With 92].
- La radiothérapie permet de **Réoxygéner** les zones hypoxiques de la tumeur. Les cellules tumorales se trouvant dans un environnement bien oxygéné sont plus sensibles à la radiothérapie que les cellules en hypoxie. Ainsi, la deuxième dose d'irradiation sera plus efficace pour détruire les tissus hypoxiques.
- Enfin, le fractionnement temporel permet aux cellules des tissus sains prolifératifs de se régénérer entre deux doses d'irradiation : on appelle cela la **Repopulation**.

5. La protéine p53 constitue un agent essentiel de contrôle au cours du cycle cellulaire. Elle est capable de se lier à l'ADN pour en vérifier la bonne conformité et de favoriser la réparation des dommages cellulaires. Lorsque l'ADN est endommagé, cette protéine peut commander l'arrêt du cycle cellulaire voire la mort cellulaire pour éviter le développement d'un cancer.

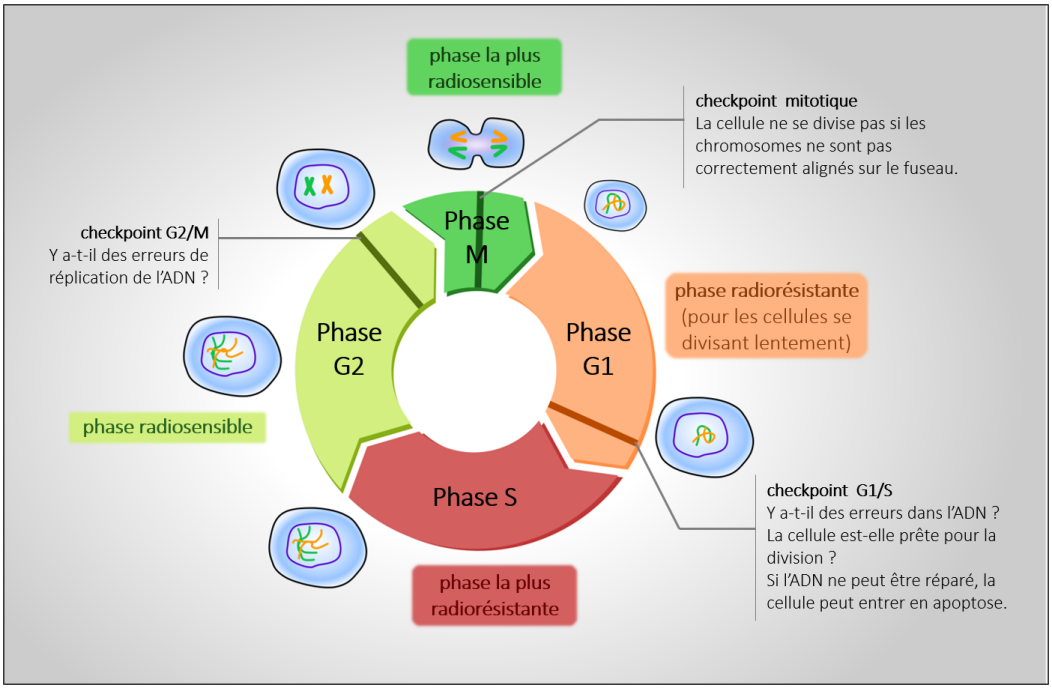


Figure 1.11 – *Selon la phase du cycle cellulaire, la cellule est plus sensible ou plus résistante aux rayons X.*

Deuxième piste : recourir à des optimisations dans l'espace.

La radiothérapie manque de ciblage spatial de la tumeur car le faisceau traverse tout le cerveau, déposant indifféremment l'énergie qui mènera aux dommages cellulaires dans les tissus sains et dans les tissus tumoraux. De nombreux progrès ont été réalisés grâce au fractionnement spatial, donc le principe directeur vise à répartir les dommages au tissu sain, tout en concentrant les effets sur la tumeur. Au lieu d'irradier la tumeur selon un unique axe, la tumeur est irradiée selon plusieurs incidences (comme illustré dans la figure 1.12) : la dose apportée par chaque incidence est donc cumulée dans la tumeur, mais répartie dans les tissus sains. Ces évolutions techniques ont été permises par le développement de générateurs de rayons X beaucoup plus compacts, qui tournent autour du patient et s'arrêtent dans les incidences définies lors du plan de traitement pour délivrer la fraction de dose correspondante.

Le traitement commence d'abord par l'imagerie de la tumeur et de son environnement dans un scanner : grâce à ces images, il est possible de créer un plan de traitement individuel pour chaque patient. La ***3D-CRT*** (*3-Dimensional Conformal RadioTherapy*) permet d'établir un plan de traitement complexe permettant de répartir la dose de manière à ce que les régions de haute dose se situent au niveau des tumeurs, et les régions de faible dose au niveau des tissus sains, tout en épargnant au mieux les organes à risque. Cette avancée permit de traiter par radiothérapie des tumeurs qui étaient auparavant considérées comme trop proches de structures vitales sensibles.

Des améliorations permettent d'affiner encore cette technique : en ***IMRT*** (RadioThérapie par Modulation d'Intensité), la "forme" du faisceau est changée par des lames positionnées en amont du patient, qui modulent le faisceau en fonction du profil de la tumeur à cette incidence [Roel 12, Rome 05] (le principe de fonctionnement est schématisé dans la Fig. 1.13). Cette thérapie est notamment pertinente pour les tumeurs de forme irrégulière et devient de plus en plus employée : les résultats en terme d'homogénéisation du dépôt de dose et de la protection des organes à risque

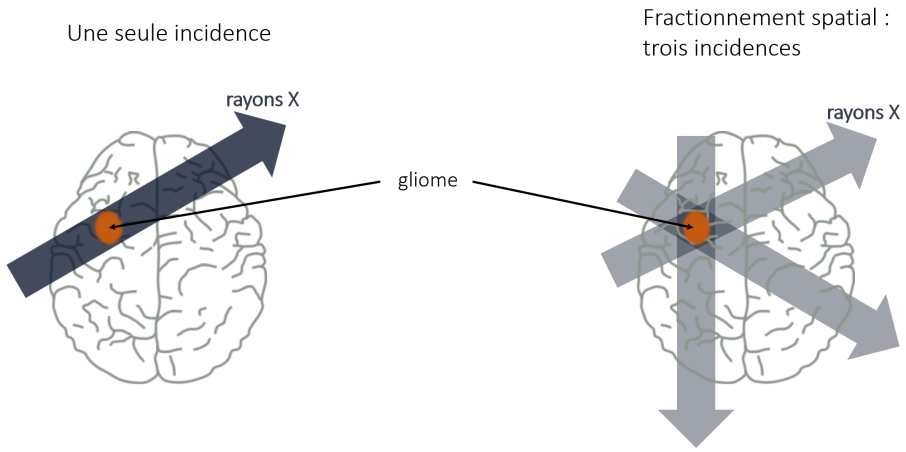


Figure 1.12 – *Schéma illustrant le concept du fractionnement spatial.*

sont similaires à ceux de la 3D-CRT, mais la dose imposée aux tissus sains est plus faible pour l'IMRT [Lore 13].

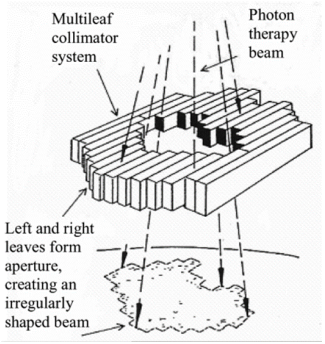


Figure 1.13 – *La radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT) permet d'adapter la forme du faisceau à chaque incidence au profil de la tumeur [Rome 05].*

Les appareils de radiochirurgie fonctionnent selon ce même principe de fractionnement spatial : ils permettent de délivrer une forte dose dans un petit volume défini avec une haute précision. La radiochirurgie est en général utilisée pour remplacer la chirurgie lorsque celle-ci ne peut atteindre la tumeur de manière sûre pour le patient. Elle nécessite un équipement relativement lourd, ce qui limite le nombre d'appareils implantés en France ou dans le monde, mais les indications pour la radiochirurgie se multiplient (épilepsie, tumeurs, maladie de Parkinson, etc). Les appareils utilisés en clinique (*e.g.* Novalis, Trilogy, X-Knife, Synergy, Gamma Knife, CyberKnife) utilisent des rayons X ou des rayons gamma ainsi que différentes technologies de guidage pour déposer précisément la dose dans la tumeur.

Le ***CyberKnife*** fait intervenir des rayons X provenant d'un accélérateur linéaire modifié. Un bras robotisé tourne autour du patient et s'arrête à des angles bien définis par les plans de traitement pour délivrer les doses de radiothérapie qui s'accumulent au niveau de la tumeur. Le CyberKnife est utilisé pour le traitement du GBM nouvellement diagnostiqué [Lipa 08] ou pour les cas de rechute du GBM [Erta 14]. Son intérêt réside aussi dans le fait que son utilisation ne requiert pas une immobilisation aussi stricte et invasive pour le patient qu'avec d'autres méthodes. En effet, un système couplant imagerie médicale et robotique permet de corriger le mouvement du patient lorsqu'il respire par exemple, et de guider le faisceau en fonction de ces mouvements [Erta 14]. Les

résultats prometteurs nécessitent une étude plus approfondie pour pouvoir comparer le CyberKnife aux traitements actuels.

A l'inverse du CyberKnife qui peut être utilisé pour toutes les parties du corps, le ***Gamma Knife*** est réservé à la neurochirurgie (voir Fig. 1.14). Cette technologie fait intervenir des sources de Cobalt 60, placées en couronne autour de la tête du patient, qui délivrent des faisceaux de rayons gamma convergeant sur la tumeur. La tête du patient est immobilisée dans un système de contention (cadre) fixé sous anesthésie locale, pour éviter tout mouvement et irradier précisément la zone dont les coordonnées ont été définies grâce à l'imagerie préliminaire. L'utilisation du Gamma Knife pour le glioblastome a été testée lors de plusieurs études cliniques, notamment pour traiter les cas de rechute [Thum 12]. Cette méthode a permis d'augmenter la durée de vie de 8 à 12 mois en moyenne pour des cas sélectionnés, allant même jusqu'à 7 ans pour un des patients. Ce cas est évidemment isolé et les causes de l'augmentation de la durée de vie ne sont pas toutes identifiées. Bien que l'intérêt thérapeutique du Gamma Knife ait été démontré par plusieurs études, celui-ci ne doit pas être considéré comme un outil à part entière mais comme faisant partie d'un traitement multimodal, utilisé pour traiter des cas de GBM sélectionnés selon des critères encore à approfondir [Fris 16].

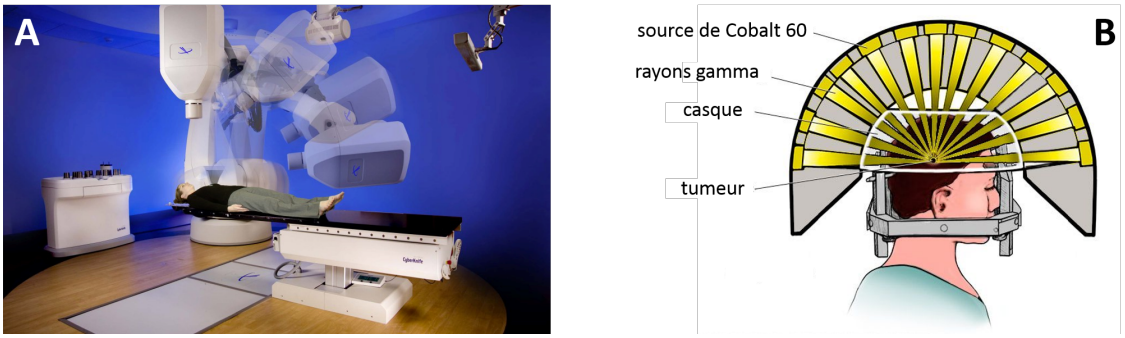


Figure 1.14 – *Principe de fonctionnement du CyberKnife et du Gamma Knife. En A : le CyberKnife effectue des rotations autour du patient pour délivrer les fractions de dose qui s'accumulent dans la tumeur (source : Accuray Inc., OrthoSpineNews). En B : le Gamma Knife est constitué d'une couronne de sources de Cobalt 60 qui délivrent des faisceaux de rayons gamma se focalisant sur la tumeur (source : Mayo Foundation for Medical Education and Research).*

En 1961, Wolfgang Zeman introduit la notion d'effet dose/volume : il découvre que les tissus sains tolèrent des doses bien plus importantes de radiothérapie si celles-ci sont délivrées dans de petits volumes (échelle micrométrique). Cette découverte constitue le fondement de la ***radiothérapie par microfaisceaux (MRT)***, qui consiste à irradier la tumeur avec un faisceau composé lui-même de microfaisceaux d'une dizaine de μm de large espacés tous les 200 μm environ (voir Fig. 1.15). Cette méthode permet d'augmenter la dose pouvant être déposée dans ces microfaisceaux : alors que les faisceaux macroscopiques ininterrompus de radiothérapie habituelle ne permettent pas de déposer plus de 2 Gy dans la tumeur par session (limite pour la préservation des tissus sains), les microfaisceaux déposent chacun une dose de 625 Gy sur leur trajet, tout en étant bien tolérés par le tissu sain. De plus, même si ce phénomène n'est pas encore bien compris, la MRT serait capable de détruire préférentiellement les vaisseaux sanguins nouvellement synthétisés [Grif 12, Bouc 12], privant ainsi la tumeur de son apport en oxygène et en nutriments. Après des expériences prometteuses sur des rongeurs et des petits cochons sains, les études sur la MRT visent un futur passage

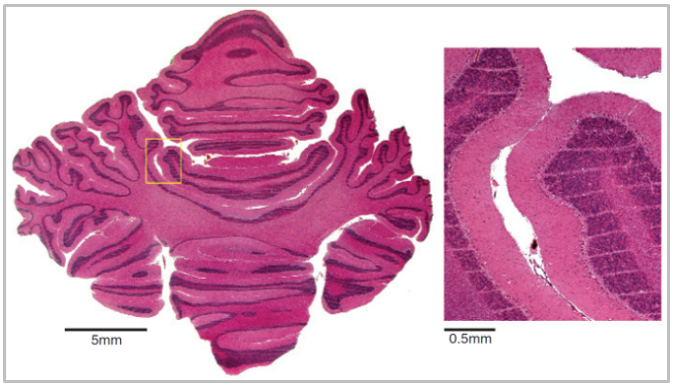


Figure 1.15 – *Coloration d'une coupe de cervelet de porcelet 15 mois après irradiation par MRT (dose pic d'entrée à la peau : 300 Gy) : les rayures blanches horizontales visibles sur la figure de droite correspondent au passage des microfaisceaux, de 27 µm de large et espacés de 210 µm [Lais 07].*

à l'homme lors d'essais cliniques [Grot 15].

Parallèlement à la découverte des rayons X et aux balbutiements de la radiothérapie, le physicien William Henry Bragg découvre en 1903 le comportement particulier des particules alpha [6] lorsqu'elles traversent la matière : celles-ci déposent peu d'énergie sur leur trajet jusqu'à une certaine profondeur à laquelle elles vont céder toute leur énergie restante. Ce pic très étroit de dépôt de l'énergie est appelé *pic de Bragg*.

L'***hadronthérapie*** utilise des faisceaux d'hadrons [7] ou d'ions légers (*e.g.* neutrons, protons, ions carbone) à la place des rayons X en radiothérapie usuelle pour irradier la tumeur. L'hadronthérapie bénéficie de deux avantages par rapport à la radiothérapie classique : d'une part, les particules utilisées déposent la plus grande partie de leur énergie dans un volume restreint au niveau du pic de Bragg, en interagissant peu avec les tissus avant ce pic (voir Fig. 1.16). Si l'on superpose le pic de Bragg avec la tumeur, celle-ci recevra donc une dose maximale. Comme les particules déposent toute leur énergie restante dans le pic de Bragg, le faisceau de particules "s'arrête" dans la tumeur, épargnant les tissus sains en aval. La figure 1.17 illustre bien la différence de dépôt de dose dans les tissus selon les différentes thérapies utilisées (rayons X ou protons). D'autre part, les faisceaux de particule sont, à dose égale, plus efficaces que les rayons X pour détruire les cellules. Nous reviendrons sur ce phénomène dans le chapitre 2.

Cependant, s'il est possible de créer des dispositifs plutôt compacts pour générer des rayons X, il est bien plus complexe d'accélérer des particules pour l'hadronthérapie et de plus gros équipements sont alors requis. C'est pourquoi son développement n'a été rendu possible qu'après l'émergence des accélérateurs de particules dans les années 1920, puis l'ouverture de ces centres aux applications cliniques depuis les années 1950. Depuis, plusieurs centres de protonthérapie (hadronthérapie utilisant des protons accélérés) ont ouvert dans le monde, dont deux en France (Institut Curie à Orsay et Centre Antoine Lacassagne à Nice). L'émergence de l'hadronthérapie aux ions carbone est plus modeste du fait de la complexité technologique nécessaire pour accélérer ces ions. Cependant, des centres totalement réservés au soin de patients commencent à se construire dans le monde, et notamment au Japon.

L'hadronthérapie couplée avec le principe du fractionnement spatial est aujourd'hui proposée comme solution additionnelle pour le traitement du GBM. En essai clinique, les patients reçoivent en général 50 Gy de radiothérapie aux rayons X sur les 60 Gy conventionnels du protocole de Stupp,

6. Les particules alpha sont émises par des noyaux instables de grande masse atomique et sont constituées de deux protons et deux neutrons.

7. Les hadrons sont des particules non élémentaires composées de "quarks".

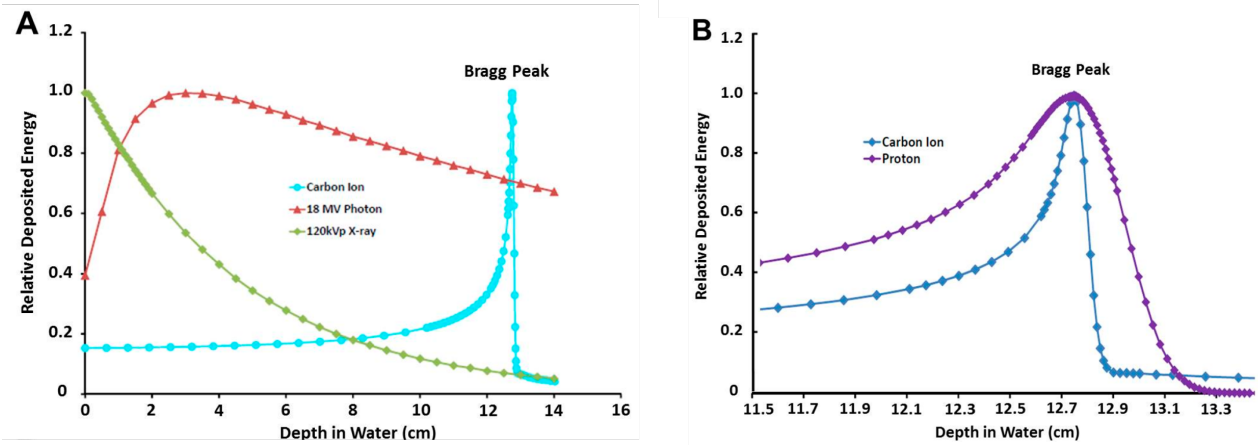


Figure 1.16 – *Les photons déposent leur énergie tout au long de leur trajet dans la matière, tandis que les protons en déposent la majorité dans le pic de Bragg [Moha 17].*

puis une dose équivalente de 10 Gy en protons pour tester l'efficacité de cette thérapie. Selon diverses études, les protons donneraient des résultats similaires aux photons mais diminueraient la toxicité du traitement [Adeb 17]. Lors de leurs études menées entre 2001 et 2012, l'équipe de Mizumoto [Mizu 16] a augmenté la dose équivalente en protons apportée à la tumeur, allant jusqu'à 46.2 Gy (en plus des 50 Gy apportés par les rayons X). Le traitement permit d'améliorer le contrôle tumoral et de diminuer les risques de rechute. Cependant, il s'agissait là d'une étude préliminaire et le protocole optimal reste à définir : la nécrose des tissus irradiés lors de la radiothérapie, apparaissant généralement autour de la tumeur, devient alors une complication récurrente et problématique sur le long terme. De plus, la marge prise lors de l'irradiation était de 0.5 cm autour de la tumeur, ce qui est insuffisant pour le glioblastome qui tend à être très infiltrant. Cette marge devra donc être augmentée pour atteindre une meilleure couverture de la tumeur, mais des études supplémentaires seront nécessaires pour la déterminer. En effet, à ce jour, les caractéristiques de réponse du cerveau sain aux protons de haute énergie sont encore mal connues.

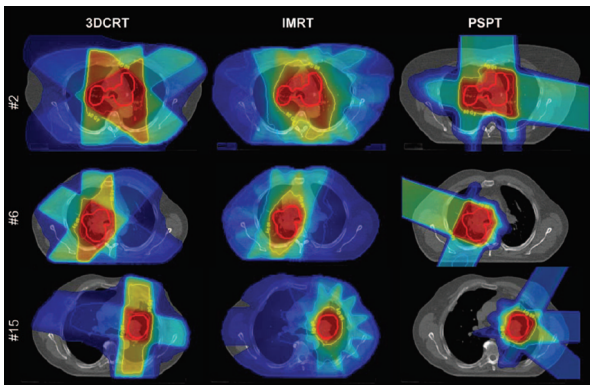


Figure 1.17 – *Comparaison de la distribution de dose de la 3D-CRT, de l'IMRT et de la protonthérapie (PSPT) pour trois cas de traitement. La cible est indiquée en rouge (image tirée de [Roel 12]).*

Concernant la thérapie par ions carbone, un nouvel essai clinique de Phase II du nom de CLEOPATRA a été lancé en 2010. Il permettra de comparer l'efficacité de la protonthérapie et de la thérapie par ions carbone avec les traitements actuels [Comb 13]. Enfin, l'effet dose/volume sur lequel la MRT se fonde est aussi valable avec les protons. L'irradiation de glioblastomes avec des minifaisceaux de protons donne des résultats précliniques très prometteurs, tout en assurant un

gain important de préservation du tissu sain [Prez 17].

Méthode	Faisceau	Spécificité	Application clinique pour le GBM	Remarques
3D-XCRT	rayons X	plan de traitement permet de répartir la dose dans les régions à détruire	utilisé régulièrement	
IMRT	rayons X	modulation du faisceau selon la forme de la tumeur à chaque incidence	utilisé régulièrement	dose délivrée aux tissus sains plus faible qu'avec 3D-XCRT
CyberKnife	rayons X	radiochirurgie : forte dose délivrée à un petit volume	essais cliniques	immobilisation moins invasive qu'avec le GammaKnife
GammaKnife	rayons gamma	radiochirurgie : forte dose délivrée à un petit volume	essais cliniques	réservé à la neurochirurgie
MRT	rayons X	effet dose/volume : irradiation par des microfaisceaux espacés de 200 µm	pas encore en essai clinique; essais sur petits cochons sains encourageants	pour le moment, nécessite un synchrotron
Hadronthérapie	protons/ions carbone	permet de bénéficier du Pic de Bragg : diminue la dose délivrée au tissu sain	essais cliniques	infrastructures chères

Figure 1.18 – *Pistes d'optimisation de la radiothérapie du glioblastome (liste non exhaustive). Table réalisée à partir de l'ensemble des données recueillies pendant l'étude bibliographique.*

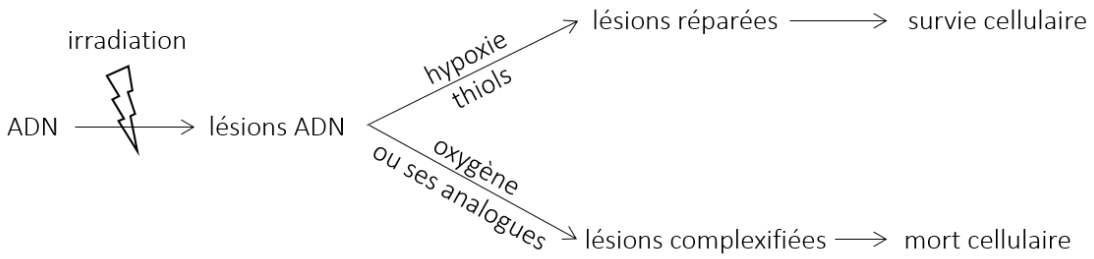
1.3.4.2 Rendre les cellules plus sensibles à la radiothérapie

Les techniques énoncées dans la section précédente s'intéressent à un meilleur ciblage spatial de la tumeur. Une autre piste d'amélioration de la radiothérapie consiste à rendre les cellules tumorales plus sensibles au rayonnement : ainsi, il serait possible de les détruire plus facilement tout en gardant la même dose raisonnable délivrée aux tissus sains.

Ces méthodes font appel à des composés dits "radiosensibilisants". Ils permettent, par exemple, d'augmenter les dommages à l'ADN ou d'inhiber les mécanismes de réparation. En plus d'être capables d'affecter significativement les cellules tumorales, ces composés doivent faire preuve d'une faible toxicité pour les cellules saines, ce qui réduit considérablement les choix possibles. Un des pionniers de la radiosensibilisation, G.E. Adams [Wang 18], classe ces composés en cinq catégories selon leur moyen d'action :

1. L'oxygène ou molécules analogues : lors de l'irradiation, les rayons X induisent la formation de radicaux libres, c'est-à-dire de substances chimiques très réactives, qui vont ensuite causer d'importants dommages, notamment à l'ADN. Cependant, les cellules sont protégées de ces radicaux par des molécules, les thiols, qui sont capables de les détruire. Lorsque l'apport de la cellule en oxygène est convenable, les molécules d'oxygène tendent à se fixer sur les radicaux initialement formés, empêchant leur destruction par les thiols [Rey 17]. La bonne oxygénation des cellules renforce donc l'efficacité de la radiothérapie. Cet effet, connu sous le nom d'"effet oxygène", est résumé ci-dessous (d'après [Wang 18, Curt 16]) :

Les premières tentatives pour augmenter l'oxygénation de la tumeur (placer le patient dans un caisson hyperbare pendant la thérapie, ou l'injection de globules rouges par exemple) donnèrent des résultats aux conclusions encore discutées. Aujourd'hui, la plupart des stratégies reposent sur l'injection de molécules analogues de l'oxygène, capables de se fixer sur les radicaux de la même manière que l'oxygène et d'induire des effets similaires (entre autres, la complexification de la lésion). Certains de ces composés sont aujourd'hui testés cliniquement.



2. Une autre option repose sur l'injection d'**analogues de la thymine**[8] (IudR, BrUDR) qui peuvent s'incorporer dans l'ADN en cours de synthèse : cet ADN modifié n'est alors plus fonctionnel et cause la mort de la cellule.

3. Les radiosensibilisants peuvent aussi **inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN**, empêchant ainsi la réparation des lésions et induisant la mort cellulaire.

4. Certains radiosensibilisants n'agissent pas sur le fonctionnement de la cellule mais, une fois irradiées, se dégradent en formant des **substances cytotoxiques**.

5. Enfin, la dernière piste repose sur la **suppression des substances radioprotectrices** contenues dans les cellules (par exemple, les thiols cités précédemment).

Les outils utilisés pour radiosensibiliser les cellules sont très variés : médicaments, nanotechnologies, micro-ARN[9], macromolécules, composés chimiques sous forme de petites molécules... tous ont leurs avantages et leurs inconvénients. Cependant, la radiosensibilisation tumorale en général se heurte au même problème déjà énoncé précédemment : ***comment faire passer les radiosensibilisants dans la tumeur à travers la BHE, et ce, de façon spécifique sans trop endommager les tissus sains ?*** Cette question sera abordée au cours de cette thèse : un chapitre lui sera consacré dans l'état de l'art, section 3.1, puis ce sujet sera abordé dans la discussion des résultats obtenus section IV.

1.3.4.3 Utiliser des agents pour augmenter la dose délivrée à la tumeur

Nous avons vu qu'une piste d'optimisation de la radiothérapie consistait à rendre les cellules tumorales plus sensibles aux rayons X. Il s'agit donc de les "fragiliser" pour qu'une même dose de radiation détruise plus de cellules. Par exemple, si une dose de 2 Gy détruit 60% des cellules tumorales, la radiosensibilisation pourrait permettre d'en détruire 75% (exemple très schématique). En plus de radiosensibiliser les cellules, il est possible d'augmenter artificiellement des dommages causés par le faisceau lorsqu'il passe dans la tumeur. L'idée n'est alors pas de rendre les cellules plus vulnérables, mais d'amplifier la dose déposée : par exemple, en déposant 2 Gy dans la tumeur, la thérapie permettrait en fait d'en déposer l'équivalent de 3 Gy. Augmenter le dépôt de dose est donc un principe différent de la radiosensibilisation, mais certains agents permettant d'augmenter le dépôt de dose ont aussi des effets radiosensibilisants. C'est pourquoi les deux procédés souffrent parfois d'amalgame.

8. La thymine est, avec l'adénine, la cytosine et la guanine, une des quatre bases de l'ADN. Les bases constituent les "briques élémentaires" de l'ADN qui portent l'information génétique selon un code bien précis, le code génétique.

9. Les ARN messagers sont les supports intermédiaires des gènes qui permettent aux cellules de synthétiser les protéines dont elles ont besoin. Le rôle des micro-ARN consiste à réguler cette synthèse en se fixant sur l'ARN messager : cela pour bloque alors sa traduction et empêche donc la synthèse de la protéine.

La technique qui nous intéressera au cours de ce manuscrit de thèse est la Radiothérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (SSRT). Elle permet, suite à la concentration de composés dans la tumeur, d'augmenter localement le dépôt de dose lors de l'irradiation. La procédure thérapeutique se déroule en deux étapes. Tout d'abord, des composés contenant des atomes lourds ($Z > 30$ environ) sont accumulés préférentiellement dans la tumeur. Ensuite, la tumeur est irradiée par des rayons X de "basse" énergie -en comparaison avec les rayons X utilisés habituellement en thérapie-. A ces énergies d'irradiation, les atomes lourds ont la particularité d'absorber davantage les rayons X que les tissus, augmentant ainsi localement la dose dans les tissus ayant accumulé les composés (*i.e.* la tumeur). Le fonctionnement de la SSRT sera décrit plus en détail dans le chapitre 2. Un premier essai clinique appliqué à la thérapie de métastases cérébrales a eu lieu au synchrotron de Grenoble, en utilisant de l'iode pour augmenter le dépôt de dose.

Ce principe d'amplification des dégâts lors de l'irradiation est aussi utilisé en hadronthérapie, notamment lors d'irradiation avec des neutrons : la thérapie par capture de neutrons (NCT pour *Neutron Capture Therapy*) est une technique peu invasive pour traiter les tumeurs malignes, dont les GBM. Tout comme la SSRT, le protocole de la NCT comporte deux étapes : un isotope non radioactif du bore, le bore 10, est accumulé dans la tumeur et internalisé par les cellules tumorales. Puis la tumeur est irradiée avec des neutrons grâce à un accélérateur spécifique ou à un réacteur nuclaire. Cette technique repose sur le fait que le bore 10 possède une forte propension à capturer les neutrons, bien plus grande que celle des autres éléments constituant le tissu cérébral. Le bore 10 ayant capturé des neutrons est alors excité en bore 11 instable, qui subit alors aussitôt une fission nucléaire. Celle-ci émet alors des particules chargées de haute énergie qui détruisent les cellules tumorales ayant internalisé de grandes quantités de bore 10. D'autres isotopes non radioactifs sont étudiés pour la NCT, dont le gadolinium, mais tous les essais cliniques à ce jour ont été réalisés avec le bore 10 (*Boron Neutron Capture Therapy*). La BNCT est actuellement en essai clinique de Phase II pour le traitement du glioblastome [Skol 10].

1.4 Le Chapitre 1 en quelques mots

Malgré le développement de nouveaux traitements, la durée de vie moyenne des patients atteints du glioblastome multiforme (GBM), la tumeur la plus agressive du cerveau, n'a augmenté que de quelques mois depuis ces 25 dernières années. Le traitement actuel, appelé Protocole de Stupp, associe la résection chirurgicale de la tumeur, lorsqu'elle est possible, la chimiothérapie et la radiothérapie.

Cependant, la combinaison de ces trois options thérapeutiques ne suffit pas pour détruire la tumeur. Le traitement n'est donc pas curatif mais seulement palliatif, car il se heurte à de nombreuses limites. En plus de la forte résistance intrinsèque des cellules tumorales aux traitements, le glioblastome bénéficie de la protection de la barrière hémato-encéphalique qui filtre très sélectivement les substances passant du sang vers le cerveau et empêche ainsi une infiltration suffisante des médicaments dans les tumeurs cérébrales. La radiothérapie standard n'offre pas non plus de solution appropriée, car la dose requise pour stériliser ces cellules tumorales très résistantes entraîne aussi la nécrose du tissu sain se trouvant sur la trajectoire du faisceau de rayons X. Optimiser la radiothérapie reviendrait donc à trouver un moyen pour "concentrer" l'effet de la radiothérapie sur la tumeur tout en épargnant au maximum le tissu sain.

Les avancées en radiothérapie ont permis d'améliorer sur quelques points la spécificité

du traitement, notamment grâce au fractionnement temporel et spatial, ou à l'utilisation de radiosensibilisants qui fragilisent les cellules tumorales exposées aux rayons X. Ces composés ont des cibles cellulaires et des fonctions très variées, mais leur utilisation se confronte toujours au même obstacle : comment répartir ces composés dans la tumeur, et ce de manière spécifique ?

Chapitre 2

Potentiel de l'utilisation des NPs pour améliorer la radiothérapie

Sommaire

2.1 Interactions entre les photons et la matière 48
2.1.1 Interaction photons/matière : du photon à l'électron 48
2.1.2 Généralités et définitions 51
2.1.3 Interactions entre les électrons émis et la matière 52
2.1.4 Dommages biologiques 53
2.1.5 Mort cellulaire 56
2.1.6 En résumé : du photon à la mort cellulaire 58
2.2 Des éléments à haut Z pour augmenter le dépôt de dose dans la tumeur 58
2.2.1 La motivation : création d'un différentiel entre la tumeur et le tissu sain . . 58
2.2.2 Origine et évolution de la SSRT appliquée à l'augmentation de dose par éléments lourds 61
2.2.3 Etat de l'art : les NPs pour augmenter la dose à la tumeur 66
2.2.4 Utilisation de NPs de fer en radiothérapie 68
2.2.5 Résumé : effets physiques, chimiques et biologiques de l'irradiation d'une tumeur ayant accumulé des NPs de fer 69
2.3 Le Chapitre 2 en quelques mots 70

La radiothérapie est limitée par son manque de ciblage de la tumeur car les rayons X sont absorbés de la même manière dans les tissus sains et dans la tumeur. Or, aux énergies utilisées pour l'imagerie aux rayons X, les éléments lourds absorbent davantage les rayons X que les tissus biologiques. Il serait donc possible, en accumulant des éléments lourds dans la tumeur et en travaillant dans ces gammes d'énergie, de déposer préférentiellement l'énergie des rayons X dans la tumeur. Ce chapitre décrit les principaux phénomènes physiques et biologiques connus intervenant dans cette stratégie, puis situe le cadre de l'étude de cette thèse en décrivant les avancées dans la recherche sur l'augmentation de dépôt de dose par éléments lourds.

2.1 Interactions entre les photons et la matière

Des radiations sont qualifiées d'"ionisantes" lorsqu'elles apportent assez d'énergie pour ioniser des molécules organiques, c'est-à-dire pour transformer les atomes de la matière traversée en ions. L'ionisation des atomes ou des molécules entraîne une instabilité dans le milieu souvent à l'origine de réactions chimiques. Les conséquences biologiques peuvent être immédiates ou apparaître sur un plus long terme.

Les interactions des rayons X avec la matière provoquent en général une déposition d'énergie dans le milieu traversé par le rayonnement. L'absorption de l'énergie du photon par le milieu qu'il traverse comprend deux étapes : dans un premier temps, le photon transfère son énergie à un ou plusieurs électrons, appelés électrons secondaires. Puis, dans un second temps, les électrons délivrent leur énergie au milieu. Ces processus physiques sont très rapides, de l'ordre de la femtoseconde.

2.1.1 Interaction photons/matière : du photon à l'électron

Les quatre types d'interaction photons/matière les plus pertinents dans les gammes d'énergie utilisées en médecine (100 - 250 keV pour l'imagerie médicale, plusieurs MeV pour la radiothérapie) sont la diffusion Rayleigh, la diffusion Compton, l'effet photoélectrique et la production de paires.

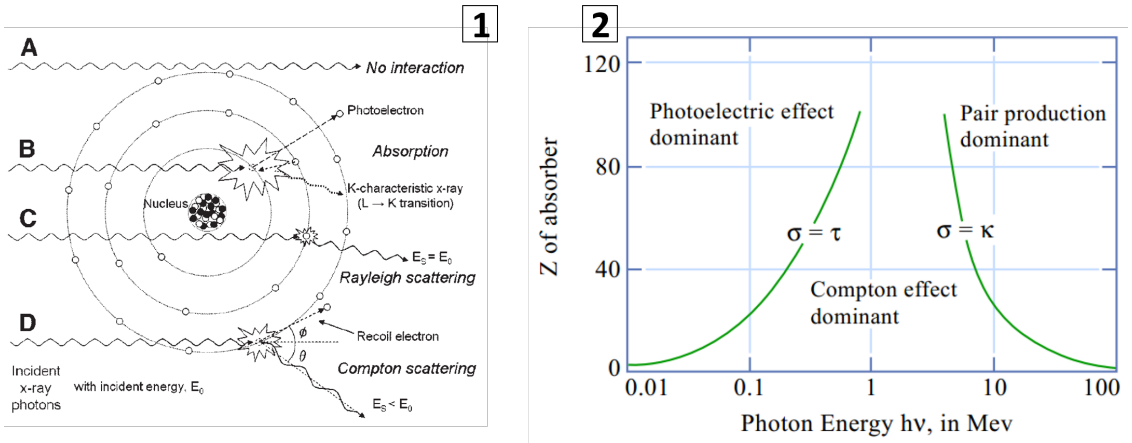


Figure 2.1 – *(1) Schéma résumé des interactions lumière-matière : (A) pas d'interaction, (B) effet photoélectrique, (C) diffusion Rayleigh, (D) diffusion Compton. Figure tirée de [Seib 05]. (2) Domaines de prédominance des effets Compton, photoélectrique et production de paires en fonction de l'énergie des photons X et du numéro atomique des atomes rencontrés. Figure tirée de [Abde 10].*

Lorsqu'il traverse un milieu, le photon incident peut être dévié de sa trajectoire par un électron sans toutefois perdre d'énergie (cf 2.1 C). Cette interaction élastique est appelée **diffusion Rayleigh**. La plupart du temps, la trajectoire finale du photon reste proche de sa trajectoire initiale. La probabilité que possède un photon d'interagir selon la diffusion Rayleigh augmente avec le numéro atomique de l'atome rencontré et diminue avec l'énergie du photon incident (cf Fig. 2.1 (2)).

Au contraire de la diffusion Rayleigh, la **diffusion Compton** est inélastique. Lors de cette interaction, le photon incident interagit avec un électron dont l'énergie de liaison est faible devant l'énergie apportée par le photon. Suite à l'interaction, l'énergie apportée par le photon incident est partagée entre l'électron et un nouveau photon X appelé "photon diffusé" (cf 2.1 D). L'électron

ayant reçu une énergie supérieure à son énergie de liaison est alors éjecté de l'atome, dans le sens de propagation du photon incident. Le reste de l'énergie est transférée à un photon X diffusé : pour des photons incidents de basse énergie, presque toute l'énergie sera attribuée au photon diffusé. Plus l'énergie du photon incident sera élevée et plus la fraction d'énergie délivrée à l'électron sera importante.

Lors de l'**effet photoélectrique**, le photon incident transfère toute son énergie à un électron. Cet électron est alors éjecté de l'atome et porte le nom de "photoélectron". Il possède une énergie cinétique égale à la différence de l'énergie du photon incident et de l'énergie de liaison de l'électron. Si l'énergie du photon incident est inférieure à l'énergie de liaison de l'électron, le photon n'apporte pas suffisamment d'énergie pour arracher l'électron de l'atome et l'interaction ne peut pas avoir lieu. Dès que l'énergie du photon incident est égale à l'énergie de liaison de l'électron, cette interaction devient possible et les probabilités d'interaction deviennent élevées. En fait, plus l'énergie du photon incident est proche de l'énergie de liaison de l'électron et plus cette interaction est probable -si le photon apporte assez d'énergie pour "arracher" l'électron. D'autre part, l'effet photoélectrique est prédominant à "basses" énergies (< 100 keV) et pour les éléments de grand nombre atomique Z (cf Fig. 2.1 (2)).

Enfin, lorsque l'énergie du photon est suffisamment importante (> 1.02 MeV), la **création de paires** devient possible : l'interaction du photon avec le champ produit par le noyau d'un atome va mener à la création d'une paire électron - positron (l'antiparticule de l'électron). Lorsque le positron entre en collision avec un autre électron du milieu, les deux particules s'annihilent et l'énergie ainsi produite est convertie en une paire de photons de 511 keV émis dans des directions opposées. Ce phénomène n'apparaissant qu'à des énergies supérieures au MeV, celui-ci ne nous concernera pas dans ces travaux de thèse.

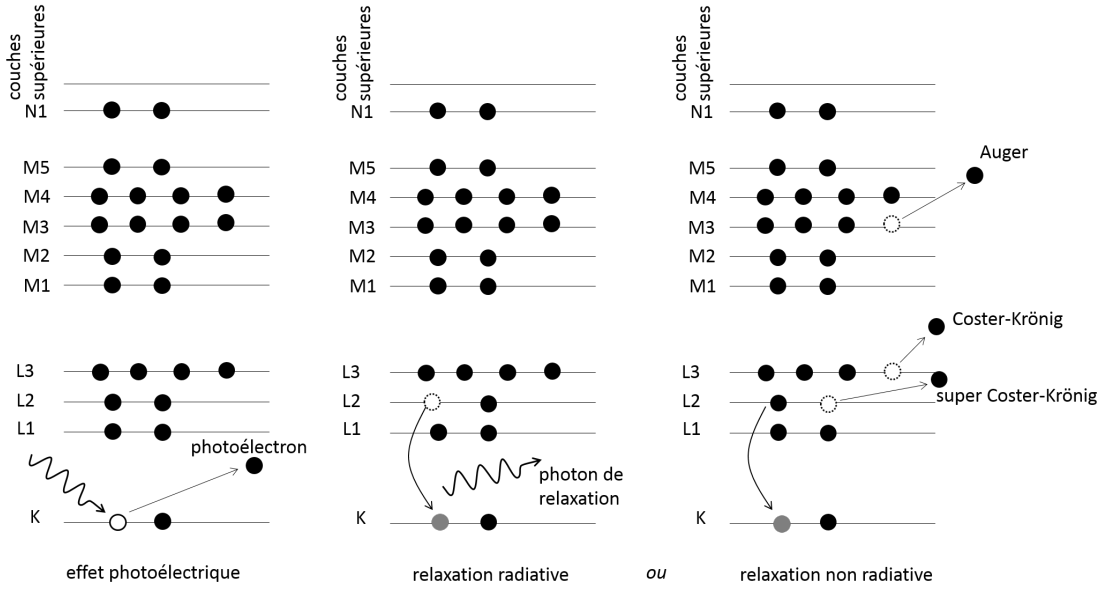


Figure 2.2 – *Schéma résumé : relaxations radiatives et non radiatives (électrons Auger, Coster-Krönig, super Coster-Krönig).*

Suite à ces interactions, l'atome ayant perdu un électron peut se retrouver dans un état excité instable. Par exemple, dans le cas de l'effet photoélectrique, l'électron arraché est le plus souvent

un électron de la couche K : l'atome est alors dans un état excité. Pour revenir dans un état plus stable, il va réorganiser son cortège électronique et combler la vacance en K avec un électron d'une couche supérieure. Ce phénomène est appelé **relaxation** (voir Fig. 2.2). Au cours de cette relaxation, l'atome va alors "rendre" l'excédent d'énergie qui lui a été apporté. Deux processus de relaxation sont alors possibles :

- **la relaxation radiative** : lorsque l'électron de la couche supérieure change d'orbitale pour combler la vacance, la transition électronique va être accompagnée de l'émission d'un photon appelé *photon de fluorescence*. Ce phénomène est prédominant pour les éléments à grand numéro atomique Z. L'énergie de ce photon est caractéristique de l'élément.
- **la relaxation non radiative** : lorsque l'électron de la couche supérieure change d'orbitale, l'énergie excédentaire n'est cette fois pas émise sous forme de photon. Elle est transmise à un autre électron d'une couche périphérique, qui sera éjecté de l'atome. Cet électron émis est appelé électron Auger. L'atome possède alors deux vacances libres, qui peuvent elles aussi être comblées par des électrons des couches périphériques, déclenchant une réaction en chaîne appelée *cascade Auger*. L'effet Auger est prédominant pour les éléments de petit numéro atomique Z.
  Dans le cas de l'effet Auger, la vacance est comblée par un électron venant d'une couche électronique différente de celle contenant la vacance. Il est aussi possible que la vacance soit comblée par un électron d'une même couche électronique mais d'une sous-couche supérieure : l'électron émis qui en résulte sera alors appelé "électron **Coster-Kronig**". Si la vacance est comblée par un électron venant de la même sous-couche électronique que la vacance, l'électron émis lors de la relaxtion sera appelé électron **super Coster-Kronig**.

La figure 2.3 résume les principales interactions ainsi que les modes de relaxation possibles qui s'en suivent.

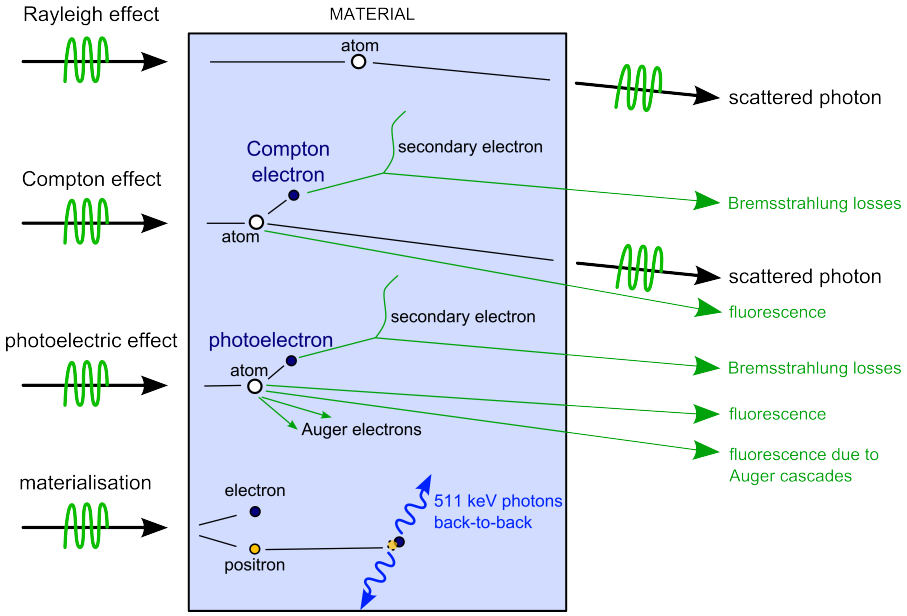


Figure 2.3 – *Schéma résumé des interactions lumière-matière ainsi que les phénomènes de relaxation et de freinage qui en découlent.*

2.1.2 Généralités et définitions

Lorsqu'un photon se propage dans un milieu, les interactions qu'il va subir dépendent uniquement de lois de probabilité. La probabilité d'occurrence de chaque phénomène varie notamment selon l'énergie du photon incident et la nature de l'atome impliqué. La **section efficace** S, donnée en barn ($1\ barn = 10^{-28}\ m^2$) ou en cm^2, décrit cette probabilité d'interaction : imaginons que chaque atome soit entouré d'une sphère d'un rayon correspondant à celui de la section efficace pour une interaction donnée. Un photon incident interagit avec l'atome selon ce mode d'interaction si sa trajectoire l'amène à entrer en collision avec la sphère. Donc plus la section efficace est grande, plus la sphère est étendue et plus un photon aura de probabilité d'interagir avec l'atome.

Une autre grandeur utile pour quantifier les interactions d'un photon avec la matière est le **coefficient d'atténuation**. Imaginons que N photons traversent une cible composée par un matériau donné. Certains de ces photons vont passer à travers sans interagir, mais d'autres vont être diffusé (Rayleigh ou Compton), interagir avec un atome par effet photoélectrique ou former une paire. A la sortie de la cible, il ne restera donc plus que N' photons n'ayant pas interagi. On parle donc d'*atténuation*. Le coefficient d'atténuation englobe les deux processus d'absorption et de diffusion des photons. Ce coefficient d'atténuation peut être *linéique* μ ou, plus communément, *massique* μ/ρ si l'on veut s'affranchir l'état physique du matériau (ρ étant la masse volumique du matériau). Il est généralement donné en cm^2/g.

De plus, on utilise souvent le **coefficient massique d'absorption en énergie** μ_{en}/ρ, représen -tatif, comme son nom l'indique, de l'énergie absorbée par le matériau. Le coefficient d'atténuation μ/ρ prend en compte tous les processus d'interaction : or, plusieurs éléments issus de ces interactions s'échappent de la cible sans délivrer leur énergie au matériau. Ils sont donc "perdus" du point de vue énergétique. Le coefficient d'absorption en énergie est représentatif de l'énergie communiquée aux électrons et ne prend donc pas en compte :

- les photons diffusés (Compton, Rayleigh) et de fluorescence (suite à l'interaction photoélectrique ou Compton), les photons issus de la matérialisation,
- l'énergie qui s'échappe du matériau sous forme de rayonnement de freinage des électrons mis en mouvement (fraction de l'énergie cinétique des électrons qui s'"échappe" aussi du matériau).

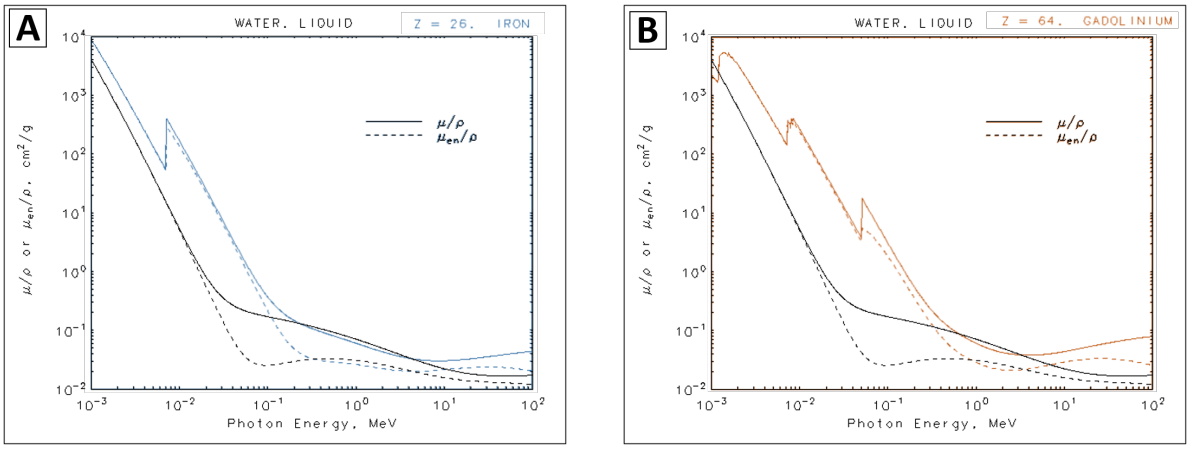


Figure 2.4 – *Coefficients d'atténuation massique μ/ρ et d'absorption en énergie μ_{en}/ρ de l'eau et du fer (A) ou de l'eau et du Gd (B) selon les données issues du NIST XCOM.*

La figure 2.4 A représente l'évolution des coefficients d'atténuation massique et d'absorption en énergie de l'eau et du fer en fonction de l'énergie des photons incidents. Tout d'abord, il est intéressant d'observer que l'eau, comme le fer, absorbe plus les photons de basse énergie que les photons très énergétiques. Ensuite, on peut remarquer la présence d'un saut du coefficient d'atténuation du fer vers 7 keV : cette transition correspond à l'énergie de liaison d'un électron K du fer. Sous cette énergie, les photons incidents n'apportent pas assez d'énergie pour "arracher" l'électron K de l'atome. Comme vu précédemment, l'interaction devient possible dès que l'énergie du photon est égale à l'énergie de liaison de l'électron. La probabilité d'interaction devient alors telle que les faisceaux de photons à cette énergie sont très atténués par le fer. La probabilité d'interaction décroît ensuite lorsque l'énergie augmente. Ce seuil K est aussi nommé *K-edge*.

Les autres éléments ont aussi des seuils K, et éventuellement L et M selon leur numéro atomique et l'énergie de ces seuils est caractéristique des atomes. L'exemple du Gd est donné sur la figure 2.4 B à titre de comparaison avec le fer. On y distingue les seuils K, L et M.

2.1.3 Interactions entre les électrons émis et la matière

2.1.3.1 Le devenir des électrons dans le milieu

Comme dit précédemment, ce ne sont pas directement les photons qui sont responsables du dépôt d'énergie dans la matière. Au cours des interactions, les photons mettent directement ou indirectement des électrons en mouvement en leur donnant tout ou une partie de leur énergie. Les électrons vont ensuite interagir avec le milieu en lui cédant leur énergie jusqu'à se retrouver au repos. Nous considèrerons alors les modes d'interaction suivants :

- l'électron peut subir des **chocs élastiques** contre les atomes du milieu : il est alors dévié mais conserve son énergie. Plus l'énergie de l'électron est faible et plus les angles de diffusion peuvent devenir importants.
- l'électron peut aussi interagir avec d'autres électrons lors de *choc inélastiques*. Lorsqu'il interagit le cortège électronique d'un atome, l'électron incident peut céder tout ou une partie de son énergie à un des électrons des couches de l'atome. Si l'énergie est suffisante, l'électron peut être promu à un niveau d'énergie supérieur. L'énergie apportée peut aussi être suffisante pour éjecter l'électron. Les chocs inélastiques produisent donc des excitations et des ionisations dans le milieu. La transmission de l'énergie de l'électron à la matière est majoritairement réalisée *via* les chocs inélastiques dans le cas des électrons de faible ou moyenne énergie. (Remarque : un électron très énergétique peut aussi causer une ionisation des couches internes de l'atome, suivie par conséquent d'émission d'électrons Auger et de rayons X caractéristiques [Salv 11]).
- un électron peut interagir avec le champ électrique produit par le noyau d'un atome : il est alors rapidement dévié et transmet son énergie à un photon appelé "photon Bremsstrahlung" ou rayonnement de freinage. Ce phénomène est d'autant plus probable que le numéro atomique des éléments du milieu est élevé.

2.1.3.2 Grandeurs utiles pour caractériser le dépôt d'énergie d'un électron

Le pouvoir d'arrêt d'un électron représente la perte d'énergie de l'électron par unité de longueur au cours de son trajet dans la matière. On utilise habituellement le pouvoir d'arrêt massique donné en $MeV.cm^2.g^{-1}$. Dans notre contexte, cette perte d'énergie est principalement due aux col-

lisions entre l'électron étudié et les autres électrons des atomes du milieu. Le pouvoir d'arrêt est inversement proportionnel au carré de la vitesse de l'électron. Cela implique que plus l'électron perd de l'énergie, plus il cède rapidement son énergie restante au milieu par unité de longueur. Donc, au début de son parcours, l'électron interagit *a priori* peu et son parcours est plutôt rectiligne (comme vu précédemment). Puis, lorsqu'il commence à perdre de l'énergie, il est de plus en plus dévié par les collisions et perd de plus en plus fréquemment son énergie jusqu'à être au repos. C'est pourquoi la majeure partie du dépôt de l'énergie des électrons est relativement localisée.

Le TEL (Transfert d'Energie Linéique) est une grandeur calculée non mesurable, dont l'unité est le J/m. Le TEL représente l'énergie transférée par une particule ionisante au milieu, par unité de longueur et inférieure à un seuil que l'on appelle *énergie de coupure* Δ, souvent à fixée à 100 eV. Par rapport au pouvoir d'arrêt, le TEL ne prend donc en compte que les échanges d'énergie inférieurs ou égaux à cette limite. Le TEL a pour objectif de décrire la manière dont la particule ionisante transfert son énergie au milieu autour de sa "trace", *via* la mise en mouvement d'électrons secondaires. Ces transferts d'énergie au cours du transport de la particule sont-ils fréquents et répartis sur son trajet, ou plutôt ponctuels et isolés ?

Il peut arriver que la particule ionisante transfert une énergie conséquente un électron lors d'un choc très violent (échange d'énergie supérieur à Δ) : cet autre électron aura donc acquis suffisamment d'énergie pour être transporté bien au-delà de la trace de la particule. La valeur du TEL s'en trouve donc biaisée puisque cette énergie ne sera pas déposée "localement" autour de la trace. Le concept d'énergie de coupure a donc été introduit pour ne pas prendre en compte cet échange d'énergie dans le calcul du TEL.

Dans le cas des rayonnements dits "de haut TEL", les particules ionisantes interagissent fréquemment avec la matière le long de leur trajet. C'est le cas des faisceaux de neutrons ou d'ions lourds. Dans le cas des rayonnement de bas TEL, comme les faisceaux de photons et d'électrons, les interactions sont plus disséminées le long du parcours de la particule. Par ailleurs, l'absorption des photons (gammas, X par exemple) ne peut pas rigoureusement être décrite par un TEL car le photon n'interagit potentiellement qu'une fois (ou pas du tout) avec la matière et est alors absorbé au cours du processus (à l'exception de la diffusion Compton ou Rayleigh). Cela n'a donc pas de sens d'étudier les transferts d'énergie autour de sa trace, puisque le photon n'interagit qu'une fois. Le TEL des photons, lorsqu'il est utilisé, décrit alors en réalité le TEL des électrons secondaires mis en mouvement par le photon (*Health Physics Society*).

2.1.4 Dommages biologiques

2.1.4.1 Chiffrer le dépôt d'énergie

Le **Kerma** (de *Kinetic Energy Release per unit MAss in the medium*) représente l'énergie cinétique libérée dans le milieu par le rayonnement primaire. Elle est donnée en J/kg ou en Gy.

Cependant, comme nous avons pu le voir, ce n'est pas parce que les électrons ont acquis de l'énergie cinétique que cette énergie sera effectivement transmise localement au milieu. Les évènements qui nous intéressent en radiothérapie sont les excitations et les ionisations produites le long du parcours de l'électron : or, le rayonnement de freinage des électrons ne participe pas au transfert "local" de l'énergie et est donc "perdu" de notre point de vue. **La dose absorbée** permet de décrire la quantité d'énergie délivrée aux tissus et ne prend donc pas en compte le rayonnement Bremmstrahlung. Son unité est le Gy.

Plus un électron ralentit et plus il déposera l'énergie qu'il lui reste de manière concentrée.

Les électrons de faible énergie déposent donc leur énergie très localement, créant ainsi ce que l'on appelle une *grappe d'ionisations*. Il est intéressant de noter que selon la localisation de la grappe d'ionisations dans une cellule, les conséquences biologiques ne seront pas identiques. Les dégâts causés par une grappe d'ionisations au niveau de l'ADN auront *a priori* plus de probabilité de provoquer la mort de la cellule que les dégâts provoqués par une grappe d'ionisations dans le cytoplasme. L'étude de la **microdosimétrie** (dosimétrie à l'échelle de la cellule) devient alors nécessaire pour prédire la réponse biologique selon la localisation des ionisations.

2.1.4.2 Lésions de l'ADN et leurs conséquences

Une fois la phase "physique" de l'irradiation achevée, les électrons ont été mis en mouvement -directement ou indirectement- par les photons. Ces électrons déposent ensuite leur énergie en interagissant avec les atomes et molécules de leur environnement jusqu'à retourner au repos. Ces interactions, majoritairement des collisions, vont engendrer des excitations et des ionisations des molécules du milieu, débutant ainsi la **phase "chimique"** des conséquences de l'irradiation. Les cellules étant en majorité composées d'eau, les composés résultant de l'excitation et de l'ionisation des molécules d'eau vont jouer un rôle prépondérant. Les produits de la radiolyse de l'eau sont en effet des espèces très réactives qui peuvent à leur tour créer des dommages chimiques et biologiques.

Les dommages biologiques peuvent concerner les membranes, l'ADN, les organites, les mitochondries, les protéines ou d'autres organelles, mais la plupart du temps c'est l'ADN qui est désigné comme cible la plus critique de la cellule, parfois accompagné par les mitochondries. L'électron peut participer directement aux conséquences biologiques de l'irradiation en interagissant directement avec l'ADN lors de collisions : on parle alors **d'effet direct**. Comme nous venons de le voir, les électrons peuvent aussi interagir avec les molécules d'eau. La radiolyse de l'eau mène à de nombreuses espèces chimiques, dont des radicaux libres, environ 10^{-12} s après irradiation : par exemple, $^{\bullet}OH$, $^{\bullet}H$ et e_{aqu}. A 10^{-6} s, ces radicaux peuvent se recombiner pour former H_2O_2, une espèce réactive de l'oxygène toxique pour les cellules, ou encore réagir avec des molécules organiques dont l'ADN et des protéines variées essentielles pour le métabolisme de cellules. On parle d'**effet indirect** pour désigner ce processus de dommage à la cellule effectué *via* la radiolyse de l'eau induite par les électrons secondaires. Comme les interactions à faible TEL sont "diluées" spatialement, la majeure partie des dommages induits par ce type d'irradiation est due à l'effet indirect.

L'ADN est une molécule constituée de deux brins qui s'enroulent en spirale pour former une double hélice. La "brique élémentaire" de l'ADN sont les nucléotides, qui ont trois composants : le sucre, le groupement phosphate et la base (adénine, thymine, guanine ou cytosine). Les deux brins sont liés entre eux par des liaisons hydrogène qui relient les bases deux à deux. Le squelette de l'ADN, lui, est composé par les groupements phosphate et les sucres. Les dommages à l'ADN peuvent donc toucher les bases, les sucres et/ou les phosphates.

Les principales lésions de l'ADN sont illustrées dans la figure 2.5. Nous pouvons nommer :

- les cassures simple brin (CSB), qui constituent la quasi totalité des lésions. Dans ce cas, un des deux brins de l'ADN est lésé. Les CSB sont efficacement réparées en quelques minutes.
- les cassures double brins (CDB) sont plus rares. Une cassure est dite "double brin" si les deux brins de l'ADN sont lésés et si ces deux lésions ne sont pas séparées de plus de 10 nucléotides. La réparation d'une CDB est plus complexe pour la cellule que celle d'une CSB : une seule CDB peut entraîner la mort cellulaire.
- les altérations des bases pyrimidiques et puriques entraînent la distorsion de la structure de

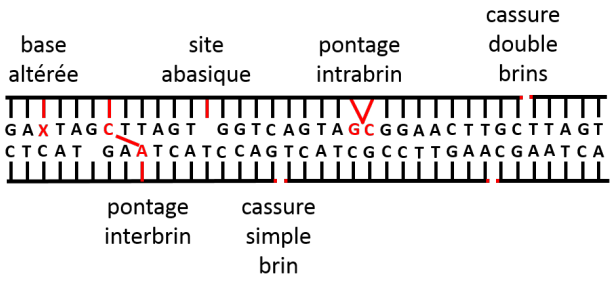


Figure 2.5 – *Les principaux types de lésion de l'ADN, figure réalisée d'après [Hout 06].*

l'ADN, voire la rupture entre les deux brins.
- les destructions des sucres peuvent avoir lieu par oxydation ou par hydrolyse. Elles conduisent à la libération des bases donc à l'apparition des sites abasiques.
- les pontages intra ou interbrins ADN/ADN : une liaison covalente se forme entre deux chaînes de la double hélice ou deux bases azotées d'un même brin.
- les pontages ADN/protéines : une liaison covalente se forme entre l'ADN et une protéine.
- les dommages multiples localisés (LMDS) : des lésions contigües sont regroupées dans le même périmètre restreint de la molécule d'ADN, rendant les réparations plus complexes.

En pratique, une cellule subit déjà quotidiennement des lésions, notamment à cause des stress extérieurs et de son métabolisme oxydatif, source d'énergie. Le tableau **2.1** représente le rendement de formation des lésions lors de l'irradiation d'une cellule (nombre de lésions/cellule/Gy) ainsi que le nombre de lésions induites de manière endogène (nombre de lésions/cellule/jour) :

Table 2.1 – *Rendement de formation des lésions lors d'une irradiation [Burk 99].*

lésion	**nombre induit par cellule et par Gy lors d'une irradiation**	nombre induit par cellule par jour de manière endogène
cassures simple-brins (CSB)	1000	10000 - 55000
cassures double-brins (CDB)	40	8
sites abasiques	250	12600
pontages ADN-protéine	150	*quelques uns*
altération des bases	2000	3200
lésions en grappe (LMDS)	130	*quelques unes*

Les dommages induits par l'interaction des particules ionisantes avec la matière ne sont pas différents en nature des dommages endogènes quotidiens subis et réparés par la cellule. Les lésions induites par irradiation sont donc prises en charge par la cellule, qui arrête alors toutes ses activités pour se consacrer à la réparation des lésions. La réparation peut être fidèle ou fautive, et la capacité à réparer les dommages dépend fortement du type cellulaire. Par exemple, lorsqu'un seul brin a été modifié, l'autre brin peut servir de matrice pour reconstituer la molécule d'ADN. Cependant, lorsque les dommages sont trop nombreux et/ou complexes à réparer, la cellule entre en apoptose. Il se peut aussi que la mort cellulaire ne survienne qu'après plusieurs cycles, une fois les mutations amplifiées et devenues létales. Enfin, il reste aussi possible qu'une cellule mutée ayant perdu des systèmes de contrôle contre l'instabilité génétique continue de proliférer et devienne une cellule

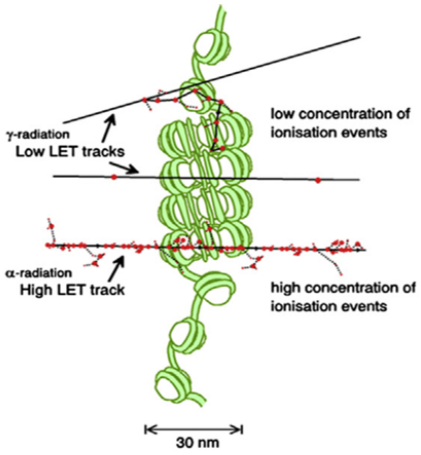


Figure 2.6 – *Schéma illustrant les dommages à l'ADN causés par des radiations à haut ou bas TEL [Loma 13].*

cancéreuse sur le plus long terme.

Les lésions quotidiennes subies par une cellule de mammifère se chiffrent à ≃50 000 lésions par jour. Les lésions causées par une irradiation de 2 Gy se chiffrent à environ 3 000 lésions [Loma 13]. **Pourquoi une si faible augmentation du nombre de dégâts serait-elle fatale à une cellule qui en répare bien plus quotidiennement ?** Les dommages endogènes sont répartis de façon plutôt homogène sur la molécule d'ADN. Au contraire, les dommages causés par l'irradiation sont plutôt localisés sous forme de "grappes". Pour des rayonnements de bas TEL, 30% de l'énergie déposée mène à des dommages sous forme de "grappe", contre 90% pour les hauts TEL (voir Fig. 2.6). Les lésions de l'ADN résultant de ces dépôts d'énergie sous forme de "grappe" sont **plus complexes chimiquement et structurellement** pour la cellule qui va peiner à réparer ces dommages. Le reste de l'énergie déposée crée des lésions isolées qui s'ajoutent au fardeau quotidien des lésions endogènes.

2.1.5 Mort cellulaire

Selon Kroemer, une cellule est considérée comme "morte" lorsqu'elle est entrée dans un processus irréversible. Il cite notamment trois points à vérifier : la perte de l'intégrité de la membrane, la fragmentation de la cellule en plusieurs corps distincts (appelés usuellement corps apoptiques) et/ou l'internalisation de ces corps par d'autres cellules [Kroe 09]. Il existe différents types de mort cellulaire, historiquement classés selon des critères morphologiques. Cependant, ces critères ont tendance à changer au profit de nouveaux critères, dont des critères enzymatiques et fonctionnels.

La réponse de la cellule aux dommages à l'ADN Suite à l'irradiation, les cellules entrent dans une phase de réparation des lésions de l'ADN. Selon les dégâts, la cellule peut activer la "voie de réponse aux dommages à l'ADN" (**DDR**, de *DNA Damage Pathway*). Cette voie est en réalité plus un réseau entre de nombreux acteurs qu'un chemin linéaire. Elle commence lors de la détection du dommage et s'achève par une réponse de la cellule. Elle est illustrée très schématiquement dans 2.7. Tout d'abord, des **protéines "capteurs"** détectent la présence de lésions de l'ADN (par exemple, des cassures double brin ou simple brin). Elles transmettent la présence de ces lésions à des *kinases de transduction* (*e.g.* ATM et ATR) par des mécanismes encore mal compris. Ces kinases sont alors activées et deviennent capables de "phosphoryler" d'autres protéines (ou elles-mêmes), c'est-à-dire de les "activer" en leur ajoutant un groupement phosphate. Les kinases de

transduction activent :

- des **kinases effectrices** très mobiles (*e.g.* Chk1 et Chk2) qui vont contribuer à l'amplification du signal.
- les **médiateurs** (*e.g.* H2AX, 53BP1, BRCA1), qui vont notamment recruter les protéines de réparation sur les sites lésés de l'ADN.

Enfin, les kinases effectrices et les kinases de transduction vont activer les **protéines effectrices** qui agissent directement sur la réponse cellulaire. Ces protéines effectrices peuvent réguler la progression du cycle en activant les *checkpoints* vus dans la section 1.3.4.1 (*e.g.* Cdc25), la réparation de l'ADN, la sénescence voir la mort de la cellule (*e.g.* p53) [Free 10, Hout 06, Suro 13].

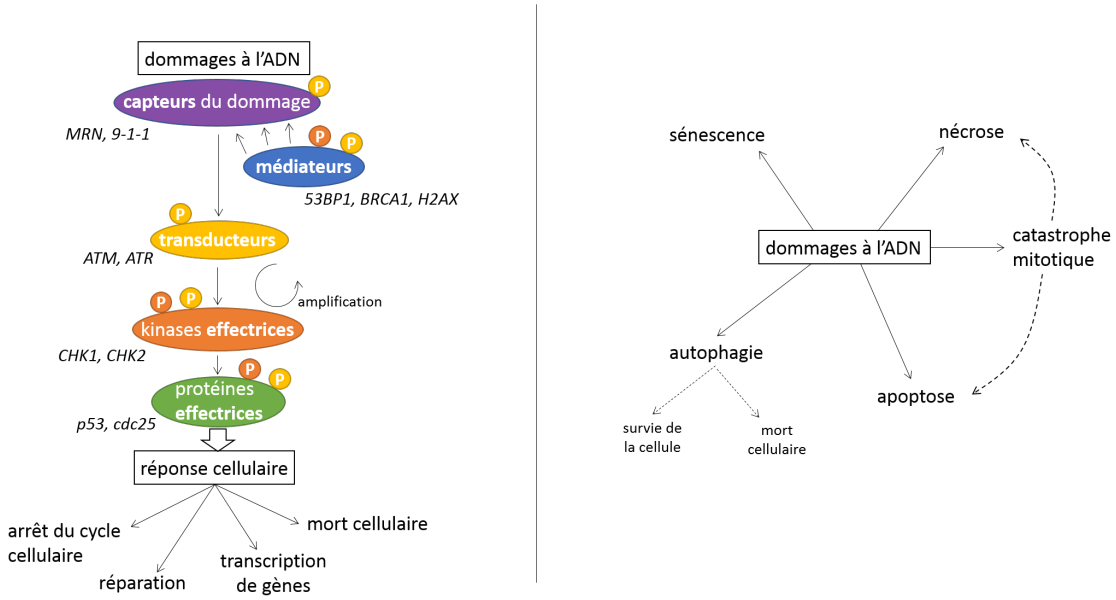


Figure 2.7 – *A gauche : déroulement de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Les groupements "P" montrent la phosphorylation des protéines par les kinases de transduction (en jaune) ou effectrices (en marron). D'après [Free 10, Suro 13]. A droite : les principaux types de mort cellulaire causés par les dommages à l'ADN, d'après [Suro 13].*

Principaux types de mort cellulaire induits par les dommages à l'ADN

Suite à la détection des dommages à l'ADN, différentes protéines effectrices peuvent être activées. Selon leur nature et leur fonction, la cellule peut réagir de différentes manières : arrêt du cycle, phase de réparation des dommages, ou mort cellulaire si les dommages sont jugés trop importants. Les principaux types de mort cellulaires induits par les dommages à l'ADN sont décrits succinctement ci-après [Bask 12, Suro 13] et illustrés dans la figure 2.7.

- **l'apoptose** est une réponse en général rapide aux dommages, bien qu'elle puisse avoir lieu après plusieurs cycles cellulaires dans certains cas. Elle est déclenchée par la cellule lorsque la réparation des lésions est jugée trop lente ou incomplète. Elle est souvent surnommée "mort cellulaire programmée". Lors de l'apoptose, la cellule se déforme et se scinde en corps apoptotiques.
- **la catastrophe mitotique** arrive pendant ou juste après la mitose. Elle serait due à la mauvaise séparation des chromosomes. Selon différentes études, il s'agirait plutôt d'un processus transitionnel menant à l'apoptose ou à la nécrose. La catastrophe mitotique et l'apoptose

sont les principales pertes de cellules suite à des dommages causés par des particules ionisantes.
- **l'autophagie** est un processus par lequel la cellule s'auto-digère. Il s'agit d'un processus généralement en faveur de la survie de la cellule : elle permet la synthèse de précurseurs métaboliques pour le renouveau cellulaire et le recyclage de composés. Cependant, elle peut aussi mener à la mort cellulaire, constituant une alternative dans le cas où la cellule résiste à l'apoptose.
- lorsqu'elle rentre en **sénescence**, la cellule ne meurt pas vraiment mais ne peut plus proliférer. Elle reste bloquée en phase G1, de façon à limiter le risque de cancer en cas de mutation, mais continue à être active. Les cellules sénescentes sont plus larges, étalées et granuleuses.
- **la nécrose** était auparavant décrite comme un processus non programmé. Aujourd'hui, il semblerait plutôt que la nécrose soit un processus régulé dans les gènes. Une cellule entrant en nécrose est reconnaissable par la rupture de sa membrane, le grossissement de ses organelles, une multiplication des vacuoles et une dégradation aléatoire de l'ADN.

La réalité est bien sûr plus complexe que la simple énumération de ces morts cellulaires. Les causes et les transitions possibles entre les différents types de morts cellulaires ne sont pas encore bien élucidées. La caractérisation des différents processus et des liens existants entre eux sont un sujet d'actualité.

2.1.6 En résumé : du photon à la mort cellulaire

La figure 2.8 résume le déroulement des processus par lesquels la propagation de photons dans la matière aboutit à la mort cellulaire :

- La phase "physique" : les photons, par diverses interactions, transfèrent leur énergie aux électrons. Ceux-ci, à force de collisions, ionisent et excitent les molécules et atomes du milieu. Cette phase est très rapide et s'achève 10^{-15} s après l'irradiation.
- La phase "chimique" : les électrons interagissent soit directement avec l'ADN, soit indirectement en causant la radiolyse de l'eau. La radiolyse de l'eau produit entre autre des espèces réactives qui vont participer aux dommages de l'ADN. Cette phase s'achève environ 1 s après irradiation.
- La phase "biologique" : suite aux lésions non réparées, les cellules entrent en mort cellulaire ou prolifèrent pendant plusieurs cycles voire pendant plusieurs années avant que les effets mutagènes ne se remarquent. Cette phase s'étale entre quelques secondes après irradiation et peut encore avoir des conséquences plusieurs années après.

2.2 Des éléments à haut Z pour augmenter le dépôt de dose dans la tumeur

2.2.1 La motivation : création d'un différentiel entre la tumeur et le tissu sain

La radiothérapie est limitée par son incapacité à cibler la tumeur lors de l'irradiation car le faisceau de rayons X dépose son énergie indifféremment dans les tissus sains ou dans la tumeur. Il n'y a en fait aucune raison que les rayons X interagissent préférentiellement avec la tumeur : les tissus sains environnants comme la tumeur sont composés majoritairement d'eau. Les rayons X

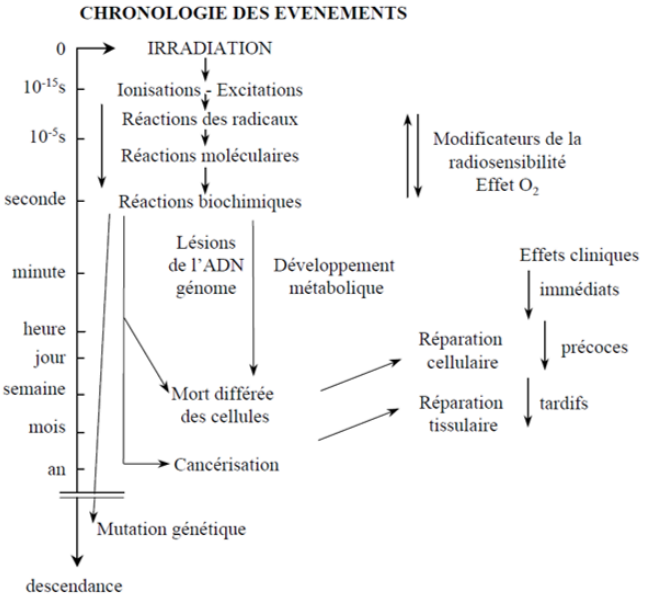


Figure 2.8 – *Déroulement des phases physique, chimique et biologique décrivant les processus par lesquels une émission de photons mène à la mort cellulaire. Figure tirée de [Cord 02].*

sont donc, à peu de choses près, absorbés de la même manière dans la tumeur et dans le cerveau. Bien sûr, les optimisations de la radiothérapie (fractionnement spatial et temporel par exemple) permettent aujourd'hui de "cibler" un peu plus précisément la tumeur, mais en pratique la dose déposée dans la tumeur reste toujours limitée par la dose maximale que les tissus sains environnants peuvent tolérer.

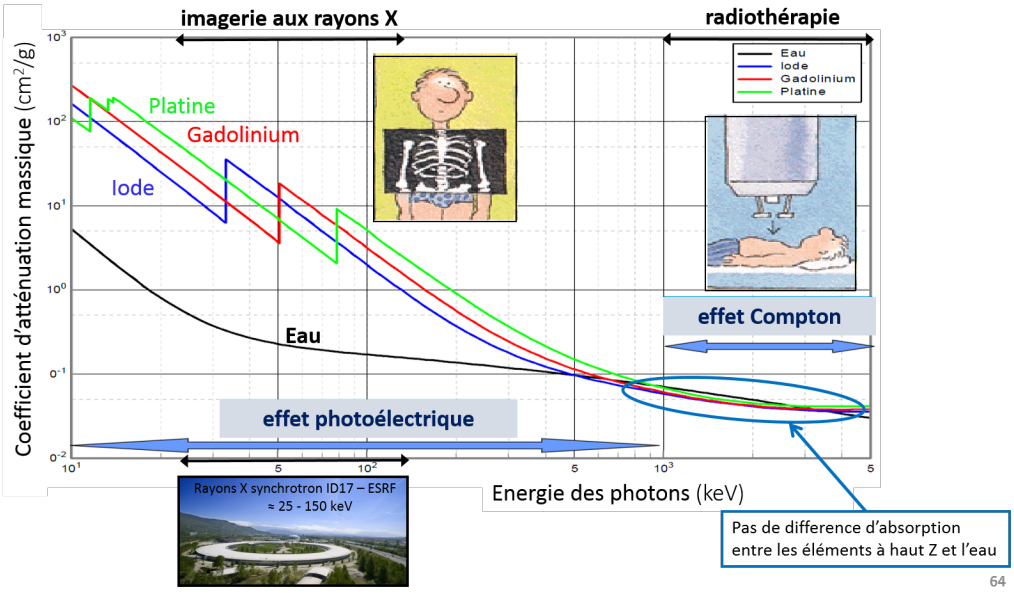


Figure 2.9 – *Coefficients d'atténuation massique de l'eau, de l'iode, du gadolinium et du platine en fonction de l'énergie d'irradiation, d'après [Cord 02].*

Il faudrait donc trouver un moyen pour augmenter le potentiel d'absorption des rayons X de la tumeur. Comme nous l'avons vu précédemment, l'absorption des rayons X par un matériau est reliée au coefficient d'atténuation massique du matériau. Plus la valeur de ce coefficient est élevée et plus les rayons X seront absorbés par le matériau. La figure 2.9 représente les coefficients d'atténuation massique de plusieurs matériaux : l'eau et des éléments lourds dont le gadolinium, l'iode et le fer. On remarque qu'aux énergies utilisées en radiothérapie, c'est-à-dire des énergies supérieures au MeV, les coefficients d'atténuation massique de tous ces composés sont similaires à celui de l'eau : les rayons X sont donc absorbés indifféremment par les tissus ou les éléments lourds.

Cependant, aux énergies utilisées en imagerie, les coefficients d'atténuation massiques des éléments lourds sont supérieurs à celui de l'eau. Les rayons X se propageant dans un milieu hétérogène composé d'eau et d'éléments lourds seront donc préférentiellement absorbés par les zones riches en élément lourd. Cette différence de coefficients d'atténuation massiques est due à la nature de l'interaction dominante selon la gamme d'énergie étudiée : dans la gamme d'énergie utilisée en radiothérapie, l'effet prédominant est l'effet Compton. Et, nous l'avons vu précédemment, la probabilité d'occurrence de l'effet Compton ne dépend pas du Z de l'atome cible. Dans la gamme d'énergie utilisée en imagerie, c'est l'effet photoélectrique qui prédomine (cf figure 2.1). La probabilité d'absorption par effet photoélectrique dépend de l'énergie d'irradiation, mais aussi du numéro atomique de l'élément : plus l'énergie d'irradiation se rapproche des seuils K, L ou M par valeur supérieure et plus l'interaction photoélectrique est probable par rapport aux énergies juste inférieures aux seuils.

En résumé, les rayons X sont plus absorbés par les éléments lourds que par l'eau aux énergies utilisées en imagerie. Cette observation a des applications thérapeutiques : si l'on parvient à charger la tumeur avec un de ces éléments, les rayons X déposeront préférentiellement leur énergie dans cette zone et le ciblage de la tumeur sera amélioré.

Origine de l'augmentation de dose par éléments lourds

L'augmentation de dose par éléments lourds débute dans les années 1980 grâce à une constatation : Norman et Adams remarquent que les lymphocytes (des cellules sanguines) des patients ayant effectué une angiographie cardiaque présentent des dommages chromosomiques inattendus [Adam 77, Norm 78]. L'angiographie cardiaque est une technique d'imagerie qui combine un agent de contraste iodé, le Renografin, et des rayons X de 65 kVp. Deux hypothèses sont alors proposées pour expliquer ce phénomène :

- l'agent de contraste iodé induit des aberrations chromosomiques, même sans irradiation,
- la dose délivrée aux lymphocytes est augmentée en présence d'atomes lourds, à cause de la prédominance de l'effet photoélectrique à 65 kVp.

Les données alors accumulées ne permettaient pas de savoir lequel des deux processus proposés était le plus impliqué dans ces observations. Pour répondre à cette interrogation, des expériences étudiant la potentielle génotoxicité des agents de contraste iodés ont été effectuées. Des effets mutagènes ont notamment été constatés *in vitro*, mais à des concentrations d'agent de contraste non représentatives des conditions d'imagerie [Mell 83]. D'autre part, des études ont été menées pour vérifier si l'effet photoélectrique entrait en jeu. Les travaux de Dawson ont notamment permis de prouver *in vitro* l'inexistence de l'effet toxique lors d'une irradiation de cellules aux rayons γ (source de Cobalt 60) en présence d'un agent de contraste iodé [Daws 88]. Ces mêmes cellules exposées à l'agent de contraste et irradiées à 250 kVp montraient alors une toxicité accrue. Ainsi, il fut montré que l'effet photoélectrique était bien à l'origine de l'observation de Norman et Adams.

Si ces effets sont néfastes du point de vue de l'imagerie (mais de façon marginale, car les doses d'imagerie sont très faibles (mGy - cGy)), il est aussi possible de **"détourner" cet effet**

au profit de la radiothérapie. Le protocole consisterait donc à injecter un agent de contraste iodé dans la tumeur, puis d'irradier à basses énergies afin d'augmenter le dépôt de dose dans la zone tumorale. Mello et ses collaborateurs proposent pour la première fois d'utiliser cet effet pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie dans le cas de tumeurs cérébrales [Mell 83]. Plusieurs équipes développent par la suite le passage de cette technique au stage préclinique : en 1990, Iwamoto *et al.* adaptent à cet effet le scanner GE 9800 pour pouvoir l'utiliser en radiothérapie, modifiant le faisceau divergent en un faisceau fin. Il devient alors possible d'irradier la tumeur selon plusieurs incidences afin de répartir le dépôt de dose dans les tissus sains et de l'accumuler dans la tumeur [Iwam 90, Iwam 93]. Les études de Norman *et al.* montrent que l'utilisation de cette méthode chez le chien développant des tumeurs spontanées est efficace et sûre. De plus, ils prouvent un réel bénéfice thérapeutique sur la survie des animaux et montrent que les tissus sains sont mieux préservés pour un même contrôle tumoral [Norm 97]. Suite à ces travaux, le transfert de la méthode au stade clinique a été autorisé.

Les premiers essais cliniques de phase I ont été conduits par l'équipe de Rose chez huit patients porteurs de métastases multiples cérébrales : il s'agissait alors de traiter l'une des métastases avec cette nouvelle méthode, en addition du traitement de radiothérapie usuel [Rose 99]. Les résultats de ces essais cliniques ont été encourageants, avec deux cas de régression significative des volumes de la métastase concernée tandis que le volume de la tumeur contrôle était resté, dans le meilleur des cas, constant.

Enfin, les études de Mesa et Solberg ont permis de soulever les principales limites de la méthode [Solb 92, Mesa 99, Edou 10] :

- l'effet bénéfique de la thérapie dépend directement de la concentration en iode atteinte dans la tumeur.
- l'os du crâne absorbe une grande part de l'énergie des photons, et ce phénomène est d'autant plus important aux énergies utilisées en imagerie. Déposer une dose suffisante dans la tumeur revient donc à déposer une dose importante dans l'os.
- aux basses énergies, les photons X pénètrent peu profondément dans les tissus. Or, le bénéfice thérapeutique de la méthode est théoriquement obtenu pour les basses énergies.

Ils proposent donc de repousser ces limites en utilisant des faisceaux monochromatiques de rayons X. En effet, plus l'énergie du photon incident est basse et plus ce photon sera absorbé rapidement dans les tissus. En irradiant à une énergie optimisée, on s'affranchit les composantes de plus basses énergies présentes dans les faisceaux polychromatiques et qui contribuent en grande partie à la déposition de dose dans l'os [Boud 06, Edou 10]. Plusieurs pistes d'amélioration ont donc vu le jour : parmi elles, l'introduction de la SSRT (*Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy*) et l'utilisation de divers agents à la place des agents de contraste, comme les NPs ou les agents intercalants de l'ADN.

2.2.2 Origine et évolution de la SSRT appliquée à l'augmentation de dose par éléments lourds

Le flux de photons X du rayonnement synchrotron est bien plus grand que le flux de photons X émis par un scanner conventionnel. Il devient donc possible de ne sélectionner qu'une longueur d'onde de rayons X, tout en gardant un flux de photons suffisamment élevé pour que le temps d'irradiation reste raisonnable du point de vue expérimental.

La SSRT est l'une des thématiques de l'équipe RSRM (Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale) dans laquelle ces travaux de thèse se déroulent : depuis le développement de la SSRT

sur la ligne biomédicale ID-17 de l'ESRF dans les années 2000, l'équipe RSRM oeuvre en partie à comprendre les phénomènes mis en jeu dans la SSRT dans l'objectif d'optimiser la technique. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont permis de faire évoluer les connaissances des mécanismes physiques, chimiques et biologiques, autorisant le passage aux essais cliniques de phase I et II de la méthode.

Historique de la SSRT au sein de l'équipe RSRM :

Nous l'avons vu précédemment, la SSRT s'est développée autour de l'utilisation d'iode pour augmenter le dépôt de dose dans la tumeur. Ce dépôt de dose est alors attribué à des mécanismes physiques : l'iode irradié émet des électrons secondaires toxiques pour les cellules. L'équipe RSRM a étudié plusieurs éléments en plus de l'iode pour augmenter le dépôt de dose dans la tumeur, dont le platine et le gadolinium. Une synthèse des études *in vitro* et *in vivo* de l'équipe est présentée dans la figure 2.10.

De plus, si les dégâts sont bien causés par les photoélectrons et les électrons de relaxation Auger qui en découlent, il serait intéressant que les atomes lourds soient localisés au sein de la cellule, et même proches de l'ADN pour augmenter encore l'effet thérapeutique. En effet, ces électrons sont rapidement freinés par le milieu et leur dépôt d'énergie reste très local. Dans ce but, l'équipe RSRM a envisagé l'utilisation d'espèces dites "intercalantes de l'ADN", connues pour pénètrer dans le noyau des cellules où elles se fixent à l'ADN. Les composés alors étudiés contiennent un atome lourd de platine (le cisplatine ou CDDP, le carboplatine, la chloroterpyridine platine (PtTC)) ou d'iode (IUdR). Ces composés peuvent cependant occasionner une toxicité s'ils sont délivrés aux tissus sains. Il faut donc trouver un compromis entre une accumulation suffisante du composé dans la tumeur permettant d'obtenir un bénéfice thérapeutique et les dommages aux tissus sains que ce composé peut induire.

Le tableau récapitulatif peut être synthétisé en quelques points principaux :

1. L'utilisation d'**agents de contraste iodés** en préclinique permet d'observer un effet thérapeutique. Cependant, celui-ci n'est pas assez suffisant pour obtenir des survivants à long terme chez le rongeur, probablement à cause de la concentration insuffisante en iode atteinte dans la tumeur. Avec l'**IUdR**[1], les effets mesurés *in vitro* sont encourageants mais difficilement transposables au *vivo* car il est complexe de faire incorporer suffisamment d'IUdR à la totalité des cellules tumorales.
2. Pour augmenter l'accumulation en composés dans la tumeur, plusieurs stratégies ont été étudiées : l'ouverture de la BHE grâce au **mannitol** s'est avérée être mal tolérée par les animaux. D'autres **méthodes plus invasives**, comme une injection intrajugulaire des composés, permettent d'augmenter les concentrations en agent de contraste iodé dans la tumeur [Adam 03a].
3. L'utilisation de composés au platine, notamment le **cisplatine** et le **carboplatine**, s'est révélée efficace couplé à la radiothérapie (survie à long terme supérieure à 50%). Cependant, aucune dépendance à l'énergie n'a pu être observée : il s'agirait donc plus d'un phénomène de radiosensibilisation que d'augmentation de dose. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le carboplatine délivré directement dans la tumeur par une pompe osmotique : l'étude

1. L'IUdR est un analogue de la thymidine pénétrant à travers la membrane cellulaire. Lorsque la cellule est en phase S, elle va donc utiliser indifféremment l'IUdR ou la thymidine, l'intégrant dans la structure de l'ADN.

Référence	Etude	Elément radio-sensibilisant / augmentateur de dose	injection (vivo) ou concentrations (vitro)	Conditions irradiation	Résultats / observations (effet significatif observé du au couplage rayonnement X-composé)	dose enhancement ou radiosensibilisation	Remarques
Thèse Corde (2002), Corde 2004	clono SQ20B	I (IdR)	3, 10 ou 20 mg/mL	50 keV, 1, 2, 4 et 5 Gy	SER 10% : environ 1.4, 2.0 et 2.3 respectivement pour les 3 concentrations	N.A.	
			10 mg/mL	32.8, 33.5, 50 et 70 keV, 1, 2, 3, 4 et 5 Gy	SER 10% respectivement pour les 4 énergies : environ 1.1, 1.2 , 2.0, 1.5	dépendance à l'énergie	
		I (IUdR)	10 µM, incubation de 48h	32.8, 33.5, 50 et 70 keV, 1, 2, 3, 4 et 5 Gy	SER 10% respectivement pour les 4 énergies : environ 1.2, 1.6 , 2.6, 1.3	dépendance à l'énergie	
		Pt (cisplatine)	0.1 µM (48h d'incubation) ou 1 µM (12h d'incubation)	78.0 et 78.8 keV, 1, 2, 3, 6, 8 Gy	pas d'effet significatif observé	pas d'effet significatif observé	survies à 0 Gy avec 0.1 µM : 66% / avec 1 µM : 17%
		Pt (PtTC)	350 µM (6h d'incubation)	33, 48, 78.0, 78.8 keV et 85 keV, 1, 2, 3, 5 Gy	SER 10% entre 1.2 et 1.6, augmentation presque monotone avec l'énergie du rayonnement	pas de dépendance à l'énergie	
Thèse Adam (2003), Adam2006, Adam2003	survie rat + F98	I (iomeron AC)	1 bolus avant irradiation, 2 bolus pendant l'irradiation (intraveineuse ?)	50 keV, 10 Gy	différence de survie significative entre les contrôles irradiés et les traités irradiés	N.A.	
			jugulaire (iv) ou carotide, avec ou sans mannitol	50 keV, 10 Gy	injection intra-artérielle iode + mannitol semble être prometteuse	N.A.	
			iode+mannitol, jugulaire (iv) ou carotide	5, 10, 15, 25 Gy, 50 keV	augmentation significative de la survie pour les rats injectés iode+mannitol en carotide pour des doses < 15 Gy	N.A.	
		I (IUdR)	10 mM en intratumoral 24h avant irradiation	50 keV, 10 Gy	pas d'effet significatif, mais diminution des morts précoces	pas d'effet significatif observé	
Biston 2004	survie rat + F98	Pt (cisplatine)	injection intratumorale	X 78.0 et 78.8 keV, 15 Gy	33% des rats avec le traitement combiné sont encore vivants 1 an après, mais pas d'effet significatif de l'énergie	pas de dépendance à l'énergie	

Figure 2.10 – *Synthèse des études in vitro et in vivo de SSRT au sein de l'équipe RSRM. Les références sont, dans l'ordre : [Cord 02, Cord 04, Adam 03a, Adam 06, Adam 03b, Bist 04, Rous 07b, Rous 07a, Rous 09b, Rous 09a, Edou 10, Boby 10, Boby 12, Taup 13, Delo 17, Gime 15].*

Thèse Rousseau (2007), Rousseau2007 (Clin. Cancer. Res.), Rousseau2009 (Int. J. Rad. Oncology)	survie rat + F98	Pt (cisplatine)	CED ou bolus intratumoral	78.8 keV, 15 Gy	(pas de rats irradiés sans Pt)	N.A.		
		Pt (carboplatine)	CED, test de deux volumes (5µL et 20µL) contenant chacun 20µg de médicament	78.8 keV, 15 Gy	effet max : 20 µg/20 µL + 15 Gy, mais la combinaison des traitements n'est pas significativement différente de la chimiothérapie seule pour 20 µg/20µL	N.A.		La chimiothérapie seule a un effet significatif.
			CED	6 MeV ou 78.8 keV, fractionné 3*8 Gy	les deux traitements combinant carboplatine et irradiation ne sont pas significativement différents selon l'énergie	pas de dépendance à l'énergie		
		Pt (oxaliplatine, carboplatine)	CED	20 Gy carboplatine ou 15 Gy oxaliplatine, 78.8 keV	(pas de carboplatine CED seul) bénéfice thérapeutique important entre l'irradiation seule et irradiation + carboplatine. Oxaliplatine + irradiation de 15 Gy a le même effet que l'irradiation de 20 Gy.	N.A.		
		Pt (carboplatine)	CED ou pompe osmotique (6j)	78.8 keV, 15 Gy	survivants à long terme, pour lesquels le gliome a disparu. Différences entre chimio et chimio-radiothérapie pas significatives ni pour CED, ni pour Pt.	N.A.		survies à long terme exceptionnelles pour le gliome F98
		Pt (carboplatine ou cisplatine)	CED	6 MeV, 15 Gy	Bénéfice thérapeutique. Mais pas de différence significative entre la chimiothérapie et le traitement combiné pour le carboplatine ou le cisplatine.	N.A.		
		Pt (carboplatine, cisplatine) ou IUdR	CED ou pompe osmotique (6j)	78.8 keV, 15 Gy	IUdR, cisplatine et carboplatine CED : pas de différence significative entre radiothérapie seule et la chimio-radiothérapie. Pour carboplatine avec pompe osmotique, le traitement combiné est significativement différent de la RT ou chimiothérapie seule.	N.A.		nombre de rats en vie à la fin de l'étude : 3 sur 13 (i.e. 23 %) pour le groupe ayant reçu uniquement du carboplatine par pompe osmotique et 6 sur 11 (i.e. 55 %) pour ceux traités par carboplatine (p.o.) suivi de 15 Gy
Rousseau 2009 (J. Synchrotron Rad.)	survie rat + F98	I (^{127}I-IUdR)	pompe osmotique 6j	50 keV, 15 Gy	Bénéfice thérapeutique, mais difficile de différencier l'effet chimiothérapeutique d'un potentiel bénéfice du traitement combiné.	N.A.		
Thèse Edouard (2010)	clono F98	I (iomeron)	10 mg/mL	50 et 80 keV, 2, 4, 6, 7 et 8 Gy	SER 10% 2.25 à 50 keV et 1.6 à 80 keV	dépendance à	l'énergie	
	sphéroïdes F98	I (iomeron)	10 mg/mL	50 et 80 keV, 2, 4, 6, 7 et 8 Gy	SER 10% 1.4 à 50 keV et 1.1 à 80 keV	dépendance à	l'énergie	distribution microscopique de l'iode dans le sphéroïde

Thèse Bobyk (2010), Bobyk 2012	clono F98	I (IUdR)	48h d'incubation à 10µM	50 keV, 1.25 MeV, 2, 4, 6 et 7 Gy	SER 10% de 1.93 à 50 keV et 1.52 à 1.25 MeV	dépendance à l'énergie	à 0 Gy, 45% de survie avec l'IUdR
		I (iomeron)	irradiation en solution avec 10 mg/mL d'iomeron	50 keV et 1.25 MeV, 2, 4, 6 et 7 Gy	SER 10% de 1.46 à 50 keV, radioprotecteur à 1.25 MeV	dépendance à l'énergie	à 0 Gy, aucun effet de toxicité de l'iomeron
		I (iomeron + IUdR)	association IUdR 10 µM et iomeron 10 mg/mL	50 keV, 2, 4 et 6 Gy	SER 10% de 2.53	N.A.	pas de saturation des effets, ceux-ci sont augmentés
		Au NPs (1.9 ou 15 nm)	incubation de 24h à 10 mg/mL ou 3h40 respectivement	50 keV, 2, 4, 6 et 8 Gy	SER 10% de 1.22 ou 1.16 (une seule expérience) respectivement	N.A.	peut-être pas beaucoup d'Au dans les cellules
		Au NPs (1.9 ou 15 nm)	irradiation en solution avec 10 mg/mL d'Au NPs	50 keV ou 200 kVp (pour 15nm), 2, 4, 6 et 8 Gy	SER 10% de 1.92, 1.40 respectivement, 1.58 pour 200 kVp	N.A.	
	survie rat + F98	Pt TC	7h d'incubation à 350µM	76.6 et 80.6 keV ; 2, 4, 5, 6, 7 Gy	SER 10% de 1.13 identique pour les deux énergies	pas de dépendance à l'énergie	
		Au NPs 1.9 nm ou 15 nm	CED, irradiation le même jour. Pour les fractions : 5 injections en CED, 5 jours, 4h avant les irradiations.	88 keV, 15 Gy, ou 10 fractions de 4 Gy à 150 kVp (pour les 15 nm)	toxicité des NPs 1.9 nm. Pas d'effet significatif observé sinon. Pour les fractions de 4 Gy : pas d'effet significatif mais 2 animaux vivent plus longtemps.	pas d'effet significatif observé	**"une répartition homogène des NPo au sein ou au voisinage de toutes les cellules tumorales [...] est un élément clef de la réussite du traitement"**
		Pt TC	CED la veille de l'irradiation, 4.2 mM (sans conséquence sur rat sain)	78.8 keV, 15 Gy	PtTC pas de toxicité ni d'effet chimio. Avec PtTC+X, pas de gain thérapeutique significatif en comparaison avec les X seuls.	pas d'effet significatif observé	**"Des études complémentaires pourraient être conduites pour optimiser la distribution et l'internalisation in vivo du PtTC."**
		Pt (carboplatine)	pompe osmotique 6j	γ 6 MV, 15 Gy	survie à long terme de 55% des animaux X+Pt. Pas de dépendence à l'énergie (comparaison avec les résultats de Rousseau à 78.8 keV).	pas de dépendance à l'énergie	55% de survivants à long terme
Thèse Taupin (2013), Delorme 2017	clono F98	Gd (Gd AC, Magnevist)	2.1 mg Gd/mL	25, 31, 40, 49.5, 51, 65, 80 et 1253 keV, 4 Gy	SER max 1.41 à 65 keV	tendance de dépendance à l'énergie, mais pas très significatif	importance des conditions d'irradiation, il faut que les timings soient identiques pour tous lors des expériences
		Gd (GdNP) externes	2.1 mg Gd/mL	25, 31, 40, 49.5, 51, 65, 80 et 1253 keV, 4 Gy	SER max 2.00 à 65 keV	tendance de dépendance à l'énergie	
		Gd NPs adsorbées avec ou sans GdNPs externes	incubation pendant 5h à 2.1 mg/mL, environ 0.6 pg/cellule	25, 31, 40, 49.5, 51, 65, 80 et 1253 keV, 4 Gy	SER max à 65 keV, 2.10 pour adsorbées et 2.47 pour adsorbées + externes	tendance de dépendance à l'énergie	
	survie rat + F98	Pt NPs, test de deux peptides	0.04 mg/mL pendant 24h, 0.009 pg/cellule peptide 1 ou 0.015 pg/cellule peptide 2	78.1, 78.7 et 1253 keV, 4 Gy	SER d'environ 1.3 avant et après K edge, et en moyenne d'environ 1.20 à 1253 keV	tendance de dépendance à l'énergie mais phénomène additionnel à 1253 keV ?	pour les PtNPs, radiotoxicité à 1253 keV. De plus, les PtNPs étaient les plus toxiques sans irradiation: effets conjugués expliquant la radiotoxicité?
		Au NPs, test de deux peptides	0.46 mg/mL pendant 24h, 0.6 pg/cellule peptide 1 ou 0.7 pg/cellule peptide 2	80.4, 81.0 et 1253 keV, 4 Gy	SER d'environ 1.3, pas de différence avant et après K-edge	dépendance à l'énergie entre les "basses" énergies 80.4 et 81 keV, et 1253 keV	
		Au NPs, test de deux peptides	CED, 10 µL, 0.015 µg Au à J13	81 keV, 15 Gy, 5 incidences à J14	pas de toxicité des NPs, mais pas d'effet significatif du traitement combiné	pas d'effet significatif observé	**"Lorsque les paramètres d'injection des NPs seront optimum pour maximiser le recouvrement de la tumeur, nous pourrons envisager de nouveaux essais pré-cliniques."**
Thèse Gimenez (2015)	clono F98	NPs Fe enrichies ou non en ^{57}Fe (test effet Mössbauer)		source Mössbauer CEA, 2h d'irradiation = 4.9 mGy	pas d'effet significatif Mössbauer	pas d'effet significatif observé	effets biologiques inconnus ?
	clono F98	NPs Fe	0.06 et 0.3 mg/mL, incubées 24h	30, 50 et 80 keV, 4 Gy	SER max pour 0.06 mg/mL, environ de 3 pour 30 et 80 keV	dépendance à l'énergie, mais ne suivant pas la courbe à laquelle on peut s'attendre	

montre que l'effet thérapeutique observé est surtout du à l'amélioration de la chimiothérapie, car ce composé est en partie bloqué par la BHE lorsqu'il est administré par voie systémique [Rous 07b, Boby 10].

Enfin, le point mis en valeur dans toutes les thèses concerne la concentration des éléments dans la tumeur : obtenir une distribution de composé suffisante et homogène dans la tumeur est l'une des conditions essentielles pour espérer obtenir un bénéfice thérapeutique.

- Adam étudie divers procédés permettant d'augmenter la concentration d'iode à la tumeur, notamment en injectant le composé dans la jugulaire ou dans la carotide en association ou non avec le mannitol pour perméabiliser la BHE.
- Rousseau utilise des injections intratumorales pour contourner la BHE, *via* une pompe osmotique ou par CED (*Convection Enhanced Delivery*, voir 3.1.3.3).
- Bobyk et Taupin font de la répartition des composés un point central de leurs conclusions.

En conclusion, si les effets thérapeutiques sont encourageants *in vitro* et même en préclinique, la répartition des composés dans la tumeur est un élément clef de la réussite du traitement et peut être considéré à ce jour comme une limite.

2.2.3 Etat de l'art : les NPs pour augmenter la dose à la tumeur

En parallèle de ces travaux, l'équipe RSRM étudie aussi des approches novatrices de la SSRT utilisant d'autres composés pour augmenter la dose dans la tumeur. Les nanoparticules (NPs) sont aujourd'hui le centre d'un engouement scientifique et le contexte de leurs emplois est très diversifié. D'après la norme ISO TS 27687 :2008, les NPs sont des particules mesurant moins de 100 nm dans une de leurs trois dimensions. Cependant, ce terme a été généralisé dans les publications et peut aussi désigner des particules plus grandes. Les rayons X et les NPs peuvent interagir selon différents mécanismes : ainsi, les NPs au Z élevé sont utilisées pour augmenter la production d'électrons secondaires, tandis que d'autres NPs sont par exemple étudiées pour leur capacité à relarguer des médicaments sous l'effet des rayons X [Reti 15].

L'utilisation des NPs pour améliorer la radiothérapie grâce à l'augmentation du dépôt de dose débute avec les travaux pionniers d'Hainfeld en 2004. Dans cette étude, Hainfeld et son équipe montrent la guérison de souris porteuses de tumeurs sous cutanées (86% de survie à long terme contre 20% avec la radiothérapie seule) grâce à l'injection en intraveineuse de NPs d'or suivie d'une radiothérapie à 250 kVp (dose : 26 Gy) [Hain 04]. Ils démontrent aussi que l'effet thérapeutique observé dépend de la concentration en NPs d'or atteinte dans la tumeur.

Depuis, de nombreuses équipes cherchent à exploiter l'efficacité de la combinaison rayonnements et NPs d'atomes lourds. Les diverses études cherchent à améliorer la connaissance des mécanismes physiques, chimiques et biologiques en jeu afin d'optimiser la méthode. En effet, aucun consensus n'a pour le moment abouti quant aux processus physiques (et donc chimiques et biologiques qui en découlent) responsables de l'effet thérapeutique observé. Par exemple, si les électrons Auger étaient initialement désignés comme la cause principale des dégâts à la tumeur, cette théorie est encore aujourd'hui discutée. De plus, l'utilisation d'une NPs semble bénéfique par rapport à des atomes lourds isolés : existe-t-il un "effet collectif" bénéfique du à l'agglomération de plusieurs atomes [Brun 16] ?

Les expériences *in vitro* visant à l'étude du potentiel des NPs pour augmenter la dose à la tumeur dépendent de nombreux paramètres, dont : la lignée cellulaire utilisée, la concentration et

Référence	Modèle de tumeur	NPs	Injection	Irradiation	Observations
Hainfeld 2004	EMT-6 cancer du sein, sous cutané (souris)	1.9 nm AuNPs	intraveineuse	250 kVp rayons X, 26 Gy	* la tumeur prend 8.6 fois plus de NPs que les tissus sains * survie à 1 an améliorée de 4.3% comparé à l'irradiation seule
Le Duc 2011	gliome 9L (rat)	5 nm GdNPs (AGuIX)	intraveineuse	MRT, 50-350 keV (en moyenne 90 keV), dose pic 400 Gy, dose vallée 20 Gy	survie moyenne augmentée d'un facteur 2 pour MRT+AGuiX comparé à MRT seule
Choi 2012	CT26, cancer du colon, sous-cutané (souris)	13 nm NPs Fe	intraveineuse	7.1 keV, 10 ou 40 Gy	* rapport élevé de prise des NPs entre les tissus sains et la tumeur * 80% de régression complète de la tumeur avec 10 Gy+NPs * 100% de régression complète pour 40 Gy pour X et NPs + X mais régression complète plus rapide pour NPs + X
Hainfeld 2013	Tu-2449, tumeur cérébrale maligne (souris)	11 nm AuNPs	intraveineuse	100 kVp rayons X, 35 Gy	* rapport élevé de prise des NPs entre les tissus sains et la tumeur (~19) * survie à 1 an améliorée d'un facteur 3 par rapport à X seuls
Miladi 2014, Laurent 2016	gliome 9L (rat)	2 nm AuNPs, coatées avec Au@DTDTPA-Gd (Miladi) et Au@TADOTAGA-Gd (Laurent)	intraveineuse	MRT, 50-350 keV (en moyenne 90 keV), dose pic 400 Gy, dose vallée 20 Gy	survie moyenne augmentée d'un facteur ~1.8 (Au@DTDTPA-Gd) et ~3 (Au@TADOTAGA) par rapport à MRT seule
McQuade 2015	HT1080, fibrosarcome humain (souris)	2.2 nm Au NPs et 14 nm SPIONs chargés dans des micelles (~100 nm)	intraveineuse	150 kVp rayons X, 6 Gy	* survie moyenne augmentée d'un facteur 1.5 par rapport à la radiothérapie seule * augmentation de la survie à 90 jours augmentée d'un facteur 2.8 par rapport à la radiothérapie seule
Zhang 2015	U14, sous cutané (souris)	2 nm NPs coatées glutathione	intra-péritonéale	rayons gamma 662 keV, 5 Gy	diminution du volume de la tumeur de 66% comparé à l'irradiation sans NPs
Detappe 2016	capan-1	4.5 nm SiGdNPs (AGuIX)	intraveineuse	220 kVp ou 6 MV, 10 Gy	* irradiation kVp avec NPs, augmentation de 90% de la survie moyenne, comparé à l'irradiation seule * irradiation MV, augmentation de la survie de 66%, comparé à l'irradiation seule

Figure 2.11 – *Synthèse d'études de "photoactivation" des NPs in vivo, d'après [Kunc 18]. Les publications relatives sont les suivantes : [Hain 04, Le D 11, Choi 12a, Hain 13, Mila 14, Laur 16, McQu 15, Zhan 15, Deta 16]*

.

la nature des NPs, l'énergie des photons incidents et la localisation des NPs. Il est donc difficile de tirer des conclusions quant aux mécanismes physiques ou biologiques en jeu en comparant plusieurs études entre elles. Dans l'équipe RSRM, Florence Taupin a utilisé au cours de sa thèse trois types de NPs différents : des NPs au Gd (3 nm), des NPs d'or (13 nm) et de Pt (6 nm). Elle a observé que les NPs diminuaient la survie cellule de manière plus importante qu'un agent de contraste pour la même concentration. De plus, même si l'effet observé était préférentiel à basses énergies, la survie cellulaire était aussi impactée à haute énergie (1.25 MeV) par les NPs Gd et NPs Pt, suggérant l'existence d'un autre mécanisme de radiosensibilisation.

La table de la figure 2.11 donne quelques exemples d'études *in vivo* utilisant des NPs pour augmenter le dépôt de dose à la tumeur. L'ensemble de ces résultats permettent d'alimenter la discussion sur certains points centraux qui nous intéresseront dans ces travaux de thèse [Brun 16] :

1. Concernant la **nature des atomes lourds** impliqués : les NPs les plus étudiées sont les NPs d'or, suivies par les NPs de gadolinium et les NPs d'argent. Cependant, de nombreux autres éléments sont aussi testés en parallèle comme le platine, le bismuth, le fer, l'hafnium, le sélénium ou le titanium [Brun 16], voir même des particules hybrides.
2. Concernant les **conditions d'irradiation** : la plupart du temps, les NPs sont utilisées en association à une irradiation de photons, mais leur application à la protonthérapie est de plus en plus étudiée. La dépendance de l'effet thérapeutique observé à l'énergie des photons est variable selon les composés : dans certains cas, un effet bénéfique aux MeV peut être constaté.
3. L'**existence d'un "effet biologique"** est souvent mentionné comme explication des résultats que l'on ne parvient pas à expliquer avec les mécanismes physiques. Les effets biologiques soupçonnés causés par la simple présence des NPs dans la cellule sont : la redistribution dans le cycle cellulaire, l'inhibition des fonctions de réparation de l'ADN, le dysfonctionnement des mitochondries, le stress du réticulum endoplasmique, la production d'espèces réactives de l'oxygène et un potentiel "effet bystander" (des cellules non irradiées en contact de cellules mourantes irradiées entreraient elles aussi en mort cellulaire) [Brun 16]. Les évènements biologiques se déroulant avant l'irradiation suite à l'exposition des cellules aux NPs peuvent donc être responsables d'une part non négligeable des résultats observés.

Nous tâcherons dans ces travaux de bien faire la distinction entre **la radiosensibilisation** et **l'augmentation de dose** provoqué par la présence de NPs dans ou autour des cellules. Dans le cas de l'augmentation de dose, les NPs irradiées émettent des électrons secondaires et participent donc à la déposition d'une énergie plus grande dans les tissus : la dose totale déposée étant plus élevée, les dégâts aux cellules sont plus nombreux. Les NPs "radiosensibilisantes" n'augmentent pas la dose physique déposée dans les tissus lors de l'irradiation. Elles "fragilisent" la cellule qui ne réagit donc plus de la même manière à l'irradiation. De fait, les dégâts produits par un dépôt de dose qui, avant, ne lui était pas fatal, provoquent maintenant la mort de la cellule.

2.2.4 Utilisation de NPs de fer en radiothérapie

Les NPs de fer (NPs Fe) sont de plus en plus utilisées dans le domaine biomédical. Elles peuvent être employées comme transporteur pour délivrer des gènes ou des médicaments de manière ciblée, comme agent de contraste en IRM ou encore pour la destruction de tissus tumoraux par hyperthermie [Sing 10]. De plus, il est possible de les guider dans un tissu ou un organe spécifique par un champ magnétique externe (citer [Muth 15]).

La figure 2.14 récapitule quelques expériences *in vitro* utilisant des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose dans les cellules tumorales.

Dans ce corpus d'études, les cellules sont exposées à des concentrations en fer généralement inférieures à 0.2 mg/mL, et ce la plupart du temps pendant 24h. Les énergies utilisées pour l'irradiation sont variées : certaines publications restent dans la logique de l'utilisation de basses énergies d'irradiation, tandis que d'autres irradient les cellules à des énergies plus élevées allant jusqu'au MeV. Il est d'ailleurs intéressant de constater qu'un effet thérapeutique est aussi parfois constaté à des énergies si élevées [Zhan 18, Khoe 14, Mafa 16].

Peu d'études *in vivo*, à notre connaissance, utilisent des NPs Fe dans le cadre de l'augmentation de dose en radiothérapie : l'équipe coréenne de J.K. Kim avec laquelle nous avons collaboré a publié en 2012 le premier article concernant l'irradiation par rayonnement synchrotron de tumeurs chargées

en NPs métalliques. Au cours de cette étude, Choi *et al.* montre la régression du volume tumoral de tumeurs CT26 sous cutanées chez la souris après injection de NPs Fe Fe_3O_4 et irradiation de 10 Gy à 7.1 keV. L'irradiation seule, en comparaison, ne permet pas la régression de la tumeur [Choi 12a] (voir Fig. 2.12).

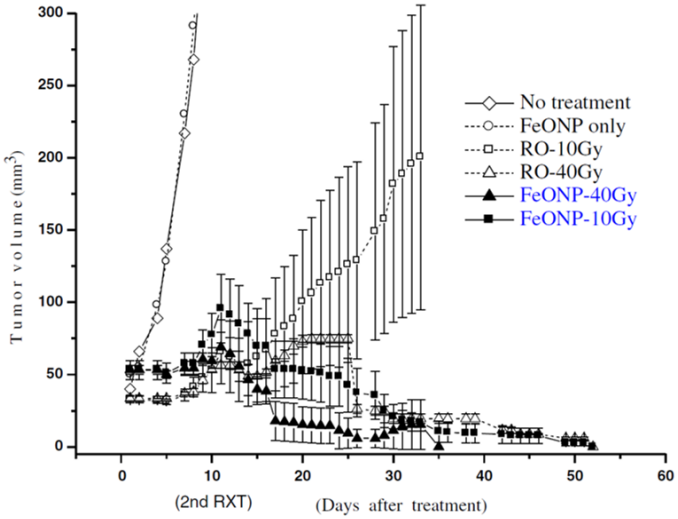


Figure 2.12 – *Evolution de la croissance tumorale de tumeurs CT26 sous cutanées chez la souris avec ou sans injection de NPs Fe_3O_4 suivie d'une irradiation de 7.1 keV à 10 Gy [Choi 12a].*

Aujourd'hui, cette équipe travaille encore avec les mêmes NPs Fe Fe_3O_4 mais appliquées cette fois à une irradiation par un faisceau de protons. Dans le cadre de la collaboration instaurée pendant les travaux de thèse de Paul Gimenez dans l'équipe RSRM, des lots de ces NPs Fe nous sont régulièrement fournis. Les travaux présentés dans ce manuscrit font suite aux travaux de Paul Gimenez. Celui-ci a surtout étudié l'application de l'effet Mössbauer (un mode d'interaction entre les rayons γ et les atomes menant à la production d'électrons secondaires) à la radiothérapie avec des NPs de fer 57. De plus, Paul Gimenez a montré au cours de sa thèse que l'irradiation *in vitro* de cellules ayant été exposées au préalable aux NPs Fe coréennes induit une augmentation de la mort cellulaire par rapport à l'irradiation seule. Il observa une dépendance à l'énergie de ce phénomène ainsi qu'une dépendance à la concentration d'exposition. L'importance de l'effet mesuré (augmentation par trois de la mort cellulaire) reste élevé même à des énergies de 80 keV et motiva la poursuite de ces travaux lors de la thèse présentée dans ce manuscrit.

2.2.5 Résumé : effets physiques, chimiques et biologiques de l'irradiation d'une tumeur ayant accumulé des NPs de fer

L'effet d'augmentation de mort cellulaire observé lors de l'irradiation de cellules contenant des NPs Fe est provoqué par la combinaison de divers processus. Comme dit précédemment, ces mécanismes ne sont pas encore bien élucidés et semblent varier d'un type de NP à l'autre. Cependant, certaines interactions physiques et chimiques connues jouent probablement un rôle et permettent de construire la base d'une théorie. Les interactions principales sont résumées ci-après :

Mécanismes physiques : le fer, dont le numéro atomique n'est pas aussi élevé que celui des

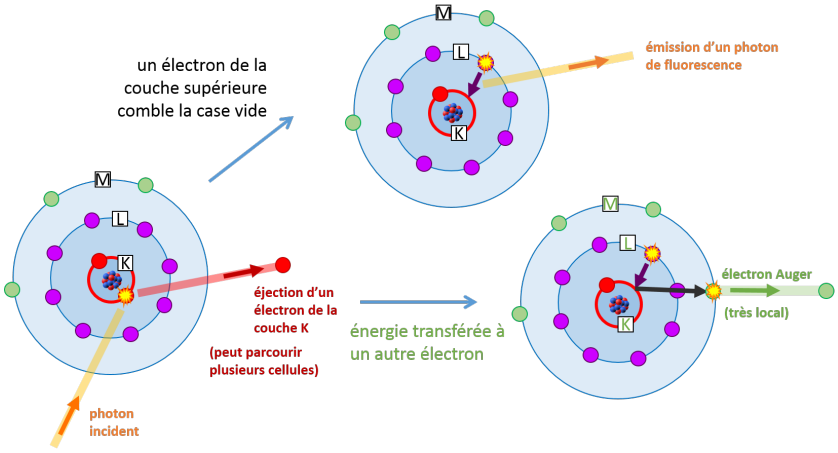


Figure 2.13 – *Schéma illustrant deux phénomènes physiques à l'origine de l'émission d'électrons secondaires lors de l'interaction NPs - rayonnement X : l'effet photoélectrique et la relaxation atomique.*

autres éléments considérés pour ce type d'expérience, a beaucoup plus de probabilité de subir une relaxation non radiative en émettant des électrons Auger que l'or ou le Gd. Au cours des interactions photons-matière, le fer mènera d'une part à la production de photoélectrons, dont l'énergie dépendra de l'énergie du photon incident, et d'autre part à des cascades d'électrons Auger, qui déposeront leur énergie localement (cf Figure2.13).

Mécanismes chimiques : d'autre part, il apparaît régulièrement dans la littérature que les NPs Fe sont capables d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène, probablement *via* la réaction dite "d'Haber Weiss". La réaction d'Haber Weiss génère des radicaux hydoxyles à partir de H_2O_2 et de l'ion superoxide. Elle est donc source de stress oxydatif pour la cellule, mais reste très lente. Cependant, le fer est connu pour catalyser cette réaction : la surface des NPs Fe peut donc participer à la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui à leur tour causeront des dommages à la cellule. Il sera par conséquent important de faire la différence entre l'effet provoqué par les rayons X et l'effet de sensibilisation des cellules par production de ROS.

2.3 Le Chapitre 2 en quelques mots

La radiothérapie consiste à détruire les cellules tumorales en les irradiant, par exemple avec un ou des faisceaux de rayons X. L'impact de ce rayonnement sur les cellules se déroule en plusieurs étapes :

- Tout d'abord, les photons interagissent avec la matière et mettent des électrons en mouvement *via* différents mécanismes d'interaction (notamment l'interaction photoélectrique, la diffusion Compton, ou par relaxation atomique). Les électrons déposent ensuite leur énergie et contribuent à l'ionisation des molécules présentes sur leur trajectoire. Ces phénomènes **physiques** sont très rapides, de l'ordre de la femtoseconde.
- L'ionisation des molécules et/ou leur fragmentation induit la formation de radicaux très réactifs, qui peuvent ensuite se recombiner, se diffuser et former de nouvelles espèces. Ces réactions **chimiques** se déroulent en quelques secondes.
- Les espèces chimiques réactives endommagent les cibles vitales de la cellule, et parti-

culièrement la molécule d'ADN. La cellule est capable de réparer la plupart des lésions, étant quotidiennement confrontée à plus de 10 000 lésions de l'ADN. Cependant, si elle ne parvient pas à réparer correctement ces lésions (dommages trop nombreux ou trop complexes), la cellule entre en apoptose. La réponse **biologique** de la cellule peut apparaître quelques heures ou plusieurs jours après l'irradiation.

La radiothérapie ne permet pas de cibler la tumeur : les photons ont autant de probabilité d'interagir avec la tumeur qu'avec les tissus sains. Les dommages sont donc répartis sur le trajet du faisceau. Une piste d'optimisation de la radiothérapie repose sur l'utilisation de rayonnements X de basse énergie (30-100 keV) couplés à l'accumulation d'atomes de haut numéro atomique ($Z > 50$) dans la tumeur. A ces énergies, les photons interagissent préférentiellement avec les atomes de haut Z : ils arrachent des électrons à ces atomes, qui déposent leur énergie localement et contribuent ainsi au renforcement de la dose.

Historiquement, les effets d'augmentation de dose sont obtenus en concentrant des agents de contraste iodés dans les tissus tumoraux. D'autres composés sont actuellement étudiés pour renforcer encore ce phénomène : parmi eux, les nanoparticules (NPs) font l'objet d'un fort engouement ces dernières années. De nombreux éléments ont été testés (Au, Gd, Hf, Ag, ...) et les résultats, souvent spécifiques de la NP étudiée, suggèrent que les phénomènes physiques ne constitueraient pas toujours la seule source de l'effet thérapeutique observé. Les NPs d'oxyde de fer (NPs Fe) ont surtout été expérimentées *in vitro* : ces travaux de thèse font suite aux travaux de Paul Gimenez qui montra que l'exposition des cellules de gliomes aux NPs Fe pendant 24 h permettait de multiplier par 3 la mort cellulaire lors d'une irradiation à 30 et 80 keV [Gime 15].

Nous veillerons au cours de cette thèse à faire la différence entre la capacité des NPs à augmenter le dépôt de dose et la capacité des NPs à radiosensibiliser les cellules (c'est-à-dire rendre les cellules tumorales moins résistantes pour une même dose délivrée).

Lignée cellulaire	NPs	Concentrations utilisées	Incubation	source de radiation	Toxicité des NPs	Effet mesuré	Référence
MCF-7, Caco-2, 3T3	mixtes Fe_2O_3-Fe_3O_4, non *coatées* (9-20 nm), *coatées* avec citrate (7-17 nm) ou malate (6-16 nm)	0.1 mg/mL	24h	120 kV X-ray tube	viabilité >80% sauf pour les Caco-2+non *coatées* plutôt autour de 70%	augmentation des ROS de plus de 400 % après irradiation de 1 Gy, pour les NPs *coatées*, sauf pour 3T3. Moins de 100% pour les NPs non *coatées*. Avec 3 Gy : effet plus faible ou identique	Klein 2014
MTG-B	100 nm *coatées* à l'amidon Micomod Partikeltechnologie GlbH Rostock Germany	0.2 mg/mL	48 à 72h	662 keV cesium-137 gamma irradiation	pas de toxicité pour l'incubation pendant 48h	4 Gy : avec 48h pas d'effet observé, avec 72h, un effet observé 25% diminution en clono. Et 40% de fer en plus dans les cellules	Mazur 2013
HeLa et MCF-7	IONPs Fe_3O_4 *coatées* Dextran 15 nm	10, 40 et 80 µg/mL	24h	6 MV	pas d'effet cytotoxique significatif	2 Gy. Influence du *dose rate* nulle pour pas de NPs. Augmenter le *dose rate* et les concentrations des NPs augmente aussi la cytotoxicité (au max 370 cGy/min, min 43 cGy/min) REF max = 1.21 (=SER)	Khoshgard 2017
A549	Fe_3O_4 avec différents *coatings* dont TAT. Taille cristaux 9-12 nm / 127 nm dans l'eau et 202 nm dans le milieu complet (taille hydrodynamique)	0.5 mg/mL	24h	non explicité	pour TAT > 90%	5 Gy : pour non *coatées*, Dx-ECH et Amine, pas de différence significative observée entre radiation et NP+radiation sauf amine le jour 3. Pour TAT, tous les jours significatifs 3,5 et 7 et jour 7 : effet de 1.5	Hauser 2016
CT26	FeO *coatées* Alginate, 13 à 15 nm après *coating*, plutôt 10 nm avant *coating*	de 0 à 2 mg/mL	24h	7.1 keV	aucun effet entre 0 et 2 mg/mL	la perte de viabilité des cellules irradiées augmente de 50 ou 70% avec les cellules traitées à 2 mg/mL à 5 ou 20 Gy	Choi 2012
MCF-7	SPIONs avec ou sans citrate, mixtes Fe_3O_4 et Fe_2O_3, entre 3 à 10 nm pour les sphériques et 6 à 20 pour les polygonales	0.1 mg/mL	24h	120 kV X-ray tube	viabilité > 90% sauf les non *coatées*, 87% après 72h	3 Gy. Peu d'influence sur les ROS des ions Fe2+ et Fe3+ seuls. Avec les NPs augmentation de 150%sans irradiation et 300 % avec irradiation. Pour SPIONs HT seuls, pas de différence significative entre avec ou sans RT, 300 % d'augmentation de ROS.	Klein 2012
U251	Fe_3O_4-OA, Ag NPs, Fe_3O_4@Ag, toutes environ 10 nm de diamètre	3.90 µg/mL, 1.29 µg/mL, 3.90/1.29 µg/mL	24h	6-MeV X-rays (200 cGy/min)	> 82 %	SER : 1.35, 1.50, 1.8 (*a priori* 4 Gy selon la courbe)	Zhang 2018
F98	Fe NPs non soniquées, plutôt de la centaine de nm	0.06 mg/mL , 0.3 mg/mL	24h	30 keV, 50 keV, 80 keV	toxicité de 1.3	effets max à 30 et 80 keV et pour 0.06 mg/mL avec SER de 3	Paul Gimenez Thèse 2015
C6, DU145, LNCaP	Fe NPs magnétite	0.2 mg/mL	24h	200 kV ou K-edge du fer (synchrotron)	aucun effet en dessous de 2 mg/mL	en monochromatique : diminution de la survie multipliée par 3 à 9 ; en polychromatique : peu ou pas d'effet	Kleinauskas 2012
DU-145	IONPs Fe_3O_4, 20 nm, *coatées* Dextran (NH2-NanoMag)	1, 2 ou 3 mg/mL	48h	6 MeV	aucun effet à 1 mg/mL	à 1 mg/mL : SER 4Gy = 1.2	Khoei 2014
HeLa	IONPs *coatées* avec Dextran	0.02 et 0.05 mg/mL	6, 12 et 24h	6 MeV	aucun effet significatif	DEF : 1.19 pour 0.02 mg/mL et 1.49 pour 0.05 mg/mL	Mafakhei 2016

Figure 2.14 – *Synthèse d'études in vitro utilisant des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose dans les cellules tumorales. Dans l'ordre, les références sont : [Klei 14, Mazu 13, Khos 17, Haus 16, Choi 12a, Klei 12a, Zhan 18, Gime 15, Klei 12b, Khoe 14, Mafa 16]. En gris : références utilisant les mêmes NPs Fe que celles utilisées pendant ces travaux de thèse.*

Chapitre 3

Traverser la BHE

Sommaire

3.1 Comment franchir la Barrière Hémato-Encéphalique ? 74
3.1.1 Barrière Hémato-Encéphalique et Barrière Hémato-Tumorale 74
3.1.2 Traitement local, traitement systémique et effet EPR 75
3.1.3 Quelques méthodes employées 77
3.2 Un Cheval de Troie pour améliorer le traitement des tumeurs 82
3.2.1 Macrophages associés aux Tumeurs : de Dr Jekyll à Mr Hyde 82
3.2.2 Les macrophages comme Chevaux de Troie pour traverser la Barrière Hémato-Tumorale 85
3.3 Utilisation des ultrasons pour ouvrir localement la BHE 91
3.4 Le Chapitre 3 en quelques mots 92

Nous avons abordé dans le chapitre précédent le potentiel des NPs Fe pour augmenter la dose dans la tumeur. Une des conditions nécessaires au succès de cette méthode réside dans la distribution optimale des NPs dans la tumeur. Le transport des agents thérapeutiques dans les tumeurs cérébrales est cependant limité par la présence de la BHE. Ce chapitre est consacré à une étude bibliographique des méthodes employées pour franchir, contourner, rompre ou modifier la BHE. Nous nous attarderons un peu plus longuement sur les deux méthodes utilisées pendant cette thèse : l'utilisation de monocytes/macrophages comme chevaux de Troie et l'emploi d'ultrasons associés aux micro-bulles pour ouvrir mécaniquement la BHE.

3.1 Comment franchir la Barrière Hémato-Encéphalique ?

3.1.1 Barrière Hémato-Encéphalique et Barrière Hémato-Tumorale

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière anatomique et biochimique présente dans le cerveau. Elle agit comme un filtre extrêmement sélectif qui contrôle le passage vers le cerveau des substances présentes dans le sang [Ober 16]. Ainsi, l'apport en nutriments et l'élimination des déchets sont régulés par de nombreux processus actifs, tandis que les autres agents sont bloqués par la barrière. De cette manière, la BHE protège le cerveau d'éventuels composés toxiques ou de pathogènes pouvant circuler dans la sang. Cependant, ces propriétés desservent l'efficacité de la chimiothérapie du glioblastome : la plupart des agents médicamenteux ne peuvent pénétrer dans la tumeur en quantité suffisante pour espérer un bénéfice thérapeutique.

Les composants essentiels de la BHE sont les cellules endothéliales, c'est-à-dire les cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins. Celles-ci sont reliées entre elles par des protéines assurant l'étanchéité entre chaque cellule, appelées "jonctions serrées" (voir figure 3.1). Ces jonctions serrées n'existent pas dans la microvascularisation des autres tissus à l'exception de certains cas particuliers (les yeux, par exemple). En plus de ces jonctions serrées, des mécanismes actifs de "pompes" peuvent efficacement renvoyer dans la circulation sanguine les molécules qui seraient parvenues à traverser.

Les cellules endothéliales coopèrent avec d'autres types cellulaires, notamment les astrocytes et les péricytes. Les péricytes sont fixés sur les cellules endothéliales du côté opposé au compartiment sanguin. Ils ont un rôle de contrôle de la prolifération des cellules endothéliales et interviennent dans la néovascularisation. Cellules endothéliales et péricytes sont recouverts d'une couche de protéines appelée "lame basale" mesurant une dizaine de nm d'épaisseur.

Enfin, le dernier élément de la BHE est composé des pieds enchevêtrés des astrocytes : ces cellules, comme nous l'avons vu précédemment (cf 1.1.2), font la liaison entre les vaisseaux sanguins et les neurones. Les pieds astrocytaires recouvrent ainsi 99% de la surface des capillaires et forment ce que l'on appelle la "glia limitans". En plus de fournir nutriments et oxygène aux neurones, la glia limitans régule la perméabilité de la BHE en interagissant avec les cellules endothéliales.

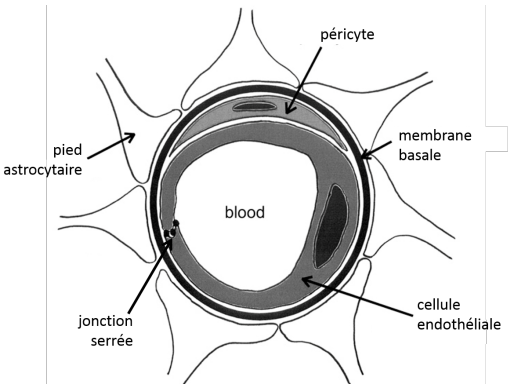


Figure 3.1 – *Schéma illustrant les composants de la Barrière Hémato-Encéphalique : les cellules endothéliales sont reliées entre elles par les jonctions serrées. La glia limitans participe à la régulation de la perméabilité de la BHE. D'après [Stam 10].*

La tumeur a un constant besoin d'approvisionnement en oxygène et en nutriments pour alimenter sa croissance rapide. Lorsque cette demande ne peut plus être satisfaite, les cellules se

retrouvent en hypoxie et émettent des signaux biochimiques promouvant l'angiogénèse. Cependant, les néovaisseaux qui en résultent sont la plupart du temps immatures. L'architecture de la BHE est elle aussi incomplète : les astrocytes, notamment, ne remplissent pas leur rôle de jonction. De plus, les tissus tumoraux seraient capables de relâcher des facteurs de perméabilisation, contribuant à l'ouverture de la BHE là où elle était encore fonctionnelle et complète [Robe 97]. L'ensemble de ces dysfonctions participent à la perméabilisation de la BHE au niveau des gliomes. La présence d'un gliome impacte donc la structure de la BHE au niveau de la zone tumorale, allant jusqu'à la rupture dans certaines de ces régions. C'est d'ailleurs ce phénomène qui permet la détection des gliomes par imagerie : la rupture cause une "fuite" des agents de contraste dans la tumeur, tandis que la BHE du cerveau sain bloque ces composés. La BHE modifiée dans les gliomes est appelée la **Barrière Hémato-Tumorale** (BHT).

Dans une tumeur cérébrale, la rupture de la BHE est hétérogène : certaines zones présentent une rupture partielle tandis que la BHE reste intacte sur de nombreuses portions : ces régions suffisent à empêcher une distribution complète et homogène des composés chimiothérapeutiques dans la tumeur, même dans le cas de petites molécules [Tell 15]. Ainsi, la limite physiologique des pores dans la BHT chez le rat est de 12 µm selon [Sari 09].

3.1.2 Traitement local, traitement systémique et effet EPR

Nous l'avons vu dans le chapitre 1, des stratégies variées sont employées pour tenter de traiter le glioblastome. Nombre de publications attestent de la mise au point de traitements prouvant leur efficacité *in vitro*, mais en comparaison très peu d'études sont disponibles sur le transfert en préclinique et en clinique de ces méthodes [Blak 08]. L'efficacité des traitements dépend généralement des concentrations de médicaments ou de composés atteintes dans la tumeur. Le passage au *vivo* se heurte alors à des difficultés pour atteindre les concentrations requises pour le succès du traitement : ces difficultés comprennent par exemple les zones hypoxiques, une vascularisation anormale, des gradients de pression intratumoraux ou des barrières biologiques.

La répartition des NPs dans la tumeur : une question centrale des thérapies contre le GBM utilisant des NPs

La BHE régule précisément l'accès au cerveau des substances sanguines : dans une étude répertoriant les composés thérapeutiques applicables aux traitements de maladies du système nerveux central, seulement quelques composés sur les 7 000 disponibles peuvent efficacement franchir la BHE [Wood 14]. Cette problématique est omniprésente dans les thérapies utilisant des NPs pour traiter le GBM (PTT, PDT, ... voir 1.3.3.4). La répartition homogène des NPs dans la tumeur est souvent montrée comme un point critique, sinon le point limitant, par les équipes travaillant dans ce domaine. En PTT, Eldridge souligne qu'une distribution inhomogène des NPs diminue l'efficacité du traitement, qui ne concernera alors que quelques zones tumorales restreintes, et risque d'endommager les tissus sains [Eldr 16]. Dans une étude suite à des essais clinique, Van Landeghem *et al.* ont analysé l'effet d'hyperthermie provoqué par des NPs magnétiques (MagForce) soumises un champ magnétique alternatif pour le traitement du GBM. Les NPs ont été injectées directement dans la tumeur *via* des cathéters, afin de s'affranchir de l'étanchéité de la BHE. Dans l'observation post-mortem de coupes de cerveaux, l'équipe a constaté que les NPs étaient soit dispersées, soit sous forme d'aggrégats, mais toujours distribuées autour des sites d'injection (cf Fig. 3.2). De plus, des zones de nécrose, caractéristiques du développement du GBM, ne contenaient aucune NPs : ces deux éléments indiquent la nécessité de l'amélioration de la distribution des NPs dans la tumeur.

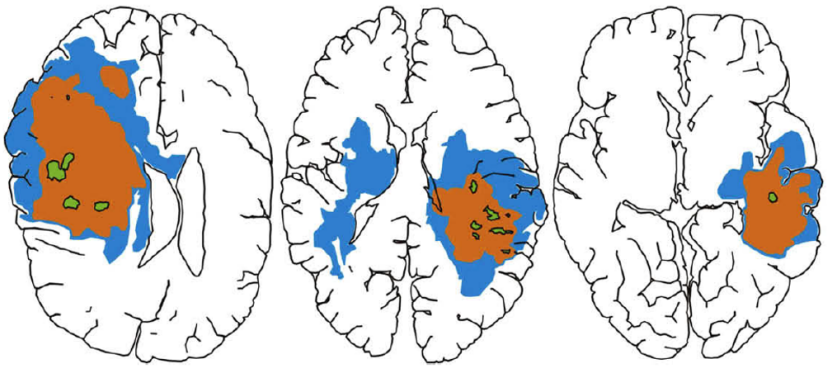


Figure 3.2 – *Illustration de coupes de cerveaux des patients, étude post-mortem de l'utilisation des NPs magnétiques pour la thérapie du GBM. [Bleu] : limites de la tumeur. [Orange] : zones nécrotiques. [Vert] : zones contenant des agrégats de NPs magnétiques [Land 09].*

Différentes approches sont donc étudiées pour surmonter, contourner, rompre ou manipuler la BHE. On distingue en règle générale deux grands types de stratégies : les traitements locaux et les traitements systémiques. Les avantages et les inconvénients de ces deux types de traitement sont résumés dans le tableau 3.1.

Les traitements systémiques sont, dans la majorité des cas, les traitements les moins invasifs. Ils ont l'avantage d'être moins lourds pour le patient et ne nécessitent pas de procédure chirurgicale. Ils consistent le plus souvent en une prise orale ou une injection intraveineuse d'un composé. Le composé se retrouve alors dans la circulation sanguine et s'accumule dans la tumeur par un processus passif connu sous le nom d'"effet EPR" (*Enhanced Permeability and Retention*). L'effet EPR est du à la circulation anormale des molécules et des fluides au niveau de la BHE tumorale. Ces "fuites" permettent aux composés de s'accumuler petit à petit dans la tumeur, plus particulièrement dans les zones perfusées par vascularisation défectueuse.

Néanmoins, ce processus passif n'est pas spécifique de la tumeur : les tissus sains absorbent potentiellement aussi le composé présent dans le sang, n'étant de surcroît pas protégés par une barrière telle que la BHE. Ce type de traitement peut donc aussi induire une toxicité dans des tissus à préserver. Les organes jouant un rôle de filtre (foie, rate, reins) sont particulièrement sensibles : lorsqu'ils circulent dans les vaisseaux sanguins, les composés peuvent être internalisés par des cellules immunitaires circulantes, qui vont ensuite se regrouper dans ces trois organes. En plus de la toxicité engendrée, ce phénomène est aussi un frein à la distribution des composés dans la tumeurs, puisque ceux-ci sont capturés et stockés dans d'autres organes. L'effet EPR ne permettant pas d'accumuler efficacement les composés, il est nécessaire d'injecter des concentrations importantes de composés pour que la fraction distribuée dans la tumeur soit suffisante pour obtenir un effet thérapeutique. Les concentrations injectables sont donc limitées par la toxicité aux organes sains qui en découle.

Enfin, l'effet EPR ne résout pas le problème de l'homogénéisation de la distribution des composés. En proliférant, les cellules tumorales ont une tendance à être de plus en plus éloignées des capillaires : ces zones isolées, non vascularisées, ne sont pas atteintes avec l'effet EPR alors qu'elles sont source de résistance tumorale aux traitements.

Les traitements locaux permettent de contourner la BHE : les composés sont injectés ou déposés directement dans la zone tumorale. D'autre part, ce type de procédé limite la toxicité aux autres organes. Les traitements locaux représentent un sujet clef depuis les 30 dernières années

[Chak 18] : chaque méthode locale tente de repousser les limites des disques Gliadel (cf 1.3.2.2). Les nouveaux outils développés permettent aujourd'hui de réguler le taux de libération de l'agent thérapeutique. La surface des composés peut être optimisée : pour augmenter la pénétration du médicament dans la tumeur, et ne cibler que les cellules néoplasiques grâce à leurs marqueurs membranaires.

Cependant, les traitements locaux sont invasifs et lourds pour le patient : une procédure chirurgicale est souvent nécessaire pour la mise en place de l'outil. Celle-ci devra être répétée pour une éventuelle deuxième administration du médicament. Par ailleurs, même si les efforts de recherche vont dans ce sens, la pénétration du composé dans les tissus reste la plupart du temps limitée et celui-ci reste relativement localisé autour du site de l'injection.

Enfin, qu'ils soient accumulés dans la tumeur par des traitements systémiques ou locaux, les composés peuvent être altérés prématurément, phagocytés, subir des dégradations chimiques ou être transportés hors de la tumeur par divers mécanismes. Les plus petites molécules, par exemple, ne sont souvent pas retenues par les tissus tumoraux et retournent à la circulation sanguine par diffusion.

	Avantages	**Inconvénients**	**Exemples**
Local	- contourne la BHE - augmente la concentration des médicaments dans la tumeur - délivrance du médicament uniquement au site cible - le traitement peut être donné pendant la chirurgie	- procédures chirurgicales nécessaires - ne peut pas être rempli à nouveau sans une procédure - pénétration limitée dans les tissus tumoraux - développement de mécanismes de résistance	- polymères - injection directe
Systémique	- ne nécessite pas de procédure chirurgicale - possibilité d'ajuster/de contrôler le dosage du médicament - possibilité de créer plusieurs régimes de dosages multiples - peu invasif et moins lourd pour le patient	- diffusion à des endroits non désirés - concentrations plus faibles dans le site cible - pénétration limitée dans les tissus tumoraux - développement de mécanismes de résistance	- voie orale - voie intraveineuse

Table 3.1 – *Récapitulatif des principaux intérêts et inconvénients des thérapies locales et systémiques, d'après [Chak 18].*

3.1.3 Quelques méthodes employées

Cette section donne un aperçu de quelques méthodes employées pour répartir des composés dans les tumeurs cérébrales. Le but n'est pas de faire un descriptif exhaustif de méthodes actuellement employées mais plutôt de prendre du recul sur les techniques existantes et de se questionner sur celles qui seraient adaptables aux NPs utilisées dans ces travaux de thèse. Quels sont les protocoles envisagés aujourd'hui ? Quelles sont les limites de ce qu'il est possible de réaliser au niveau clinique ?

3.1.3.1 Délivrer l'agent de façon systémique

Délivrer l'agent en injection intra-veineuse ou par voie orale :

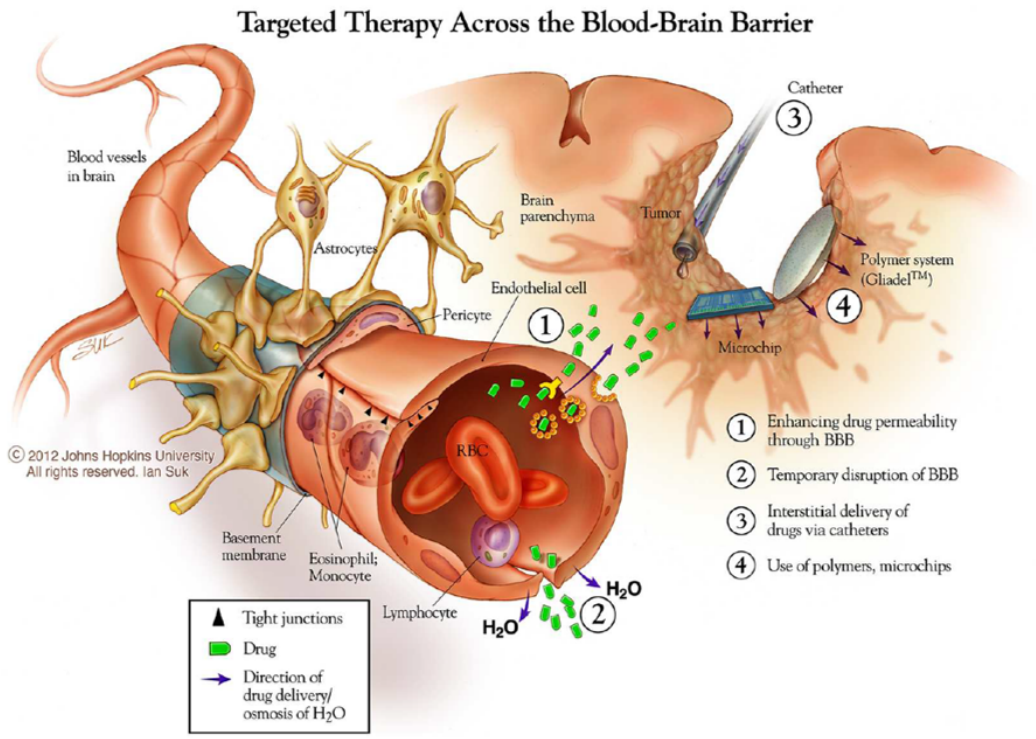


Figure 3.3 – *Exemples de stratégies employées pour atteindre les tumeurs cérébrales malgré la présence de la BHE : (1) augmenter la capacité du médicament à passer à travers la barrière, (2) augmenter temporairement la perméabilité de la barrière, (3) utilisation de cathéters pour délivrer directement les médicaments, (4) utilisation d'objets implantables comme les disques de polymères ou les microchips. Copyright : Ian Suk, Johns Hopkins University, 2012.*

La plupart des agents thérapeutiques anti-cancéreux sont délivrés de cette manière. La possibilité d'injecter de hautes doses de médicaments a été étudiée pour plusieurs composés : si elle permet d'augmenter la concentration du composé dans la tumeur, cette méthode reste limitée par la toxicité systémique associée. Cependant, cette stratégie s'est révélée efficace avec le methotrexate dans le cadre du traitement des lymphomes primaires du SNC par exemple [Blak 08].

Délivrance intra-artérielle avec rupture de la BHE :

La délivrance intra-artérielle consiste à délivrer l'agent directement dans une artère et non dans une veine. Cette méthode permet théoriquement de diminuer la part de composés métabolisés par l'organisme, puisque ceux-ci atteignent directement le cerveau sans passer par le coeur. Cependant, la délivrance intra-artérielle seule ne permet pas à ce jour d'améliorer le pronostic dans le cas des tumeurs cérébrales [Blak 08]. Il est possible, en association avec cette méthode, d'amplifier l'effet EPR en ouvrant temporairement la BHE.

Rupture de la BHE :

L'ouverture de la BHE peut être réalisée de manière chimique (mannitol, cytokines, molécules régulant la perméabilité des vaisseaux sanguins) ou mécanique (ultrasons). L'ouverture artificielle de la BHE concomitante avec une injection intra-artérielle de médicament mène à de meilleurs résultats que l'injection intra-artérielle seule. Le plus souvent, elle est réalisée par un choc osmotique causé par l'injection intraveineuse d'un composé (le mannitol par exemple), qui mène au rétrécissement des cellules endothéliales. Des études précliniques prouvent que ce procédé permet en effet d'augmenter la concentration d'agent thérapeutique dans la tumeur. Cependant, il est aussi souvent associé à

des effets secondaires provenant notamment du cathéter et de l'augmentation de la neurotoxicité du médicament qui se retrouve aussi en plus grande quantité dans le cerveau sain. D'une manière générale, le manque d'études ne permet pas de conclure sur l'utilisation de cette méthode. Celle-ci reste donc limitée à un nombre restreint de patients car les procédures sont complexes, chères, et associées à des complications peu fréquentes mais potentiellement graves [Blak 08].

D'autres agents permettent d'ouvrir la BHE de manière chimique : la bradykinine, par exemple, détruit les jonctions serrées en intervenant sur les signaux qui maintiennent son intégrité. Une fois les composés thérapeutiques accumulés dans la tumeur, ceux-ci peuvent aussi rapidement être éliminés des tissus par divers processus biologiques ou physiques. Certaines études proposent donc l'injection d'agents inhibiteurs de ces efflux actifs co-administrée avec les composés permettant l'ouverture de la BHE, mais cette stratégie provoque une augmentation de la toxicité du traitement d'après [Ober 16].

L'ouverture de la BHE par ultrasons serait plus localisée et mieux tolérée par les tissus que l'ouverture chimique [Blak 08]. Lors d'études précliniques, cette méthode permit de renforcer l'accumulation des médicaments dans les tumeurs sans provoquer de lésions ou de dommages permanents [Chak 18]. Nous reviendrons sur cette stratégie dans la section 3.3.

Remarque : la radiothérapie conventionnelle permet aussi d'augmenter la perméabilité de la BHE en préclinique et en clinique. En conséquence, le TMZ est plus efficace lorsqu'il est associé à la radiothérapie. Le fractionnement de la radiothérapie est donc aussi bénéfique pour la chimiothérapie, car chaque session permet d'ouvrir la BHE pour maximiser la délivrance de l'agent thérapeutique. De plus, la réparation de la BHE permet de maintenir la concentration de l'agent dans la tumeur en évitant leur diffusion [Blak 08].

Un premier objectif, atteint par ces stratégies de rupture, consiste à faire passer les composés thérapeutiques à travers la BHE. Cependant, il faut ensuite que les composés puissent se répartir dans la totalité de la tumeur et y rester suffisamment longtemps pour que l'effet thérapeutique puisse être observé [Wood 14].

3.1.3.2 Microsystèmes implantables

Gliadel La FDA a approuvé l'utilisation des Gliadel en 1996 : il s'agit de disques de polymère biodégradables imbibés de BCNU (carmustine) et placés dans la cavité après résection de la tumeur. Les Gliadel sont en général bien tolérés et les effets secondaires sont rares. De plus, le traitement est local, ce qui évite la toxicité systémique du médicament. Cependant, la distribution de carmustine hors de la cavité de résection reste modeste [Blak 08]. Ces bénéfices limités sont notamment dus au fait que la forme de disque ne permet pas un contact optimal avec l'intérieur de la cavité [Chak 18].

Hydrogels injectables Pour remédier aux limites des Gliadels, d'autres méthodes ont été étudiées permettant de délivrer de plus grandes doses d'agents thérapeutiques. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation de gels qui diffusent les médicaments au cours du temps. Les gels, à l'inverse des Gliadel, peuvent s'adapter parfaitement à la forme de la cavité. Des essais cliniques de phases I et II ont permis d'étudier le potentiel du gel ReGel (ReGel, Protherics, Londres, UK) imbibé de paclitaxel pour traiter les tumeurs solides puis les cancers de l'œsophage (traitement "OncoGel"). Ce traitement ne requiert pas l'opération nécessaire à l'implantation des Gliadel car le gel peut être injecté dans la tumeur avec une aiguille : en effet, le gel est visqueux entre 5 et 15 degrés (pour l'injection) et se gélifie à des températures proches de 37°C. Les premiers essais cliniques montrent que le gel permet de diffuser le

paclitaxel pendant 4 à 6 semaines et que cette diffusion reste limitée au site tumoral [Vuke 07, DuVa 09]. Les essais précliniques de Tyler *et al.* se sont intéressés à l'utilisation d'OncoGel pour le traitement des tumeurs cérébrales chez le rat. La survie des animaux passe de 31 jours avec OncoGel (ReGel + paclitexel) à 83 jours avec OncoGel et radiothérapie. La survie des rats pour la radiothérapie seule est de 26 jours. Le placébo et le ReGel sans paclitexel entraîne des survies de 13 et 14 jours respectivement [Tyle 10].

Les systèmes à microréservoirs permettent de délivrer de grandes quantités de médicaments solides ou liquides dans les tumeurs. Cima *et al.* utilisent des microréservoirs en PLLA (*poly(L-lactic acid)*) et LCP (*liquid crystal polymer*) dans lesquels du témozolomide est encapsulé pour le traitement des gliomes chez le rat [Ong 15]. Les microréservoirs sont troués, permettant ainsi au témozolomide de se diffuser pendant plusieurs jours. Leur implémentation permet d'augmenter significativement la survie des animaux en études précliniques. Cependant, à la différence des gels qui diffusent les composés pendant plusieurs semaines, la délivrance des agents thérapeutiques par les systèmes à microréservoirs est de courte durée. Une nouvelle version de ces microréservoirs a donc été développée et permettrait aujourd'hui de libérer le composé de manière linéaire pendant 200 jours [Chak 18]. D'autres systèmes de microréservoirs ont été développés, comme les micropuces de polymères de l'équipe de Langer. Ces micropuces mesurent 1.2 cm de diamètre et 480 à 560 microns de large. Elles possèdent 36 réservoirs remplissables avec différents médicaments, qui peuvent être libérés indépendamment à des moments distincts [Gray 03].

Systèmes micro-électro-mécaniques Il s'agit de microréservoirs fermés par une membrane en or et contenant un médicament. Lorsqu'un potentiel positif est appliqué, la membrane se corrode électrochimiquement et se transforme en substance soluble. Le microréservoir libère alors son contenu. Ces procédés permettent d'utiliser différents types de médicaments, puis de les libérer selon des profiles complexes tout en contrôlant précisément la dose délivrée. Ils donnent des résultats précliniques encourageants mais sont freinés par la lourde prise en charge du patient qu'ils nécessitent : une opération chirurgicale est nécessaire pour implanter et pour enlever le système [Chak 18].

3.1.3.3 La CED (*Convection Enhanced Delivery*)

L'injection de NPs en intratumoral dans un glioblastome ne permet pas une distribution optimale des NPs : par exemple, dans l'étude de Van Landeghem *et al.*, les NPs ne sont retrouvées qu'au niveau des sites d'injection dans les coupes de cerveau [Land 09]. Ce type d'injection compte sur la diffusion "passive" des composés (gradient de concentration). La CED, elle, utilise la dynamique des fluides pour la diffusion des médicaments et ainsi obtenir une distribution plus large de l'agent et une amélioration de la pénétration des médicaments dans les tissus tumoraux autour du point d'injection.

La CED fonctionne grâce à des cathéters placés localement dans et autour de la tumeur. Les agents anticancéreux sont directement injectés sous pression hydrostatique *via* ces cathéters. Cette approche est notamment intéressante pour les agents trop toxiques lorsqu'ils sont injectés en intraveineuse ou trop gros pour pouvoir traverser la BHE [Blak 08]. La CED est utilisée pour les immunothérapies voire les thérapies cellulaires. Dans les études précliniques, elle permet une distribution large et uniforme des agents anti-tumoraux. Cependant, le passage au stade clinique est plus complexe : la masse tumorale est bien plus importante et hétérogène. Les changements d'anatomie du milieu, la présence d'oedème provoque des fuites et des distributions non prévisibles et inégales

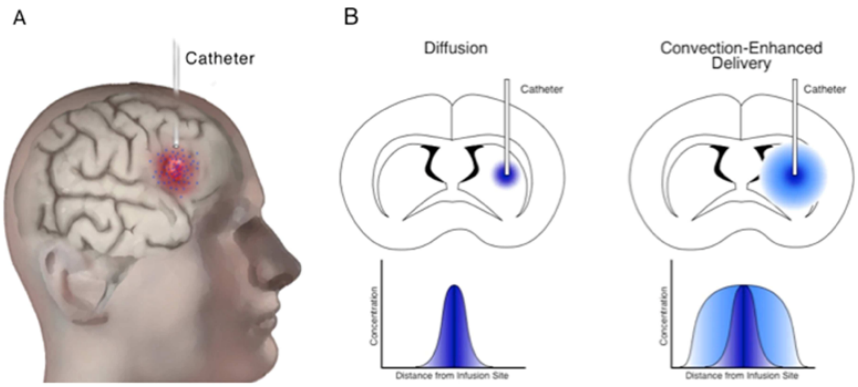


Figure 3.4 – *Illustration de la méthode CED. (A) Les composés sont injectés dans la tumeur par placement d'un cathéter. La distribution des composés qui en résulte permet un meilleur recouvrement tumoral qu'une injection intratumorale simple (B). D'après [Seo 17].*

[Chak 18]. La CED a notamment fait l'objet de deux essais cliniques de phase III (PRECISE et TransMID). Ces deux essais ont montré que cette méthode avait une toxicité acceptable mais son efficacité s'est avérée variable [Blak 08]. La réalisation de la CED en utilisant de nombreux cathéters implantés dans la tumeur permettrait d'améliorer la distribution du composé malgré l'hétérogénéité et la taille de la tumeur, mais ce procédé est techniquement difficile à mettre en place et son efficacité n'a pas été démontré en clinique.

3.1.3.4 Ingénierie moléculaire et NPs

Les NPs sont utilisées pour leur capacité à encapsuler des agents thérapeutiques ou pour leur intérêt en tant qu'agent à elles seules. De multiples sortes de composés de formes variées et de taille nanoscopique sont créés pour l'application au transport de molécules à travers la BHE : nanofibres, liposomes, NPs lipidiques, NPs, nanocapsules, nano-émulsions, ... Ces composés sont étudiés et optimisés pour améliorer leur pénétration dans les tissus tumoraux, contrôler la vitesse de libération du médicament qu'ils renferment et éviter la toxicité aux tissus lors de l'injection. De plus, il est possible de modifier la surface des NPs de façon à ce qu'elles ne ciblent que certaines cellules (ligands, protéines, ...).

Pour illustrer **l'importance du *coating***, nous pouvons citer les expériences de Hanes *et al.* sur la distribution du Paclitaxel (un médicament chimiothérapeutique) dans les tumeurs cérébrales [Nanc 14]. Hanes et son équipe ont démontré que l'encapsulation de Paclitaxel dans des NPs de PLGA (poly(acide lactique-co-glycolique)) contribuait à augmenter significativement la survie d'animaux porteurs de tumeurs cérébrales par rapport au Paclitaxel seul. Les composés ont été délivrés par une injection intratumorale. L'inhibition de la croissance tumorale a encore été augmentée en enrobant les NPs de PLGA par du PEG (polyéthylène glycol). Ces études ont contribué à démontrer la capacité des NPs "PEGylées" à diffuser efficacement dans les tissus et à engendrer une distribution plus uniforme dans la tumeur.

Enfin, il est aussi possible de concevoir les NPs pour **augmenter leur propension à passer la BHE**. Les molécules lipophiles sont parmi les seules molécules capables de passer la BHE relativement efficacement. Certaines études s'axent donc sur le développement d'agents plus lipophiles, la mise au point d'analogues de médicaments lipophiles, la liaison de la molécule thérapeutique à un système de transport liposomal ou encore son encapsulation dans des NPs lipophiles. Ces

différentes stratégies montrent des résultats encourageants en préclinique [Blak 08].

La BHE comporte de nombreux systèmes de transport pour faire passer les molécules d'un côté ou de l'autre de la barrière. L'idée est donc d'utiliser ces mécanismes de transport pour faire pénétrer les médicaments dans le cerveau. Il existe plusieurs moyens de "détourner" ces systèmes de transport : par exemple, pour approvisionner le cerveau en fer, la BHE exprime des récepteurs spécifiques de la transferrine -la molécule qui transporte le fer. Une fois une molécule de transferrine arrimée au récepteur, elle est endocytée par la cellule endothéliale qui la relargue de l'autre côté de la barrière. Ce processus est appelé "**transcytose par récepteur**". En associant la substance thérapeutique à un anticorps pouvant se lier au récepteur de la transferrine, il devient alors possible de "profiter" du système de transport à son insu.

En conclusion, il est possible de modifier chimiquement une NP en y liant des molécules spécifiques lui permettant de passer plus efficacement la BHE, ou encore en la recouvrant d'un *coating* augmenter sa capacité de diffusion dans les tissus tumoraux.

3.2 Un Cheval de Troie pour améliorer le traitement des tumeurs

3.2.1 Macrophages associés aux Tumeurs : de Dr Jekyll à Mr Hyde

La première technique étudiée dans cette thèse pour concentrer les nanoparticules dans la tumeur repose sur l'utilisation de cellules immunitaires comme "transporteurs". Ces cellules seraient chargées en NPs *ex vivo* puis injectées par voie intraveineuse. Attirées par la tumeur, elles traverseraient la BHE grâce à leurs capacités intrinsèques puis se répartiraient dans la zone tumorale. Ainsi, l'opération serait beaucoup moins intrusive qu'une injection intratumorale dans le cas du gliome. D'autre part, cette méthode devrait aussi permettre une distribution plus homogène du fer dans la tumeur, car les cellules immunitaires s'y répartiraient. Cette section présente ces cellules immunitaires spécifiques, les monocytes et les macrophages, et donne quelques pistes soulignant l'intérêt de les utiliser comme vecteurs.

3.2.1.1 Les macrophages, cellules immunitaires

On a longtemps pensé que la présence de la BHE indiquait l'absence de système immunitaire dans le cerveau. Aujourd'hui, les recherches indiquent plutôt que le cerveau possède un système immunitaire qui lui est propre [Rebe 06]. Toutefois, les cellules immunitaires circulantes dans le sang ont la capacité de pénétrer les barrières du cerveau, même si cela ne se produit que de manière occasionnelle en conditions normales de métabolisme. Parmi les leukocytes traversant la BHE, la plupart sont des lymphocytes T mémoire et effecteurs, des monocytes (en proportion variables, de 25 à 75%) et des lymphocytes B [Man 07].

Les **macrophages** (en grec, "gros mangeurs") sont des cellules du système immunitaire connues pour leur capacité de phagocytose, c'est-à-dire leur capacité à internaliser les pathogènes ou les débris cellulaires par exemple. Les macrophages forment une population variée de cellules et peuvent posséder une grande variété de fonctions. Ils proviennent de globules blancs indifférenciés qui circulent dans le sang, **les monocytes**. Ces monocytes circulants sont recrutés dans les tissus périphériques sujets à une inflammation ainsi que par les cellules tumorales ou par les macrophages eux-mêmes grâce à des messages chimiques, les chemoattracteurs (*e.g.* CCL2, VEGF, M-CSF ou CCL5 [Alla 08, Soli 09]).

Le recrutement des monocytes circulants débute par une phase pendant laquelle les monocytes se lient faiblement aux cellules endothéliales puis "roulent" le long du vaisseau sanguin poussés par le flux, mais toujours liés à la paroi. Cette phase de roulement s'achève au niveau du site inflammé grâce à la production de chimiokines par les cellules endothéliales. Lorsque les monocytes captent ces chimiokines, leurs récepteurs membranaires appelés "intégrines" changent de forme et deviennent actifs : l'affinité de ces récepteurs pour leur ligand, exprimé par l'endothélium au niveau du site inflammé, augmente. Ainsi, les monocytes peuvent s'ancrer à la paroi et s'immobiliser. Ils envoient quelques protrusions à l'intérieur des jonctions serrées pour capter de nouvelles chimiokines qui vont les guider, puis "se faufilent" ensuite à travers les jonctions serrées. Ils se retrouvent ainsi dans l'espace périvasculaire, entre les cellules endothéliales et la glia limitans.

Lorsqu'ils quittent les vaisseaux sanguins et entrent dans les tissus, les monocytes sont alors submergés par de nouveaux messages chimiques qui leur ordonnent de se différencier en macrophages. Quand ces macrophages sont recrutés dans les tumeurs, ils sont appelés "**Macrophages Associés aux Tumeurs**" (*Tumor Associated Macrophages*, ou **TAMs**). La présence d'un grand nombre de TAMs dans une tumeur est souvent lié à un pronostique plus sombre [Soli 09]. Cependant, même si le rôle des macrophages en tant que cellules immunitaires a été étudié pendant plus d'un siècle, leur implication dans les processus liés au cancer a seulement été confirmée récemment et n'est pas encore très bien comprise [Quat 12].

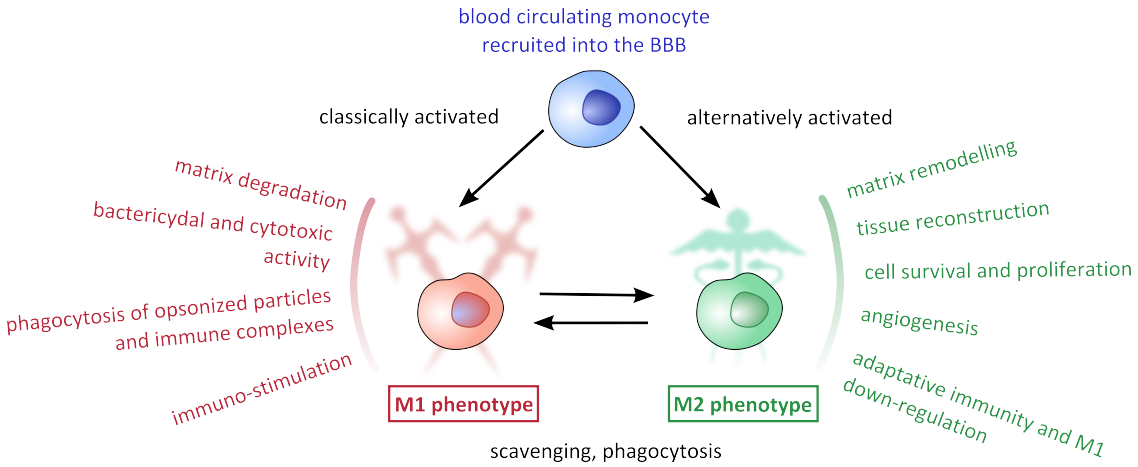


Figure 3.5 – *Schéma illustrant les deux polarisations principales des macrophages (M1 et M2) ainsi que les propriétés spécifiques à chaque polarisation.*

Il est important de se rappeler que les tumeurs ne sont pas des amas homogènes de cellules mutées. Elles forment au contraire des écologies complexes, plus ou moins irriguées par des vaisseaux sanguins propres à elles, et sont composées de zones au fonctionnement varié regroupant différents types cellulaires [Cond 06]. Ainsi, il semble plus adéquat de considérer les tumeurs comme des "quasi-organes" [Vino 14] que comme des masses homogènes. Selon la localisation d'une tumeur, son origine ou son stade d'évolution par exemple, les cellules tumorales peuvent présenter des comportements et des particularités très variés. Cependant, malgré ces nombreuses différences entre les caractéristiques cellulaires de chaque type tumoral, certains points communs semblent se démarquer. Ceux-ci permettraient d'expliquer comment la tumeur se développe tout en se construisant un micro-environnement dans lequel le système immunitaire ne la détecte plus comme un objet à détruire. Ces points communs sont rassemblés sous la dénomination "Hallmarks of Cancer" [Hana 00] (les "propriétés caractéristiques des cancers") et comprennent : l'insensibilité aux signaux

de non-croissance, l'invasion des tissus et la capacité de métastaser, le potentiel de réplication illimité des cellules, une angiogénèse soutenue, l'échappement (la cellule évite l'apoptose) et une auto-suffisance aux signaux de croissance. Certaines de ces caractéristiques peuvent d'ailleurs être expliquées par la présence des Macrophages Associés aux Tumeurs (TAMs) et par leurs propriétés diverses.

Le micro-environnement de la tumeur est composé de nombreux types cellulaires, malins ou non, qui interagissent continuellement entre eux [Quat 12]. Parmi ces types cellulaires, les macrophages représentent jusqu'à 50% [Soli 09] voire même 80% [Choi 12b] de la masse tumorale et semblent être des acteurs cruciaux dans le développement de la tumeur : ils constitueraient l'une des liaisons entre l'inflammation et le cancer [Alla 08].

3.2.1.2 Polarisation des macrophages

Le champ des fonctions possibles des macrophages est très vaste. Lorsqu'ils reçoivent les messages chimiques envoyés par le micro-environnement tumoral, les monocytes peuvent se différencier entre deux types de macrophages : le type de macrophage est communément appelé "la polarisation" et on différencie alors les macrophages M1 des macrophages M2 [Soli 09]. Ces deux polarisations sont illustrées figure 3.5.

La polarisation M1 : "les soldats" Lorsqu'ils acquièrent la polarisation M1, les macrophages deviennent programmés pour retirer les potentiels pathogènes envahissant les tissus. Dans ce but, ils ont une activité cytotoxique accrue contre les micro-organismes et les cellules néoplasiques ; ils peuvent aussi stimuler le système immunitaire, par exemple en présentant des morceaux de pathogènes phagocytés à d'autres cellules immunitaires pour amplifier la réaction immunitaire.

La polarisation M2 : "les soigneurs" Les macrophages M2 agissent une fois les pathogènes éliminés : ils régulent négativement la réponse immunitaire et lancent les processus de réparation des tissus. Ils promeuvent le remodelage et la réparation des tissus endommagés, déclenchent la construction des nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) et jouent un rôle important de "nettoyage".

Il est maintenant largement accepté dans la communauté scientifique que **les TAMs présentent une polarisation M2** [Soli 09]. De cette manière, ils promeuvent la survie des cellules tumorales en leur envoyant des signaux de croissance et stimulent leur prolifération et même leur dissémination. En effet, pour passer dans le sang et métastaser, les cellules tumorales ont besoin de traverser les parois des vaisseaux sanguins, et pour cela, de s'insinuer dans l'étroit espace entre les cellules qui le constituent, les cellules endothéliales. Ce passage étant très resserré, ceci est impossible pour elles sans qu'un macrophage M2 ne les accompagne et envoie des signaux qui vont permettre l'élargissement du passage et modifier la morphologie de la cellule tumorale, augmentant son potentiel de migration [Cond 06, Qian 10]. C'est pourquoi les TAMs peuvent être décrits comme des "clefs qui ouvrent le passage" dans le contexte des métastases (*keys that unlock the gate* [Quat 12]). Les TAMs vont ainsi accompagner les cellules tumorales pendant leur migration jusqu'à leur implantation dans un nouvel organe. Là, ils vont aider les métastases à se développer en participant à la construction de la matrice structurelle nécessaire à la croissance de la nouvelle tumeur. La figure 3.6 résume les principales fonctions des TAMs.

Maintenant, il est naturel de se demander : **pourquoi des globules blancs, supposés neutraliser ce qui menace potentiellement l'être vivant, stimulent-ils la croissance des tumeurs au lieu de les détruire ?** Un consensus existe sur le fait que ce phénomène *a priori*

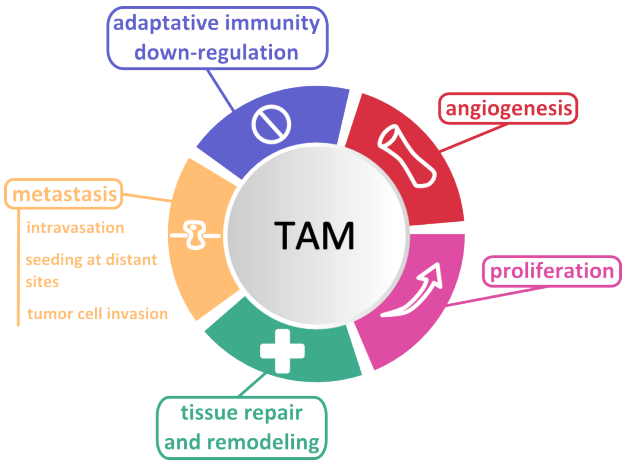


Figure 3.6 – *Schéma résumant les principales fonctions des TAMs. Figure adaptée de [Soli 09, Vino 14, Quat 12, Hana 00, Qian 10].*

non naturel est du à une perte d'équilibre entre le nombre de macrophages M1 et le nombre de macrophages M2 dans les tissus tumoraux. L'équilibre entre le nombre de macrophages M1 et M2 est une épée à double tranchants, capable de promouvoir ou de détruire la tumeur selon le type de polarisation qui prédomine dans l'environnement tumoral. Si la répartition entre les deux polarisations favorise trop nettement la polarisation M2, les processus de réparation tissulaire peuvent être utilisés contre leur but premier et soutenir le développement de la tumeur [Quat 12, Vino 14]. Certains chercheurs supposent que la création d'un environnement de tolérance tumorale va encourager les monocytes à obtenir la polarisation M2 au lieu de se différencier en cellules spécialisées nécessitées par les tissus, comme les macrophages M1 qui seraient capables de détecter la tumeur et inciter le système immunitaire à la détruire [Soli 09]. Ceci est controversé dans [Cond 06] qui indique en cause principale du développement tumoral la perte des "interrupteurs OFF" des cellules néoplasiques.

Les macrophages ne sont toutefois pas spécialisés de manière irréversible en M1 ou en M2. Comme Dr Jekyll et Mr Hyde [Duff 03], ils peuvent passer d'un type "soldat" à un type "soigneur", et inversement. Par exemple, Duffield affirme que les macrophages M1 qui internalisent des corps apoptotiques peuvent perdre des propriétés de M1 et gagner des caractéristiques de la polarisation M2. Tandis que Dr Jekyll ne peut se muer qu'en l'un des deux extrêmes, Dr Jekyll ou Mr Hyde, les macrophages, eux, ne sont en réalité pas simplement M1 ou M2. Il existe en fait un continuum d'états possibles entre les deux extrêmes M1 et M2, et chaque macrophage se situe quelque part sur ce spectre, étant plus proche de l'une ou l'autre des polarisations selon les propriétés ou les marqueurs membranaires qu'il exhibe. Par ailleurs, faire évoluer les TAMs en macrophages polarisés "soldats" est une solution étudiée actuellement pour rétablir l'équilibre entre le nombre de macrophages M1 et M2 dans les tumeurs afin de lutter contre le cancer.

3.2.2 Les macrophages comme Chevaux de Troie pour traverser la Barrière Hémato-Tumorale

Morantz, en 1979 [Mora 79], a été le premier à quantifier le nombre de macrophages dans les métastases cérébrales. Ses études ont été complétées par Fidler en 1988 qui démontra que les cellules myéloïdes étaient bel et bien capables d'infiltrer les métastases cérébrales, même en cas

de non rupture de la BHE [Scha 88]. En 2004, Strik *et al.* confirment que les tumeurs primaires et les métastases cérébrales attirent les cellules immunitaires [Stri 04], ouvrant un vaste champ de possibilités thérapeutiques dont les "Chevaux de Troie" cellulaires.

Remarque : bien que ce soient initialement les monocytes qui circulent dans le sang et migrent dans la tumeur, de nombreuses études utilisent aussi des macrophages pour passer la BHE. Dans la suite, nous parlerons de "monocyte" ou "macrophage" selon les termes employés dans les publications relatives.

Principe de la méthode "Cheval de Troie" : comme vu dans la section précédente, les macrophages montrent des aptitudes innées de phagocytose. De plus, ils sont attirés par des gradients de signaux chimiques envoyés par les cellules en hypoxie [Choi 12b]. Ils s'infiltrent alors jusque dans les zones nécrotiques, inaccessibles avec les traitements usuels [Soli 09]. L'idée du "Cheval de Troie" repose sur l'exploitation de ces deux propriétés des macrophages (internalisation et migration) pour transporter les NPs dans la tumeur. Le procédé comprend deux étapes : d'abord, les macrophages sont chargés en NPs *ex vivo*. Ensuite, ils sont injectés de façon systémique et migrent à travers la BHE jusque dans la tumeur, transportant leur cargaison de NPs même dans les zones éloignées des vaisseaux sanguins. L'intérêt de cette méthode est double : il devient d'une part possible d'accumuler des NPs dans la tumeur malgré la présence de la BHE, et ce d'une manière peu invasive pour le patient. D'autre part, les cellules chargées en NPs s'infiltreront dans les tissus jusque dans des zones peu atteignables par des NPs seules.

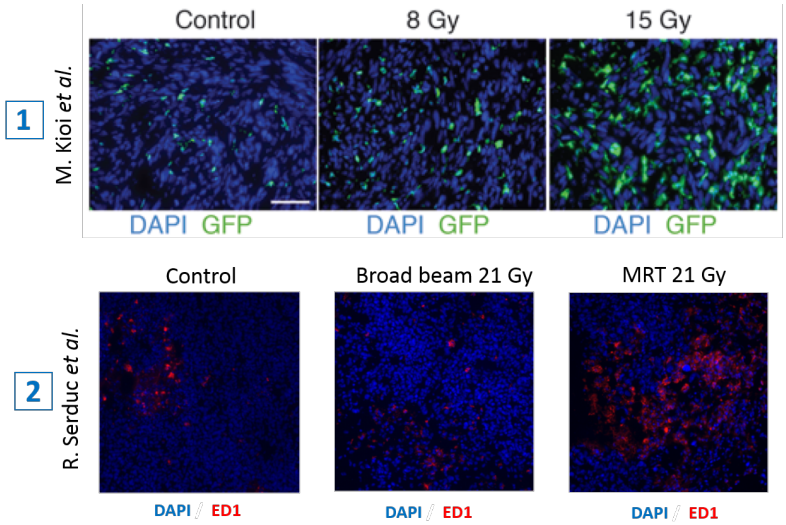


Figure 3.7 – *Infiltration de macrophages dans les tumeurs cérébrales après irradiation. (1) L'irradiation de la tumeur promeut l'infiltration de cellules dérivées de la moëlle osseuse (cellules GFP+, en vert) dans la tumeur [Kioi 10]. (2) La MRT attire plus de macrophages (marquage ED1, en rouge) dans le gliome de rat que l'irradiation en faisceau plein (Serduc et. al).*

3.2.2.1 L'irradiation promeut le recrutement des macrophages dans le cerveau

Plus récemment, plusieurs articles soulignent la capacité des macrophages à encourager la repousse de la tumeur après la radiothérapie [De P 13, Kioi 10]. En effet, les radiations endommagent à la fois la tumeur et son voisinage, dont les vaisseaux sanguins, et ces lésions attirent des macrophages polarisés M2 dont le rôle est de réparer les tissus. Certains macrophages se regroupent donc

autour des vaisseaux sanguins restants pour stimuler leur développement ; d'autres s'infiltrent dans les zones tumorales avasculaires, en hypoxie [De P 13], de façon à créer de nouveaux vaisseaux sanguins pour irriguer ces zones privées d'oxygène et de nutriments.

Kioi, dans son article [Kioi 10], décrit deux origines distinctes pour la vasculature tumorale : **l'angiogénèse**, lors de laquelle les vaisseaux sont développés à partir de la prolifération des cellules endothéliales (*i.e.* les cellules composant les vaisseaux sanguins), et **la vasculogénèse**, lors de laquelle des cellules circulantes dérivées de la moëlle osseuse s'associent afin de construire de nouveaux vaisseaux. Le mécanisme dominant avant irradiation est l'angiogénèse. Cependant, après irradiation, les cellules endothéliales constituant les vaisseaux sont endommagées et l'angiogénèse est freinée. C'est pourquoi la tumeur compte sur les cellules circulantes pour reconstruire une vasculature appropriée, et donc nécessite l'activation du processus de vasculogénèse pour survivre. Après irradiation, la tumeur tente de croître à nouveau en attirant les macrophages qui vont favoriser le développement des vaisseaux. Les macrophages infiltrants peuvent atteindre jusqu'à 40% des cellules présentes dans les tissus tumoraux après irradiation (cf Fig. 3.7 1).

Dans l'équipe RSRM, deux modes d'irradiation sont étudiés : l'irradiation classique en "broad-beam" (faisceau plein) et la MRT (*Microbeam Radiation Therapy*), pour laquelle le faisceau est fractionné spatialement en petits faisceaux de 50 μm de large espacés à des intervalles réguliers de 200 μm. Il a été montré que les tumeurs irradiées en faisceau plein attiraient les macrophages dans les zones hypoxiques et nécrotiques, tandis que la MRT permettait d'attirer un plus grand nombre de macrophages dans la tumeur, et ce de façon plus homogène (cf Fig. 3.7 2). Une pré-irradiation de la tumeur en MRT serait donc susceptible d'amplifier la migration des macrophages chargés en NPs, et ainsi d'obtenir une distribution du fer intéressante pour la suite du traitement en SSRT.

En résumé, la radiothérapie peut renforcer le potentiel d'attraction du système immunitaire local ou systémique de la tumeur. Selon les conditions d'irradiation et la nature de la tumeur, la radiothérapie peut donc avoir un effet pro ou antitumoral en recrutant, polarisant, retirant ou réorganisant les populations de cellules myéloïdes [Vatn 15].

3.2.2.2 Les macrophages comme transporteurs pour délivrer des substances au cerveau

La méthode de distribution mettant en jeu des cellules comme transporteurs de médicaments évoque le modèle utopique d'Ehrlich (1857-1915) lorsqu'il imaginait l'utilisation de *magic bullets*, des vecteurs potentiels qui atteindraient spécifiquement les organismes causant les maladies [Nels 14]. De nos jours, un nombre croissant de procédés cherchent à s'approcher des *magic bullets* idéales : parmi ces méthodes, l'idée d'utiliser des cellules immunitaires comme Chevaux de Troie est expérimentée dans plusieurs domaines.

Expériences sur sphéroïdes

L'utilisation de sphéroïdes permet d'obtenir une preuve de concept de la méthode. M.R. Choi *et. al* étudient en 2007 la capacité d'infiltration des macrophages issus de la différenciation de monocytes humains dans des modèles de sphéroïdes composés de cellules de cancer du sein humaines [Choi 07]. Ils démontrent ainsi que les macrophages peuvent être chargés avec des NPs d'or, et que ceux-ci sont bien capables de migrer dans les sphéroïdes.

Ces études sur sphéroïdes sont poursuivies par l'équipe de Madsen, qui prouve que des macrophages chargés de NPs de silice *coatées* avec de l'or s'infiltrent homogènement dans les sphéroïdes de gliome humain. L'équipe émet toutefois des réserves quant à l'homogénéité de cette distribu-

tion, car celle-ci serait aussi dépendante du protocole utilisé pour former les sphéroïdes. D'autre part, ils constatent que l'infiltration des macrophages ne cesse de croître jusqu'à une stabilisation après 12 h [Mads 12]. Ces mêmes NPs sont utilisées avec des monocytes-macrophages (Mo/Ma) de lignée, les PD338-D1, dans les études de Baek : ces études montrent que les macrophages chargés de NPs semblent infiltrer les sphéroïdes de gliome humain avec la même efficacité que les macrophages non chargés [Baek 11]. Enfin, des études plus récentes utilisant d'autres Mo/Ma de lignée, les RAW264.7, ont permis de prouver que l'utilisation de macrophages comme transporteurs permettait d'améliorer la distribution de NPs chargées en doxorubicine dans des sphéroïdes : les NPs transportées par les macrophages étaient infiltrées plus profondément dans les sphéroïdes que les NPs seules [Pang 16].

Bien que les sphéroïdes ne soient pas représentatifs de la vascularisation et de l'architecture de la tumeur, ils restent un modèle intéressant car ils permettent de simuler les zones hypoxiques de la tumeur tout en évitant d'utiliser directement un modèle animal.

Expériences précliniques

L'équipe de M.R. Choi *et al.* prouve pour la première fois en 2012 que les macrophages peuvent efficacement traverser la BHE pour s'infiltrer dans des métastases cérébrales chez la souris, en les traçant avec des nanoparticules fluorescentes [Choi 12d]. Suite à cette première démonstration, l'utilisation de cellules immunitaires pour traverser la BHE et délivrer des composés variés au cerveau s'est développée.

Dou et son équipe sont parvenus à améliorer les traitements contre les troubles neurocognitifs associés au HIV chez la souris grâce à des macrophages dérivés de la moëlle osseuse porteurs de NPs d'indinavir [Dou 09]. D'autres études ont suivi, comme celle de J. Choi qui parvint à stopper la croissance de tumeurs sous-cutanées en utilisant des liposomes chargés de doxorubicine, transportés par des macrophages [Choi 12b]. Il constate que les NPs seules restent en périphérie de la tumeur, tandis que les macrophages chargés permettent la distribution des NPs au coeur la tumeur. Pour finir, Madsen et son équipe ont publié plusieurs articles sur le sujet après étude de cette méthode chez le rat. En 2013, ils ont montré que les macrophages chargés en NPs pouvaient infiltrer le cerveau sain seulement si la BHE était ouverte [Mads 13]. L'ouverture temporaire de la barrière était alors induite par thérapie photo-dynamique. 90% de la barrière endommagée était restaurée 72 heures après ouverture. Dans un article plus récent (2015) [Mads 15], des macrophages chargés de NPs d'or étaient utilisés pour étudier à la fois l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de la stratégie des cellules Cheval de Troie couplées à la Thérapie Photo-Thermique. Il constate l'efficacité du traitement. Cependant, cette étude a été réalisée en injectant directement les macrophages chargés dans la tumeur.

Le tableau de la figure 3.8 synthétise quelques exemples d'expériences utilisant des monocytes/macrophages dans le but de transporter des composés dans une tumeur. Dans ce corpus, les tumeurs étudiées ne sont pas toutes des tumeurs cérébrales. Cependant, les protocoles associés à ces expériences nous ont servi pour mettre en place les travaux présentés dans cette thèse.

Plusieurs points de comparaison entre ces différentes études peuvent être relevés :

- selon les publications, les Mo/Ma sont issus d'une **culture primaire** (différenciation de la moëlle osseuse d'animaux donneurs par exemple) ou d'une **lignée cellulaire** commerciale (RAW264.7 ou NR8383 par exemple). Les deux protocoles aboutissent à l'observation de cellules exogènes ayant migré dans la tumeur des animaux.
- certaines études ont été réalisées avec des animaux *nude* privés de **système immunitaire**.

Mo / Ma	Tumeur	Animal	Nombre Mo / Ma injectés	Mode d'injection	cinétique (J= jour d'injection des Mo/Ma)	Observations / conclusions	Référence
THP-1 ATCC (type monocyte)	A549 ATCC (cancer du poumon humain) sous cutané	souris (BALB/c nude)	2 millions	veine caudale	sacrifice J+5	les Mo sont capables de migrer *in vivo*	Choi 2012 *J. Nano.*
macrophages péritonéaux souris	A549 ATCC (cancer du poumon humain) sous cutané	souris (BALB/c nude)	5 millions	veine caudale	sacrifice J+24h	capacité de migration des Ma *in vivo*	Choi 2012 *Biomat.*
Mo humains différenciés en Ma (Indiana Blood Center)	cellules humaines MDA-MB-321 BR, métastases cérébrales	souris nu/nu athymique	10 millions	veine caudale	sacrifice J+24h	ne fonctionne que pour 2 souris sur 5. Explication supposée : échec de lors de l'injection	M.R. Choi 2012
Ma alvéolaire de rat (NR8383 ATCC)	(étude sur BHE intacte)	rats (Sprague - Dawley)	250 000	veine jugulaire	sacrifice J+7	les Ma exogènes incapables de traverser la BHE (saine)	Madsen 2013
Ma alvéolaire de rat (NR8383 ATCC)	C6 gliome de rat (ATCC)	rats (Sprague - Dawley)	10 000	intratumoral	sacrifice J+15	efficacité du traitement du à la migration des Ma	Madsen 2015
Ma dérivés de la moëlle osseuse de souris GFP	TRAMP-C1 lignée cellulaire, cancer de la prostate (ATCC) (souris), intramusculaire dans la cuisse	souris (C57BL/6J ou C57BL/6-Tg(CAG-EGFP1Osb/J))	5 millions x3	voie intraveineuse	injection des cellules le jour de la pré-irradation de la tumeur. Suivi sur 14 jours des Mo/Ma	J+1 : cellules à la périphérie de la tumeur dans les deux cas. J+7 : moins de Ma dans la tumeur pour les irradiés. J+14 : aucun Mo pour tumeur non irradiée, Ma pour tumeur irradiée	Jiang 2015
Ma humain tirés du sang	LNCaP:LUC:GFP	souris (CD-1 athymique)	3 millions	veine caudale		possibilité de "guider" des Ma chargés en fer par les gradients de l'IRM	Muthana 2015
Mo humains de donneurs / Ma dérivés de la moëlle osseuse de souris BALB/c	(HIV-1 *encephalitis*)	souris C.B.-17 SCID ou Balb/c	10 millions	veine caudale	sacrifice J+1, 3, 7 et 14	observation des NPs dans les zones ciblées, fonctionnement du traitement	Dou 2009
Mo murins (de souris CD-1)	(étude sur BHE intacte)	souris (CD-1)	1 million	artère carotide	sacrifice J+20h à J+24h	Mo capables de migrer à travers la BHE intacte. Utilisation de bradykinine 20 min avant l'injection améliore le rendement.	Wu 2006
CCL46 (souris DBA/2) lymphome	C6 gliome de rat (ATCC)	Rat Wistar	2 millions	veine caudale	sacrifice J+3 et J+4	Mo Ma ont migré dans la tumeur	Valable 2007
RAW 264.7	U87 gliome intracranial	nude	non indiqué	veine caudale	sacrifice J+1	L'internalisation des NPs par les Mo/Ma permet une amélioration du ciblage de la tumeur.	Pang 2016
Ma dérivés de la moëlle osseuse	zone cérébrale inflammée au LPS	souris C57BL/6	5 millions	veine caudale	sacrifice J+2	migration dans la zone inflammée des Ma. Des Ma chargés de NPs Fe migrent aussi à 72% si l'on considère que "100%" représente le nombre de cellules non chargées ayant migré dans la zone considérée	Tong 2016
macrophages péritonéaux	SNU-1041 squamous cancer cell lines (derived from human pharyngeal cancer)	souris nude (BALB/c-nu/nu)	100	intratumoral ou péritumoral	irradiation à J+48h	les macrophages ont pénétré dans la tumeur approximativement 48h après injection	Yang 2015

Figure 3.8 – *Synthèse d'études visant à utiliser les Mo/Ma comme Chevaux de Troie. Dans l'ordre, les références : [Choi 12c, Choi 12b, Choi 12d, Mads 13, Mads 15, Jian 15, Muth 15, Dou 09, Wu 06, Vala 07, Pang 16, Tong 16, Yang 16].*

Ce choix est discutable, mais il permet d'utiliser des lignées non compatibles génétiquement avec l'animal sans crainte d'une réaction immunitaire qui détruirait les Mo/Ma injectés avant qu'ils n'aient pu accéder à la tumeur.

- certaines de ces études concernent la migration de Mo/Ma dans des **tumeurs sous-cutanées**, et d'autres dans des **tumeurs cérébrales** (primaires ou métastases). L'obstacle que représente la BHE constitue une différence conséquente entre ces deux types d'études : les résultats obtenus pour des tumeurs sous-cutanées ne sont pas transposables directement à des tumeurs cérébrales. Cependant, dans les deux cas, la migration des cellules injectées a pu être observée.
- la plupart du temps, les Mo/Ma sont injectés dans la veine caudale de l'animal. Le **nombre de cellules injectées** varie selon les études mais il est de l'ordre de quelques millions de cellules pour la souris comme pour le rat. Seule une fraction de ces cellules injectées sera ensuite retrouvée dans la tumeur.
- enfin, la **cinétique de migration** des cellules reste peu caractérisée. Les animaux sont sacrifiés entre un et quinze jours après injection des cellules selon les publications. Jiang *et al.* étudient l'influence de l'irradiation sur la distribution des macrophages injectés. Ils retrouvent autant de cellules injectées dans les tumeurs 24h après injection, que la tumeur ait été irradiée ou non. Une à deux semaines après injection, certaines cellules injectées sont toujours présentes dans la tumeur. Cette fois, le nombre de cellules détectées est plus élevé dans le cas d'une irradiation préalable de la tumeur [Jian 15]. L'étude de Valable donne un exemple de l'application de cette méthode chez le rat porteur de gliome C6. Le nombre maximal de macrophages exogènes accumulés dans la tumeur est atteint 3 jours après injection, mais des cellules injectées sont encore visibles dans la tumeur 5 jours après injection [Vala 07].

Seule une fraction des Mo/Ma injectés se retrouve dans la tumeur. Les autres Mo/Ma se distribuent dans les autres organes du corps. Selon les composés qu'ils transportent, une accumulation dans un organe précis pourrait engendrer une toxicité du traitement. Les études de Audran donnent un aperçu du "destin" des Mo/Ma une fois injectés par voie intraveineuse chez la souris, en présence d'une inflammation induite artificiellement dans un coussinet chez l'animal [Audr 95]. Une heure après injection, 39% de ces Mo/Ma se retrouvent dans les poumons, 19% dans le foie et 5% dans la rate. Puis, la quantité de Mo/Ma présente dans les poumons diminue et augmente en contrepartie dans le foie et dans la rate, et dans la zone inflammée. Les Mo/Ma ayant infiltré la zone inflammée ne représentent que 0.2% des Mo/Ma injectés, cependant ceux-ci y restent "piégés" et y sont encore présents 7 semaines après l'injection.

Cette méthode de "Cheval de Troie" permet donc de faire passer la BHE à des composés thérapeutiques (des NPs par exemple), de cibler la tumeur et d'augmenter l'infiltration des NPs dans le coeur des tissus néoplasiques. De plus, les composés sont internalisés par les cellules, ce qui est susceptible de diminuer leur toxicité par rapport à une injection intraveineuse directe. Quelques premières limites ont déjà été décrites : chaque macrophage ne peut transporter qu'un chargement restreint de composés. De plus, la durée de rétention du composé par les macrophages et l'initiation de la délivrance du composé sont encore peu contrôlées. Enfin, les cellules doivent migrer en assez grandes quantité pour espérer obtenir un bénéfice thérapeutique. D'autres types cellulaires que les macrophages sont aussi envisagés comme possibles "transporteurs". Parmi eux, les cellules souches neurales font l'objet d'études visant à améliorer la pénétration et la rétention des composés dans les tumeurs cérébrales [Moon 14, Thu 09].

3.3 Utilisation des ultrasons pour ouvrir localement la BHE

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ouverture de la BHE peut être réalisée par l'injection intra-artérielle d'agents osmotiques ou de solutions hypertoniques. Cependant, bien qu'elle améliore le pronostic des patients, cette solution induit des complications pouvant avoir un impact sérieux sur la santé. De nouvelles stratégies ont donc pour objectif de perméabiliser la BHE de manière ciblée : c'est le cas de l'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés.

L'ouverture de la BHE par ultrasons repose sur la combinaison d'une salve d'ultrasons et d'une injection de microbulles (*e.g.* l'agent SonoVue). Les microbulles entrent alors en résonance avec les ultrasons et subissent une succession de gonflements et de compressions, qui peut s'achever par l'éclatement de la microbulle. Ces phénomènes participent notamment à la distension des jonctions serrées [Liu 14]. La perméabilisation de la BHE qui en résulte est locale et temporaire. Les paramètres de la sonication peuvent en effet être réglés pour que celle-ci soit réversible ou irréversible [Wood 14].

Cette stratégie est peu invasive pour le patient et offre de nouvelles perspectives pour le traitement des tumeurs récurrentes ou inopérables. De plus, elle est applicable au transport de nombreux autres médicaments de chimiothérapie, d'anticorps, de NPs thérapeutiques ou encore de thérapies géniques dans le cerveau, pour le traitement des tumeurs ou d'autres maladies comme la maladie d'Alzheimer [Etam 12, Brya 16].

A ses débuts, cette méthode engendrait des effets secondaires comme des oedèmes ou des hémorragies [Ober 16]. L'optimisation des paramètres (fréquence, pression acoustique) permet de réduire ces lésions. Une autre limite de cette méthode réside dans l'atténuation des ultrasons par le crâne [Hyny 05]. Celui-ci déforme et absorbe 90% de l'énergie des ultrasons chez l'homme. Clement *et al.* proposent un système composé de 64 émetteurs individuels permettant ainsi de corriger les aberrations induites par le crâne [Clem 00]. Cependant, cette méthode demande l'installation d'un cadre stéréotaxique et le rasage de la tête du patient, ce qui se révèle être pesant pour le patient et problématique pour dans le cas de sessions répétées d'ouverture de la BHE.

Plutôt que de délivrer les ultrasons depuis l'extérieur du crâne, il est aussi envisageable d'implanter un transducteur intracrânial. Carpentier *et al.* portent actuellement cette solution en essais cliniques de phases I/II pour le traitement des rechutes de gliobastome. Un transducteur (SonoCloud) est alors implanté sous le crâne, comme visible dans la figure 3.9. Ce transducteur émet des ultrasons pulsés non focalisés de basse intensité. Des études chez les primates montrent que l'exposition répétée aux ultrasons ainsi délivrés sur 3 mois est sans conséquence comportementale, immunologique ou neurologique. Dans les essais cliniques, tous les cycles de sonication sont couplés à l'injection de microbulles SonoVue et sont suivis par l'injection systémique de carboplatine. Le traitement réalisé près des aires du langage ou motrices n'a pas induit d'effets secondaires : les patients ont prouvé leur capacité à parler et bouger dans les 6 h après le traitement. Les résultats sont encourageants et le traitement est bien toléré. L'une des principales limitations rencontrées réside dans l'étroitesse du champ de l'émission des ultrasons (1 cm de diamètre), qui est parfois incapable de couvrir toute la tumeur.

Cette méthode récente d'ouverture locale de la BHE offre de nouvelles possibilités à un grand nombre de thérapies. Les paramètres du traitement extra ou intracrânial restent à définir, de façon à ouvrir la BHE sans augmenter la température des tissus à un niveau trop élevé, technique utilisée pour la thérapie ablative par ultrasons [Brya 16]. La cinétique de fermeture de la BHE suite à sa perméabilisation dépend aussi de ces paramètres. L'étanchéité de la BHE serait à nouveau complète

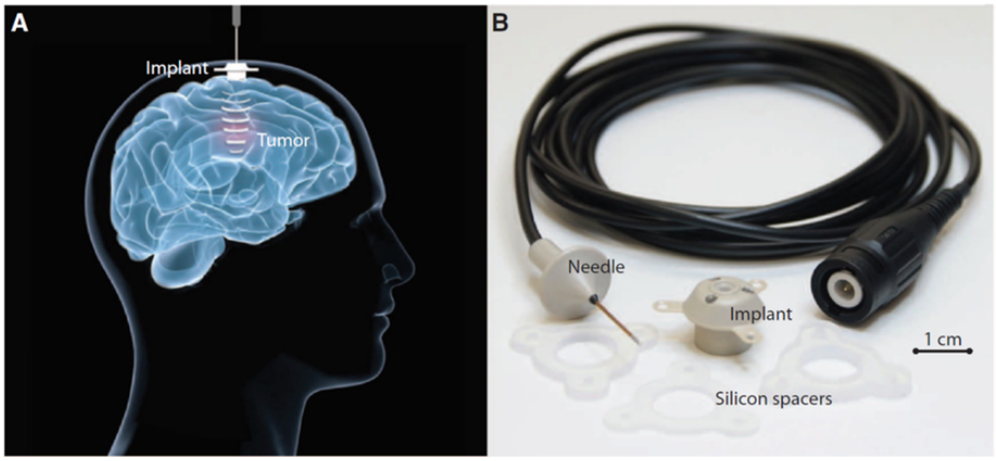


Figure 3.9 – *(A) Délivrance d'ultrasons non focalisés sous l'os du crâne pour augmenter la perméabilité de la BHE suite à une injection de microbulles afin de favoriser la distribution de composés chimiothérapeutiques dans les tumeurs cérébrales. Le transducteur utilisé (SonoCloud) (B) émet des ultrasons pulsés de basse intensité. Figures tirées de [Carp 16].*

après 8h chez le petit animal, avec un temps de décroissance caractéristique de 2h [Park 12].

3.4 Le Chapitre 3 en quelques mots

L'efficacité de la chimiothérapie dépend de la distribution des agents thérapeutiques en quantités suffisantes à l'intérieur de la tumeur. Dans le cas des tumeurs cérébrales, la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui régule le passage des substances circulant dans le sang vers le cerveau, est un frein important à la distribution de ces agents. La plupart des traitements pour les encéphalopathies se heurtant également à cette barrière biologique protectrice, un effort de recherche particulier a été fait ces dernières années visant à contourner, modifier ou même rompre la BHE. De ces études, deux types de stratégies émergent :

- L'**injection systémique** des composés, avant ou sans rupture préalable de la BHE (rupture chimique ou mécanique), repose sur l'existence de l'"effet EPR". L'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) est un processus par lequel les composés s'accumulent passivement dans la tumeur, bénéficiant de la relative perméabilité de la BHE au niveau de la zone tumorale. L'injection systémique ne permet cependant pas d'atteindre des concentrations suffisantes de composés dans la tumeur et peut induire une toxicité aux autres organes de l'individu.
- Les **traitements locaux** ciblent plus précisément la tumeur et permettent d'atteindre des concentrations plus élevées d'agents thérapeutiques dans la zone tumorale. Les composés sont alors directement injectés dans la tumeur (CED (*Convection Enhanced Delivery*), systèmes implantables, microréservoirs, gels injectables, ...). Ces traitements sont généralement plus lourds pour le patient et nécessitent une opération chirurgicale dans la plupart des cas.

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à une méthode peu invasive qui permettrait d'accumuler les NPs dans la tumeur. La méthode "**Cheval de Troie**" consiste à utiliser des cellules immunitaires, les monocytes/macrophages, pour distribuer les NPs dans

la tumeur. En résumé, les monocytes/macrophages sont chargés en NPs Fe *ex vivo*, puis injectés par voie systémique. Attirées par la tumeur, ces cellules sont capables de s'infiltrer à travers la BHE et de rejoindre les zones centrales du gliome. Il est possible de renforcer le potentiel attractif de la tumeur en l'irradiant avant l'injection des monocytes/macrophages.

Une autre méthode sera abordée à la fin de ce manuscrit : il s'agit d'ouvrir localement la BHE grâce aux interactions entre les **ultrasons** (focalisés sur la zone à perméabiliser) et des microbulles injectées par voie systémique. Les microbulles entrent en résonance avec les ultrasons et subissent une succession de gonflements et de compressions, participant à la perméabilisation locale de la BHE (écartement des cellules endothéliales). L'ouverture de la BHE par ultrasons non focalisés associée à l'injection d'un médicament chimiothérapeutique fait actuellement l'objet d'études cliniques [Carp 16].

Problématique

Malgré les efforts de recherches produits pendant ces dernières décades, le traitement des gliomes, tumeurs cérébrales malignes, ne sont toujours que palliatifs. Le protocole de traitement proposé aux patients, appelé *Protocole de Stupp*, combine la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Les bénéfices thérapeutiques de chacune de ces trois méthodes restent limités par la difficulté de leur mise en oeuvre au sein du cerveau ainsi que par le caractère invasif et résistant de ce type de tumeur.

Dans ces travaux, une piste d'optimisation de la radiothérapie appliquée au traitement du glioblastome sera étudiée. La radiothérapie usuelle est principalement limitée par le compromis à trouver entre un dépôt de dose suffisamment élevé dans la tumeur et la tolérance des tissus sains. En effet, les rayons X déposent indifféremment leur énergie dans les tissus, qu'ils soient tumoraux ou sains. Les dommages cellulaires induits par ce dépôt d'énergie, exploités dans un objectif thérapeutique dans la tumeur, sont par contre délétères pour le cerveau. La dose déposée dans la tumeur est donc déterminée en fonction des dommages que les tissus sains sont capables de supporter et réparer.

La SSRT, ou radiothérapie synchrotron, repose sur la distribution d'atomes lourds dans la tumeur pour augmenter le dépôt de dose de manière locale. L'interaction des rayons X et des atomes lourds provoque l'émission d'électrons secondaires, amplifiant ainsi les dommages dans un rayon maximal de quelques cellules. Ce protocole de traitement a été mené jusqu'en phase d'essais cliniques en utilisant des agents de contraste iodés. Ces agents de contraste sont accumulés dans la tumeur par un processus passif, *l'effet EPR*, tirant profit de la perméabilité relative de la barrière hémato-encéphalique au niveau des tissus néoplasiques.

Si les agents de contraste iodés sont utilisés depuis les prémices de cette méthode, d'autres composés sont aujourd'hui considérés : les nanoparticules (NPs) métalliques font l'objet d'un engouement marqué depuis les expériences pionnières de Hainfeld *et al.*, qui prouvèrent le potentiel des NPs d'or associées à la radiothérapie pour traiter un modèle sous-cutané de carcinome mammaire. Depuis, de nombreux éléments lourds ont été expérimentés dans le cadre de cette stratégie thérapeutique (gadolinium, argent, platine, ...). Ces travaux de thèse portent sur l'étude de NPs d'oxyde de fer Fe_3O_4 (NPs Fe) appliquées au renforcement du dépôt de dose pour la radiothérapie des gliomes.

Ces travaux seront restitués dans deux parties indépendantes, chacune présentant un axe de réflexion sur l'utilisation de ces NPs Fe dans le cadre de la SSRT :

1. La présence des NPs Fe dans un gliome permet-elle d'augmenter la dose reçue par la tumeur lors de l'irradiation par rayons X ?

2. Par quel procédé, le moins invasif possible pour le patient, est-il possible d'obtenir une répartition suffisamment uniforme des NPs Fe dans la tumeur ?

Lors de ces trois années de thèse, d'autres composés ont aussi été expérimentés dans le même objectif, celui d'augmenter localement la dose. J'ai choisi de ne présenter que les résultats concernant les NPs Fe afin d'éviter autant que possible de diluer le message principal. Certains résultats obtenus avec ces autres composés seront toutefois abordés à titre de comparaison avec le fer.

Les résultats seront discutés dans chacun des chapitres, et ce manuscrit s'achèvera par une discussion générale reprenant, de manière plus globale, les différents aspects du sujet abordés dans la restitution de ces travaux.

1. Potentiel des NPs de fer pour augmenter le dépôt de dose local

Les NPs Fe sont utilisées dans des domaines variés, de la physique aux applications biomédicales. Dans ces travaux de thèse, le potentiel des NPs Fe pour augmenter localement la dose sera envisagé comme piste d'optimisation de la radiothérapie des tumeurs cérébrales. En effet, lorsqu'ils sont irradiés par des rayons X, les atomes de fer émettent des électrons, appelés "électrons secondaires", qui vont ensuite déposer leur énergie autour de l'atome de fer, et ce, dans un rayon inférieur à la centaine de µm. Ce dépôt d'énergie induira des dommages supplémentaires aux cellules voisines. Le principe de fonctionnement de cette stratégie est schématisé dans la figure 3.10.

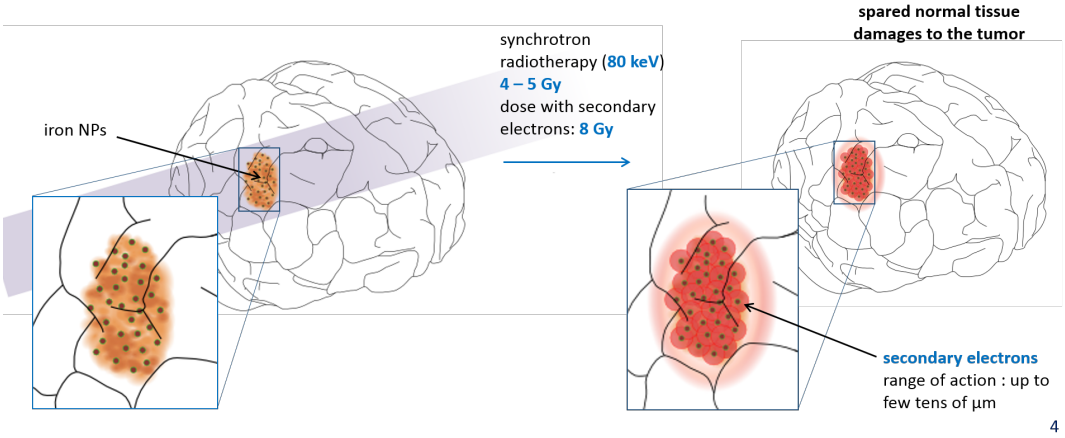


Figure 3.10 – *Schéma illustratif de la stratégie d'augmentation de dose délivrée aux tissus tumoraux par accumulation d'atomes lourds dans la tumeur.*

Cependant, les expériences ont montré que les lois de la physique ne permettaient pas d'expliquer la totalité des phénomènes impliqués dans l'irradiation d'une tumeur ayant accumulé des atomes lourds. En pratique, un effet thérapeutique a parfois été observé à des énergies d'irradiation pour lesquelles la physique ne prévoyait aucun bénéfice. L'effet thérapeutique mesuré est donc provoqué par une combinaison de mécanismes : des processus physiques (augmentation de la dose par le dépôt d'énergie des électrons secondaires), des processus chimiques (augmentation de la production de radicaux libres) voire un effet biologique, souvent énoncé pour expliquer l'observation d'un effet d'origine incomprise, mais qui peut par exemple être du aux NPs rendant les cellules tumorales plus sensibles aux effets de l'irradiation.

L'accumulation des NPs Fe dans la tumeur préalablement à l'irradiation permet-elle d'obtenir un effet thérapeutique ? Par quel mécanisme les NPs Fe agissent-elles ? Pour tenter d'apporter

quelques éléments de réponse à ces questions, plusieurs aspects seront abordés dans ces travaux :

1. nous présenterons tout d'abord une première étude visant à apporter une meilleure compréhension des **processus purement physiques** entrant en jeu. Cette étude a été réalisée grâce à l'outil PENELOPE, un code Monte Carlo adapté au domaine de la physique médicale.
2. la **caractérisation des NPs Fe** utilisées tout au long de ces travaux sera présentée dans un second chapitre. Cette étude visait à mieux connaître et appréhender cet outil que sont les NPs. La taille des NPs Fe a été mesurée par deux méthodes différentes, et la concentration de la solution mère a été contrôlée. La sonication des NPs Fe comme moyen de rendre les expériences plus reproductibles sera discutée.
3. un troisième chapitre sera consacré aux **interactions entre les cellules de gliome et les NPs Fe**, sans irradiation. Cette étude permet d'apporter quelques éléments quant aux "effets biologiques" s'ajoutant ensuite aux effets physico-chimiques lors de l'irradiation. Les conséquences de l'exposition de cellules de gliome de rat aux NPs Fe ont donc été étudiées *in vitro* : l'internalisation des NPs Fe par ces cellules a été quantifiée et la distribution intracellulaire de l'élément fer a été analysée. Enfin, l'impact de cette internalisation sur la prolifération des cellules et le cycle cellulaire sera questionné.
4. l'effet sur la survie après irradiation de l'exposition des cellules de gliomes aux NPs Fe sera abordé dans un quatrième chapitre. Deux méthodes de mesure de la survie cellulaire ont été employées et ces choix feront l'objet d'une discussion applicable dans d'autres domaines. La dépendance de cet effet à l'énergie et à la concentration des NPs Fe dans le milieu de culture sera analysée. Ce chapitre sera aussi l'occasion de tisser un lien entre l'impact des NPs Fe sur les cellules sans irradiation (étudié dans le chapitre précédent) et l'effet sur la survie mesuré après irradiation.
5. cette partie s'achèvera avec la présentation des résultats d'une première étude pilote chez le rat porteur du gliome F98. Les animaux ont été injectés ou non avec les NPs Fe, par voie intratumorale ou intraveineuse, et les tumeurs ont ensuite été irradiées à 35 keV.

2. Transport et distribution des NPs Fe dans la tumeur

Le transport et la distribution des composés thérapeutiques dans les gliomes font l'objet de nombreuses études spécifiques. En effet, la plupart des médicaments utilisés en chimiothérapie ne pénètrent pas dans les gliomes en quantité suffisante, bloqués par la barrière hémato-encéphalique. Cette problématique se retrouve aussi dans notre contexte : si les NPs Fe révèlent un potentiel pour renforcer le dépôt de dose, encore faut-il pouvoir répartir les NPs Fe dans la tumeur pour garantir le succès du traitement.

Ces travaux visaient donc à explorer une méthode novatrice pour transporter les NPs dans la tumeur de façon peu invasive et les y distribuer de la manière la plus homogène possible. Cette technique consiste à bénéficier des capacités de phagocytose des monocytes/macrophages pour accumuler des NPs Fe dans ces cellules. Les monocytes/macrophages chargés sont ensuite injectés de façon systémique dans le sang. Attirés par les signaux chimiques produits par l'environnement tumoral, les monocytes/macrophages migrent dans la tumeur en passant la BHE. L'attraction des monocytes/macrophages pour la tumeur peut potentiellement être amplifiée par une irradiation préalable de la tumeur en MRT (*Microbeam Radiation Therapy*). Pour finir, la tumeur sera irradiée avec un faisceau synchrotron monochromatique de rayons X. Les NPs qui seront concentrées dans la tumeur émettront des électrons toxiques pour les cellules avoisinantes. Cela mènera à la destruction

de la tumeur tout en épargnant les tissus sains. Cette stratégie, utilisant des cellules immunitaires comme Chevaux de Troie, est schématisée sur la figure 3.11.

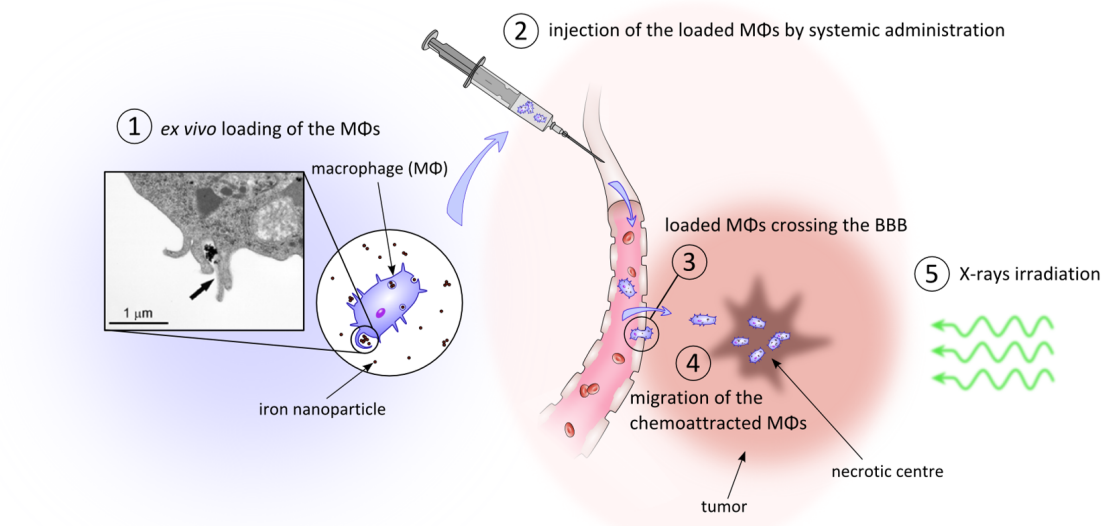


Figure 3.11 – *Schéma décrivant le principe général de la thérapie utilisant les macrophages comme Chevaux de Troie. Figure adaptée de [Weis 14] et [Gu 11].*

La deuxième partie de ces travaux de thèse est donc consacrée au transport des NPs Fe dans une tumeur cérébrale. Elle s'organise selon trois chapitres :

1. le potentiel des **monocytes/macrophages comme transporteurs** de NPs Fe a tout d'abord été vérifié ***in vitro***. Pour cela, l'internalisation des NPs Fe par des monocytes/ macrophages de lignée a été quantifiée. La distribution de fer dans les cellules a été observée et l'impact sur la viabilité des cellules a été mesuré.
2. dans un second chapitre, l'utilisation des monocytes/macrophages comme **Chevaux de Troie** a été expérimentée ***in vivo*** dans un modèle de gliome chez le rat. Des monocytes/ macrophages de lignée ou primaires ont été marqués puis injectés par voie intraveineuse dans les animaux. Ceux-ci ont ensuite été sacrifiés et les coupes de cerveau ont été observées dans le but de retrouver les monocytes/macrophages ayant migré.
3. enfin, un troisième et dernier chapitre fera office d'ouverture en présentant les prémices d'une nouvelle méthode de distribution des NPs Fe dans la tumeur : il s'agit d'ouvrir localement la barrière hémato-encéphalique au niveau de la tumeur à l'aide d'**ultra-sons focalisés**. Cette courte étude préliminaire a pour objectif de montrer que l'accumulation des NPs Fe dans les zones ainsi perméabilisées est possible, offrant ainsi une preuve de concept de cette stratégie pour l'application à la SSRT.

Deuxième partie

Résultats et discussion : partie photoactivation

Chapitre 4

Résultats *in silico* : simulations Monte-Carlo

Sommaire

4.1 La simulation Monte-Carlo appliquée aux interactions photons-matière 102
4.1.1 Le code PENELOPE, fondé sur la méthode Monte-Carlo 102
4.1.2 Application à l'augmentation de dose par atomes lourds 103
4.1.3 Stratégies utilisées dans ces travaux 104
4.2 Résultats : dose dans un cube homogène de 1 cm de côté 107
4.2.1 Influence de l'élément 108
4.2.2 Influence de l'énergie 108
4.2.3 Influence de la concentration 109
4.2.4 Utilisation de ces résultats 109
4.3 Résultats : spectre des particules émises par la NP cylindrique 109
4.3.1 Spectre d'"émission" à 30 keV 109
4.3.2 Evolution du spectre d'"émission" selon l'énergie d'irradiation 111
4.4 Rayons d'action des électrons secondaires : l'outil *Tracks* 114
4.4.1 Cartes 2D des trajectoires des électrons 114
4.4.2 Parcours théoriques des électrons : combinaison avec données PSF 116
4.4.3 Portée des interactions 117
4.5 Discussions autour des simulations 120
4.6 Le Chapitre 4 en quelques mots 121

Objectif : obtenir des ordres de grandeur de l'effet obtenu à une échelle macroscopique, et tenter d'apporter quelques connaissances sur les processus physiques intervenant à différentes échelles

Ce chapitre est consacré aux résultats des simulations Monte-Carlo appliquées à l'augmentation de dose provoquée par la présence de fer. Ces simulations sont réalisées à l'échelle cellulaire et permettent d'estimer la contribution des différents phénomènes physiques à cette échelle. D'autres auteurs réalisent des études à une échelle encore plus fine [Poig 17]. Cette étude a pour objectif d'alimenter la réflexion sur les phénomènes physiques en jeu afin d'optimiser par la suite les protocoles.

Ce travail a été réalisé avec le logiciel de simulations Monte-Carlo PENELOPE, dont l'utilisation a été éclairée par les précieux conseils de Rachel Delorme (CNRS Orsay), Juan Carlos Garcia Hernandez (Laboratoire Modélisation et Simulation des Systèmes (LM2S), LIST, CEA Saclay) et Dimitri Reynard (RSRM Grenoble). Il m'a été possible de construire les codes Python pour traiter les données générées par les simulations grâce aux conseils d'Emmanuel Brun (RSRM Grenoble).

4.1 La simulation Monte-Carlo appliquée aux interactions photons-matière

4.1.1 Le code PENELOPE, fondé sur la méthode Monte-Carlo

La méthode Monte-Carlo est une méthode algorithmique permettant d'estimer une valeur numérique en utilisant des processus stochastiques. Ainsi, la méthode Monte-Carlo s'applique particulièrement bien aux interactions photon-matière car celles-ci sont uniquement régies par des lois de probabilités représentées par les sections efficaces. Dans le contexte du renforcement de la dose par atomes lourds, les simulations Monte-Carlo sont utilisées pour étudier les phénomènes d'interaction sur plusieurs échelles : macro, micro et même nanoscopiques. Elles permettent de simuler les aspects physiques mais certains codes tentent aussi d'introduire les composantes chimiques et biologiques que les interactions physiques entraînent.

Le **principe général** de la simulation Monte-Carlo appliquée aux interactions photons-matière peut être schématisé comme suit : tout d'abord, un faisceau de particules primaires (dans notre cas, des photons) dont les propriétés sont décrites par l'utilisateur se propage dans une cible dont la géométrie et la composition sont elles aussi définies par l'utilisateur. Chacune de ces particules primaires peut ensuite interagir avec les éléments de la cible : grâce aux lois de probabilité et un nombre tiré au "hasard", le code détermine quand et comment chaque particule va interagir. Lors d'une interaction, la particule pourra être diffusée ou absorbée, et éventuellement mettre d'autres particules en mouvement. Les nombres ne sont pas réellement choisis au "hasard", mais sont en fait générés par la méthode des congruences linéaires [Delo 13]. Un nombre de départ, appelé *seed* ("graine"), permet de générer une suite de nombres. La séquence de nombres qui en résulte n'est donc pas réellement aléatoire car elle est issue d'un algorithme déterministe, mais cette méthode est réputée pour avoir de bonnes propriétés stochastiques et une période suffisamment grande pour garder ces propriétés aléatoires [Salv 11].

Le **transport des photons** est plus simple à simuler que le transport des électrons (ou des positrons) car, en comparaison, les photons interagissent peu pendant leur parcours dans la matière. La distance à la prochaine interaction est déterminée par les sections efficaces et des nombres tirés

au sort. Puis, lors de l'interaction, le même procédé est employé pour décider si cette interaction génère une perte d'énergie, un changement de direction ou encore une mise en mouvement de particule secondaire (qui sera étudiée lorsque le photon primaire aura été absorbé dans le milieu ou sorti du volume d'intérêt).

Le **transport des électrons** (ou des positrons) est bien plus complexe à simuler car les électrons interagissent beaucoup, changent fréquemment de direction et perdent en général seulement une petite fraction de leur énergie à chacune de leurs multiples interactions. La simulation des évènements "interaction par interaction" entraîne donc rapidement de grands temps de calcul. C'est pourquoi, au lieu de décrire les interactions une par une comme cela peut être le cas pour les photons, ces évènements sont regroupés dans un "pas" global, une étape du trajet de l'électron, pendant lequel un certain nombre d'interactions vont avoir lieu. De cette étape "globale" résultera une perte d'énergie "globale" et un changement de direction "global".

Ces travaux ont été réalisés grâce au code **PENELOPE 2014** (pour *PENetration and Energy LOss of Positrons and Electrons*), un code dédié au transport des photons, électrons et positrons dans le cadre de la physique médicale. Il est donc optimisé pour fonctionner aux énergies qui nous intéressent particulièrement, permettant d'étudier le transport de ces particules dans une gamme d'énergie allant de la centaine d'eV au GeV. Ce code a été développé par Francesc Salvat, Jose M. Fernandez-Varea et Josep Sempau en 1995 et a évolué au cours de plusieurs versions dont la dernière à ce jour est PENELOPE 2014, un code écrit en Fortran 90. Les sources des sections efficaces utilisées dans PENELOPE ne seront pas détaillées ici mais sont répertoriées dans les chapitres 2 et 3 du manuel [Salv 11].

PENELOPE est un code de classe II, c'est-à-dire qu'il utilise un procédé mixte pour simuler le transport des électrons : la méthode condensée décrite précédemment est appliquée dans le cas d'évènements dits *soft* pendant lesquels les électrons sont peu déviés et perdent peu d'énergie. Dans ce cas, plusieurs évènements sont groupés dans un "pas" global. Pour les autres évènements, dits *hard*, le trajet de l'électron est détaillé comme pour les photons -ce qui augmente les temps de calculs. Le seuil entre les interactions *soft* et *hard* sont déterminés par l'utilisateur.

4.1.2 Application à l'augmentation de dose par atomes lourds

L'utilisation de codes Monte-Carlo pour simuler l'augmentation de dose par éléments lourds sous forme de NPs est au coeur de plusieurs études visant à optimiser les conditions expérimentales et à comprendre l'origine des phénomènes observés *in vitro* et *in vivo*. Cette section retrace succinctement un historique de cette application des codes Monte-Carlo. Elle a pour objectif de mettre en valeur les avancées et les difficultés actuelles de ce domaine. Cet historique a été réalisé d'après les travaux de Rachel Delorme [Delo 13].

Il existe principalement deux types de simulations : celles qui s'intéressent à un mélange homogène eau - atomes lourds, et celles qui s'intéressent à la simulation d'un mélange eau - NPs, dans lequel les atomes lourds sont liés sous forme de nanoparticules. En pratique, seules quelques simulations parmi les travaux ayant été réalisés prennent cette géométrie particulière en compte.

Dès les expériences pionnières d'Hainfeld en 2004, une **première étude Monte-Carlo** a été initiée dans le but d'estimer le dépôt de dose dû à la présence d'or dans la tumeur. Pour cela, l'équipe de Cho a simulé les interactions provoquées par la propagation d'un faisceau de photons X dans une tumeur superficielle présentant une distribution d'or parfaitement homogène. Les résultats, encourageants, ne permettent toutefois pas d'expliquer la totalité de l'impact biologique observé par la simulation des seuls phénomènes physiques. La conclusion de ces travaux révèle la

nécessité d'étudier ces phénomènes à l'échelle microscopique [Cho 05]. McMahon *et al.* appuient cette affirmation et suggèrent que les électrons produits par ces interactions sont un des éléments qui pourraient permettre de comprendre l'effet des NPs couplées à la radiothérapie [McMa 11]. Les simulations actuelles tendent donc de plus en plus vers l'étude de la distribution du dépôt de dose à l'échelle du nanomètre autour des NPs.

Dans la même logique, Zhang *et al.* [Zhan 09] ont étudié l'**impact de la géométrie "nanoparticules"** par rapport au mélange homogène. Ces simulations requièrent un grand temps de calcul, estimé à 120 h sur 10 processeurs. Ils observent alors que l'augmentation de dose simulée le mélange homogène eau-or est supérieure à celle simulée dans le mélange eau - NPs d'or de 100 nm de diamètre. Ces résultats sont donc encore plus éloignés des observations biologiques, et montrent l'importance de la géométrie "nanoparticules".

Faut-il donc encore baisser l'échelle d'étude pour comprendre l'origine des observations biologiques expérimentales ? Autour d'une NP, le dépôt d'énergie a en effet une dimension nanométrique, notamment due à la production d'électrons Auger et Coster-Krönig. Ces électrons ayant un parcours inférieur à 100 nm, cela suppose donc que les NPs doivent être proches de l'ADN pour induire un effet biologique observable. Lechtman *et al.* utilisent PENELOPE pour étudier l'origine des électrons et connaître la **contribution à la dose de chacune des particules produites** lors de l'irradiation d'une NP d'or. Ils concluent leur travaux en affirmant que ces contributions dépendent du diamètre de la NP. Alors que la contribution des photoélectrons et photons de fluorescence varie peu avec la taille de la NP, le nombre d'électrons Auger produits diminue lorsque le diamètre de la NP augmente car ils sont auto-absorbés. Selon cette étude, les photoélectrons contribueraient majoritairement au dépôt de dose à l'échelle microscopique et les électrons Auger, au dépôt de dose à l'échelle nanoscopique (de l'ordre de la centaine de nm) [Lech 11].

Enfin, de plus en plus de modèles cherchent aujourd'hui à introduire dans les simulations la **composante biologique** induite par les interactions purement "physiques". Ainsi, McMahon *et al.* associent en 2011 le LEM (*Local Effect Model*), un modèle permettant de quantifier l'effet biologique induit par une irradiation d'ions, au module Geant4DNA. Leurs travaux se révèlent assez prédictifs de la biologie et suggèrent qu'en-dessous d'un rayon de 250 nm autour de la NP d'or, ce sont les électrons Auger qui contribuent le plus au dépôt de la dose. D'autre part, les travaux en cours de Beuve et Poignant (IPNL, Lyon) visent à développer un modèle couplant le modèle MDM pour l'aspect physico-chimique et le modèle Nanox pour l'aspect biophysique (effets biologiques induits par une irradiation d'ions). Ces simulations auront pour objectif de guider l'optimisation des NPs lors de leur développement et pour leur transfert en clinique [Poig 17].

En résumé, les simulations Monte-Carlo appliquées à l'augmentation de dose par les NPs se heurtent aujourd'hui à plusieurs **difficultés** : les géométries à étudier sont de plus en plus complexes et impliquent donc de grands temps de calcul. De plus, ces études nécessitent la connaissance des sections efficaces adaptées aux interactions à l'échelle nanométrique. Enfin, l'introduction de la composante biologique est en cours d'étude dans des travaux spécifiques, mais ne sera pas abordée dans ce chapitre.

4.1.3 Stratégies utilisées dans ces travaux

Le code PENELOPE est lancé grâce à un programme général appelé *penmain*, qui fait appel à trois fichiers d'entrée décrivant les paramètres de la simulation : un fichier *.in*, dans lequel l'utilisateur règle notamment les caractéristiques la source, les angles et les énergies de coupure, un fichier *.geo* qui décrit la géométrie à étudier et les matières qui la composent, et enfin un fichier *.mat* qui

contient les sections efficaces spécifiques aux matériaux. Le fichier *.mat* relatif à chaque matériau utilisé dans ces travaux a été créé grâce à un programme interne à PENELOPE.

Trois outils dérivant du code PENELOPE ont été utilisés dans ce chapitre :
- le dépôt de dose dans les différents éléments du modèle géométrique, appelés "*bodys*",
- le spectre des particules "émises" par la NP irradiée, grâce aux *PSF*,
- une visualisation des "chemins" de chaque particule émise, grâce à l'outil *Tracks*.

4.1.3.1 Renforcement de dose macroscopique

Le renforcement de dose macroscopique a été étudié en modélisant un cube de 1 cm de côté, contenant soit de l'eau, soit un mélange homogène d'eau et d'un élément lourd (fer, iode ou gadolinium par exemple). La source est une source de photons carrée de mêmes dimensions que le cube. Le DEF (pour *Dose Enhancement Factor*, ou facteur d'augmentation de la dose) a ensuite été calculé selon l'énergie des photons incidents ou la concentration des éléments dans l'eau, avec la formule suivante :

$$DEF = \frac{\text{Dose déposée avec l'élément lourd}}{\text{Dose déposée sans l'élément lourd}} \tag{4.1}$$

Pour obtenir le DEF, l'énergie déposée dans le cube a été tirée du fichier résultat *penmain-res*. Connaissant la masse volumique de chacune des conditions (eau, ou eau + atome lourd), il est donc possible de remonter au DEF : il s'agit du ratio entre la "dose" (en eV/g) calculée pour le cube contenant l'élément, et la "dose" déposée dans le cube d'eau pour la même énergie d'irradiation. Le nombre de photons incidents (*showers*) a été fixé à 1.10^8. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}.

4.1.3.2 PSF : origine des particules secondaires

Il est possible avec PENELOPE d'obtenir le spectre des particules émises lors de l'irradiation d'une particule grâce à l'outil "PSF" (*Phase Space File*). Pour cela, la nanoparticule est entourée d'un autre volume rempli d'eau : lors de la simulation, chacune des particules entrant dans ce volume sera référencée dans un fichier de sortie, le fichier *psf-impdet-01.dat*. Il est possible, notamment, de déduire de ce fichier le spectre en énergie des particules émises ainsi que de remonter aux origines de ces particules secondaires.

Dans ce but, la géométrie étudiée est celle d'une nanoparticule d'oxyde de fer Fe_3O_4 cylindrique de 50 nm de diamètre et de 200 µ de long, placée dans des cylindres concentriques d'eau (rayon : 325 nm, 700 nm, 5 µm, 30 µm ; longueur : 200 µ). Pour le "contrôle", cette nanoparticule est remplie d'eau. La source est ponctuelle, et vise l'axe du cylindre. Le choix d'une nanoparticule cylindrique permet d'augmenter "artificiellement" le nombre d'interactions entre les photons et la matière de manière à avoir statistiquement assez d'information. Le nombre de photons incidents a été fixé à 500 000 et les EABS (énergies à partir desquelles les particules sont considérées comme absorbées) ont été descendues à 50 eV.

Pour chaque particule qui pénètre dans le volume fixé pour créer le "PSF", une ligne est ajoutée au fichier *psf-impdet-01*. Chaque colonne indique une des propriétés de cette particule, notamment sa nature KPAR (1 pour un électron, 2 pour un photon), son énergie et l'interaction dont cette particule est issue. La nature de l'interaction d'origine de la particule est codée dans les 4 composantes "ILB".

- ILB1 indique si la particule est une particule primaire (1), secondaire (2) ou issue de l'interaction d'une particule secondaire par exemple (3).

- ILB2 indique la nature de la particule à l'origine de l'interaction dont est issue la particule considérée. Elle est codée comme KPAR.
- ILB3 indique la nature de l'interaction. Elle est codée dans la valeur ICOL le tableau 4.2 (A).
- enfin, ILB4 indique les couches atomiques mises en jeu *via* un nombre "codé" : $Z * 10^6 + IS1 * 10^4 + IS2 * 100 + IS3$. La manière de "coder" cette partie dépend ensuite des versions de PENELOPE.

Dans la version "beta" de PENELOPE utilisée pour cette étude, nous pouvons considérer plusieurs cas :

- IS1 = IS2 = 0 : il s'agit alors d'un photoélectron ayant été arraché à la couche représentée par la valeur de IS3 (cf 4.1).
- IS1 est non nul : dans ce cas, il s'agit d'un électron Auger, Coster-Krönig ou super Coster-Krönig. IS1 représente la couche de laquelle le photoélectron a été arraché, IS2 la couche d'où provient l'électron qui vient combler la vacance, et IS3 la couche de laquelle est l'électron est éjecté (voir Fig. 4.1).

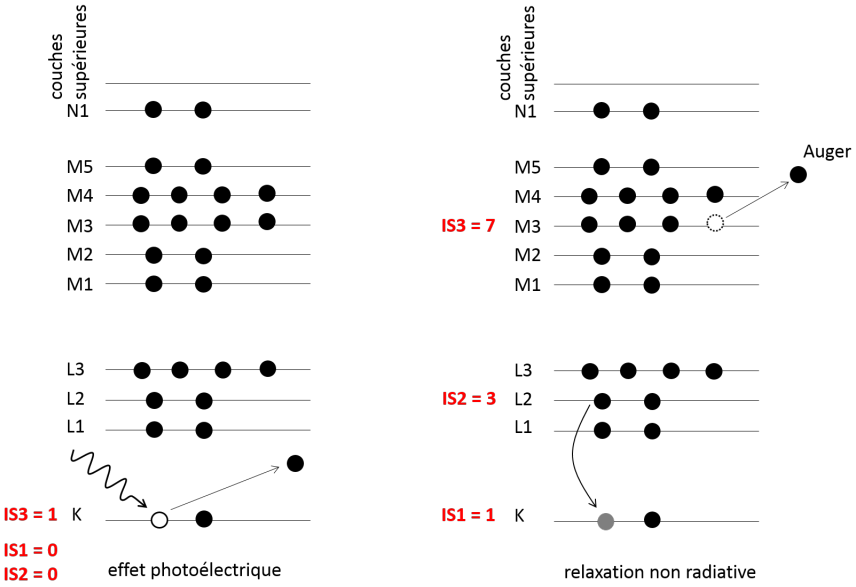


Figure 4.1 – *Schéma illustrant la dénomination des couches électroniques dans le logiciel de simulation Monte-Carlo PENELOPE pour décrire l'origine du photoélectron (à gauche) et des électrons de relaxation (à droite). D'après les explications de [Salv 11].*

Les couches d'un atome sont dites "externes" lorsque leur énergie d'ionisation est inférieure à l'énergie seuil E_c. Cette énergie est définie comme le maximum entre 50 eV et les énergies d'ionisation des couches N7 et O1 lorsqu'elles existent. Lorsqu'un photoélectron arrache un électron à une des couches externes, le code considère que l'électron reçoit toute l'énergie du photon, et que le processus n'entraîne pas de relaxation de la part de l'atome.

Pour analyser ces données, un code python a été écrit de manière à récupérer les origines et l'énergie de chaque particule. Par exemple, un photoélectron issu de la couche L du fer sera décrit par les paramètres suivants : KPAR=1, ILB2=2, ILB3=3 (un électron, issu de l'interaction photoélectrique qui est déclenchée par un photon incident, et qui n'est pas un électron issu de la

ICOL	electrons (KPAR=1)	photons (KPAR=2)	positrons (KPAR=3)
1	artificial soft event (random hinge)	coherent (Rayleigh) scattering	artificial soft event (random hinge)
2	hard elastic collision	incoherent (Compton) scattering	hard elastic collision
3	hard inelastic collision	photoelectric absorption	hard inelastic collision
4	hard bremsstrahlung emission	electron-positron pair production	hard bremsstrahlung emission
5	inner-shell impact ionisation		inner-shell impact ionisation
6			annihilation
7	delta interaction	delta interaction	delta interaction
8	auxiliary interaction	auxiliary interaction	auxiliary interaction

label	shell	label	shell	label	shell
1	K ($1s_{1/2}$)	11	N2 ($4p_{1/2}$)	21	O5 ($5d_{5/2}$)
2	L1 ($2s_{1/2}$)	12	N3 ($4p_{3/2}$)	22	O6 ($5f_{5/2}$)
3	L2 ($2p_{1/2}$)	13	N4 ($4d_{3/2}$)	23	O7 ($5f_{7/2}$)
4	L3 ($2p_{3/2}$)	14	N5 ($4d_{5/2}$)	24	P1 ($6s_{1/2}$)
5	M1 ($3s_{1/2}$)	15	N6 ($4f_{5/2}$)	25	P2 ($6p_{1/2}$)
6	M2 ($3p_{1/2}$)	16	N7 ($4f_{7/2}$)	26	P3 ($6p_{3/2}$)
7	M3 ($3p_{3/2}$)	17	O1 ($5s_{1/2}$)	27	P4 ($6d_{3/2}$)
8	M4 ($3d_{3/2}$)	18	O2 ($5p_{1/2}$)	28	P5 ($6d_{5/2}$)
9	M5 ($3d_{5/2}$)	19	O3 ($5p_{3/2}$)	29	Q1 ($7s_{1/2}$)
10	N1 ($4s_{1/2}$)	20	O4 ($5d_{3/2}$)	30	outer shells

Figure 4.2 – *(A) Notation des interactions (ICOL) dans le code Monte-Carlo PENELOPE. (B) Notation des couches électroniques dans le code Monte-Carlo PENELOPE. Tableaux tirés de [Salv 11].*

relaxation), puis par Z=26, IS1=IS2=0 et IS3 compris entre 2 et 4 (selon la sous-couche L dont il est issu).

4.1.3.3 "Chemins"

Enfin, l'outil *Tracks* de PENELOPE a été utilisé pour afficher les "traces" des particules, c'est-à-dire leur position et leur énergie juste après chacune des interactions qu'elles subissent. Le programme *ParticleTracks.exe* est lancé et prend pour entrée les mêmes fichiers habituels *.in*, *.mat* et *.geo*. La géométrie utilisée est une nanoparticule cylindrique de 50 nm de diamètre et de 1 mm de long, dans un cube d'eau de 1 mm de côté. Cette nanoparticule est remplie d'eau ou d'un mélange homogène eau + fer à 100 mg/mL. Le mélange eau + fer remplace l'oxyde de fer Fe_3O_4 pour réduire la taille des fichiers de sortie (sinon les données, trop lourdes, deviennent complexes à traiter). Toutefois, les probabilités d'interactions de photons dans ce mélange restent assez fiables avec les paramètres étudiés. C'est pourquoi la NP est modélisée comme cylindrique pour augmenter le nombre d'interactions selon l'axe d'irradiation. Le nombre de photons incidents est alors fixé à 80 000, la limite supérieure pour pouvoir aisément traiter les données.

Une fois les données générées, un code python écrit pendant ces travaux permet de récupérer les fichiers *electron.trk* et *photon.trk* pour afficher les traces des électrons et des photons. En effet, les fichiers *.trk* indiquent les positions des particules et leur énergie. Les données ont été utilisées de deux manières. D'un côté, le code python génère une carte en 2D des traces, permettant ainsi d'observer la distribution des échanges d'énergie. D'autre part, le code python calcule la distance des interactions par rapport à l'axe du cylindre. L'histogramme qui en résulte indique la distribution du nombre d'interactions par rapport à l'axe du cylindre. Cette information, à défaut de donner une mesure de la dose, permet toutefois de discuter de la contribution de chaque mécanisme d'interaction selon l'échelle étudiée. Les électrons interagissant de plus en plus lorsqu'ils perdent de l'énergie, il est possible de déterminer grossièrement leur rayon d'action avec cette méthode.

4.2 Résultats : dose dans un cube homogène de 1 cm de côté

La figure 4.3 représente l'évolution du DEF dans un cube homogène de 1 cm de côté, selon l'énergie d'irradiation. Plusieurs éléments ont été étudiés à titre de comparaison avec le fer : les concentrations représentées dans cette figure sont représentatives de ce qu'il est possible de mesurer

en *vivo* dans les gliomes. La concentration de fer représente une concentration réaliste de fer dans les cellules.

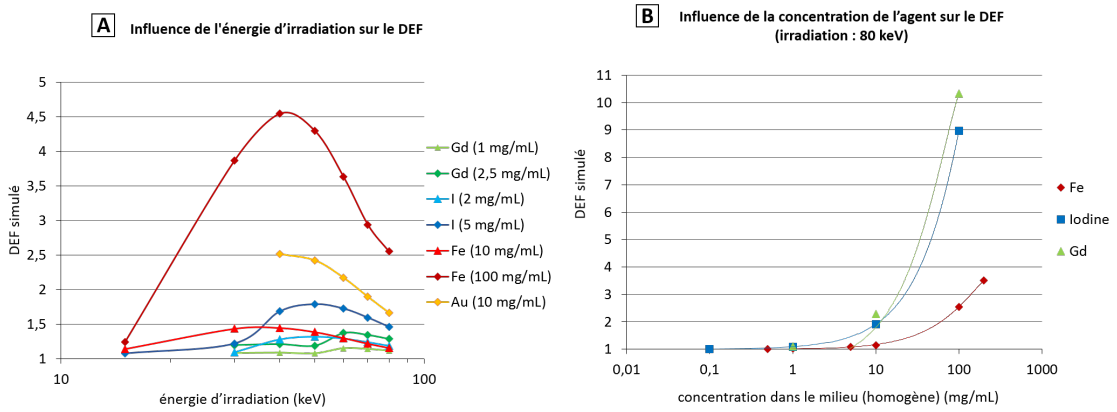


Figure 4.3 – *(A) Evolution du DEF simulé en fonction de l'énergie d'irradiation pour diverses concentrations de Fe, d'Au, d'I ou de Gd. Les atomes lourds sont répartis de façon homogène dans le volume considéré. (B) Evolution du DEF simulé en fonction de la concentration des composés dans le milieu. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de* 10^{-3}.

4.2.1 Influence de l'élément

Le fer est, au premier abord, bien moins attrayant que l'or ou le gadolinium, car l'effet physique théorique pour une même concentration d'élément est moindre avec le fer. Cependant, cette affirmation doit être remise dans le contexte de la concentration qu'il est possible d'obtenir *in vivo*. Selon les simulations représentées dans la figure 4.3 (A), une accumulation de 10 mg/mL de fer dans la tumeur permettrait d'obtenir un renforcement du dépôt de dose comparable à celui qu'il est possible d'obtenir avec l'iode ou de gadolinium à des concentrations réalistes *in vivo*. Ces résultats confirment l'intérêt du fer pour l'augmentation de dose.

4.2.2 Influence de l'énergie

Selon ces simulations, l'énergie "optimale" pour obtenir le DEF le plus important avec le fer se situe entre 30 et 45 keV (fig. 4.3 (A)). Cette énergie optimale est un peu plus élevée pour l'iode ou le gadolinium (plutôt autour de 50 keV pour l'iode, et 60-70 keV pour le Gd). D'un point de vue clinique, ces résultats sont plutôt défavorables pour le fer : s'il est encore possible d'irradier un gliome à 80 keV, il devient plus complexe d'irradier ces tumeurs profondes à 40 keV. Le faisceau serait très vite atténué par les tissus sains et peu de photons atteindraient la tumeur. Cependant, selon les résultats de la figure 4.3 (B), un effet d'augmentation de dose à 80 keV peut être obtenu avec le fer si la concentration en fer dans la tumeur est suffisante.

La forme globale de ces courbes reste similaire pour tous les éléments : elle est donnée par l'absorption des rayons X par l'eau selon l'énergie d'irradiation. Aux basses énergies, l'effet photoélectrique est très probable pour les éléments lourds mais l'eau absorbe aussi les rayons X, diminuant ainsi le gain apporté par les éléments lourds. Aux hautes énergies, l'effet photoélectrique devient de moins en moins probable. Le DEF tend donc à nouveau vers 1.

4.2.3 Influence de la concentration

L'influence de la concentration des éléments sur le DEF est en accord avec les résultats présentés dans l'état de l'art et les expériences *in vitro* et *in vivo* dans le domaine du renforcement de dose par atome lourd : plus la concentration en élément lourd est élevé, plus le DEF est important. Pour le fer, les fortes concentrations (10 à 100 mg/mL) sont représentatives des concentrations atteintes dans les cellules de gliome après 24 h d'exposition aux NPs Fe [Gime 15]. Les concentrations de fer dans le milieu de culture utilisées *in vitro* (0.02 à 0.15 voire 0.3 mg/mL) ne permettraient par contre pas d'obtenir de renforcement de la dose significatif. C'est donc bien l'incorporation massive de fer par les cellules qui rend l'approche intéressante.

4.2.4 Utilisation de ces résultats

Le DEF présenté dans la figure 4.3 est un DEF "macroscopique" issu de la comparaison de l'énergie déposée dans des cubes homogènes d'eau ou de mélange eau + élément lourd. Les éléments lourds sont "dilués" de manière homogène dans ce volume et ne sont pas sous forme de NPs. Nous avons vu dans l'état de l'art que la géométrie "nanoparticule" n'induit pas le même dépôt de dose que l'élément dilué, bien que les concentrations globales en élément dans le volume soient les mêmes. Ces simulations ont donc simplement pour vocation de donner des ordres de grandeur et une tendance générale de l'évolution du DEF avec l'énergie et selon l'élément utilisé.

4.3 Résultats : spectre des particules émises par la NP cylindrique

Lors de cette étude, le spectre des photons et électrons "émis" par la nanoparticule lors de l'irradiation a été étudié à plusieurs échelles : notamment, juste en sortie de la nanoparticule (donc à 50 nm de l'axe du cylindre), à l'échelle sub-cellulaire (à 700 nm et 5 µm de l'axe du cylindre), et à l'échelle de plusieurs cellules (à 30 µm de l'axe du cylindre). La distance de 5 µm représente une moitié de cellule environ.

4.3.1 Spectre d'"émission" à 30 keV

Un exemple de spectre en sortie de la nanoparticule après une irradiation à 30 keV est représenté dans la figure 4.4.

Les **photons** sont représentés en orange. Nous pouvons observer les photons Rayleigh, qui ont la même énergie que les photons incidents, ainsi que le front de photons Compton, d'énergie un peu inférieure à celle des photons incidents. D'autre part, des photons émis à une énergie spécifique proviennent de la relaxation radiative des atomes lorsque ceux-ci se retrouvent dans un état excité (effet photoélectrique, ionisation des couches internes par des électrons, par exemple). L'émission Bremsstrahlung reste peu fréquente à ces énergies.

Les **électrons** sont représentés en bleu. Nous pouvons repérer, parmi les électrons de haute énergie, les photoélectrons qui sont arrachés des couches externes par effet photoélectrique. Selon les approximations faites par PENELOPE, les photoélectrons arrachés des couches externes reçoivent toute l'énergie du photon incident (4.1.3.2). Les photoélectrons arrachés des couches internes ont une énergie spécifique dépendante de l'énergie d'irradiation et de l'énergie de liaison. Les photoélectrons K de l'oxygène ou les photoélectrons de la couche L du fer ont pour la plupart une énergie proche de l'énergie d'irradiation, car leur énergie de liaison reste faible. Nous pouvons observer par ailleurs

un pic à 23 keV environ, relatif aux photoélectrons de la couche K du fer après irradiation à 30 keV. Les électrons issus de la relaxation des atomes excités (Auger, Coster-Krönig, super Coster-Krönig) sont émis à des énergies bien précises, spécifiques de l'atome. Enfin, aux plus basses énergies, nous pouvons retrouver les électrons qui proviennent des interactions Compton, et qui ont donc une énergie basse complémentaire de celle des photons Compton. A ces électrons s'associent les électrons issus des ionisations des couches internes par d'autres électrons (*inner shell impact ionization*) ainsi que les électrons ayant subi des collisions avec un échange d'énergie ou de direction suffisamment important pour être étudié séparément (*hard inelastic collisions*). Ces collisions sont aussi possibles mais bien plus rares pour les électrons de plus haute énergie.

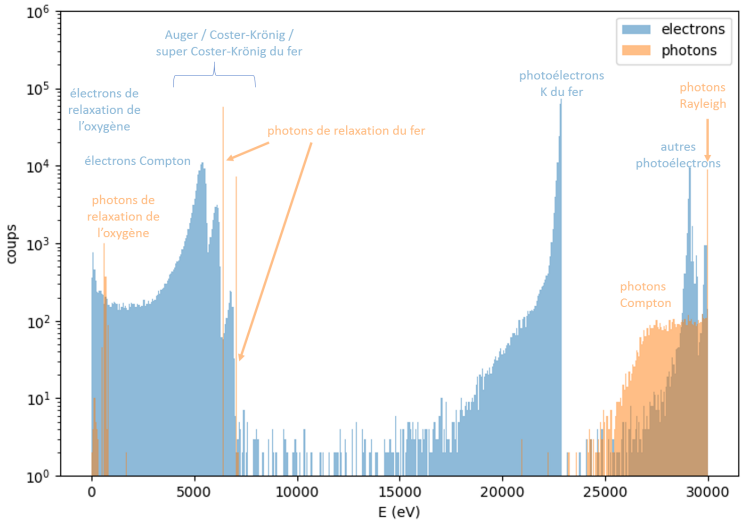


Figure 4.4 – *Spectre en énergie des photons et des électrons secondaires émis hors d'une NP d'oxyde de fer Fe_3O_4 de 50 nm de diamètre lors d'une irradiation à 30 keV.*

L'énergie des photons et électrons issus de **relaxations radiatives et non radiatives** ne dépend pas de l'énergie des photons incidents. Elle est caractéristique de l'atome subissant l'interaction. L'énergie des photons de fluorescence correspond à la différence des énergies d'ionisation de la couche dont est issu le photoélectron (pour une énergie d'irradiation à 30 keV, il s'agit la plupart du temps de la couche K) et de la couche dont est issu l'électron comblant la vacance (la plupart du temps, pour le fer : les couches L3 et L2, et M2-M3 ; voir table ci-dessous).

A une énergie d'irradiation de 30 keV, les électrons **Auger, Coster-Krönig et super Coster-Krönig** résultent pour la plupart de la relaxation d'un atome de fer comblant une vacance en couche K. Leur énergie est égale à $E = E_1 - E_2 - E_3$ avec les E_i les énergies d'ionisation des couches suivantes : 1, la couche comportant la vacance, 2 : la couche d'où provient l'électron comblant la vacance, 3 : la couche depuis laquelle l'électron Auger est émis (voir fig. 4.1). Si l'électron qui vient combler la vacance provient de la couche L, les électrons Auger résultants auront en général une énergie plutôt basse, autour de 5.5 keV. Si l'électron comblant la vacance provient d'une couche supérieure (la couche M par exemple), l'énergie des électrons Auger sera un peu plus élevée. Cette relaxation est toutefois moins probable. Les relaxations les plus fréquentes sont celles pour lesquelles les électrons de relaxation sont émis de la couche L3.

Couche (PENELOPE)	Couche correspondante	Energies d'ionisation pour O (eV)	Energies d'ionisation pour Fe (eV)
1	K	$5.38000\ 10^2$	$7.11700\ 10^3$
2	L1	$2.84800\ 10^1$	$8.51000\ 10^2$
3	L2	$1.36200\ 10^1$	$7.26000\ 10^2$
4	L3	$1.36200\ 10^1$	$7.13000\ 10^2$
5	M1		$9.80000\ 10^1$
6	M2		$6.10000\ 10^1$
7	M3		$5.90000\ 10^1$
8	M4		9.00000
8	M5		9.00000
8	N1		7.87000

4.3.2 Evolution du spectre d'"émission" selon l'énergie d'irradiation

La figure 4.5 représente l'évolution du spectre d'"émission" juste en sortie de la NP en fonction de l'énergie des photons incidents. Cette figure est associée à la figure 4.6 (A) qui indique les proportions d'électrons "émis" selon leur origine pour chaque énergie. Pour une énergie d'irradiation de 6 keV (inférieure au seuil K du fer), les électrons proches de l'énergie d'irradiation sont surtout des photoélectrons de la couche L pour le fer et de la couche K pour l'oxygène. A 8 keV, une composante d'électrons Auger (ou Coster-Krönig et super Coster-Krönig) apparaît dans le cas de l'irradiation de la NP Fe. En effet, cette énergie d'irradiation est tout juste supérieure au K-edge du fer : l'interaction photoélectrique avec la couche K est donc très probable. Les photoélectrons, par contre, n'apparaissent pas encore car les photons apportent une énergie suffisante pour les arracher, mais insuffisante pour que ceux-ci puissent ensuite être transportés. Il faut attendre des énergies d'irradiation un peu plus grandes (10 keV par exemple) pour voir apparaître la composante des photoélectrons K du fer.

A 30 keV et plus, le front de photons Compton et la masse d'électrons mis en mouvement correspondante deviennent bien visibles et prennent de l'ampleur lorsque l'énergie d'irradiation augmente. De fait, pour l'irradiation d'une NP "d'eau", les électrons Compton représentent presque 50% des électrons "émis" à 30 keV, puis plus de 90% à 80 keV. D'autre part, la composante de photoélectrons et d'électrons de relaxation diminue avec l'énergie : les interactions photoélectriques sont en effet de moins en moins probables. Cependant, pour l'irradiation d'une NP de Fe_3O_4 à 80 keV, les électrons Compton ne représentent qu'un peu plus de 20% des électrons émis. Presque 80% des électrons émis proviennent de l'effet photoélectrique ou des relaxations atomiques qu'il engendre.

Ces mêmes simulations ont aussi été réalisées à différentes distances de la NP, de manière à voir jusqu'à quelle distance les particules peuvent être retrouvées. La figure 4.6 indique les proportions des électrons émis selon leur origine, à différentes énergies et à différentes distances de la NP (juste en sortie, à 325 nm, 700 nm ou 30 µm).

Comme nous l'avons constaté avant, les photoélectrons de la couche K de l'oxygène, et de la couche L du fer (le cas échéant) prédominent juste sous le K-edge du fer. Juste au-dessus du K-edge du fer, seuls les électrons Auger apparaissent car les photoélectrons n'ont pas l'énergie nécessaire pour être transporté. D'autre part, les interactions photoélectriques avec la couche L du fer deviennent bien moins probables. A des énergies d'irradiation plus élevées, les électrons

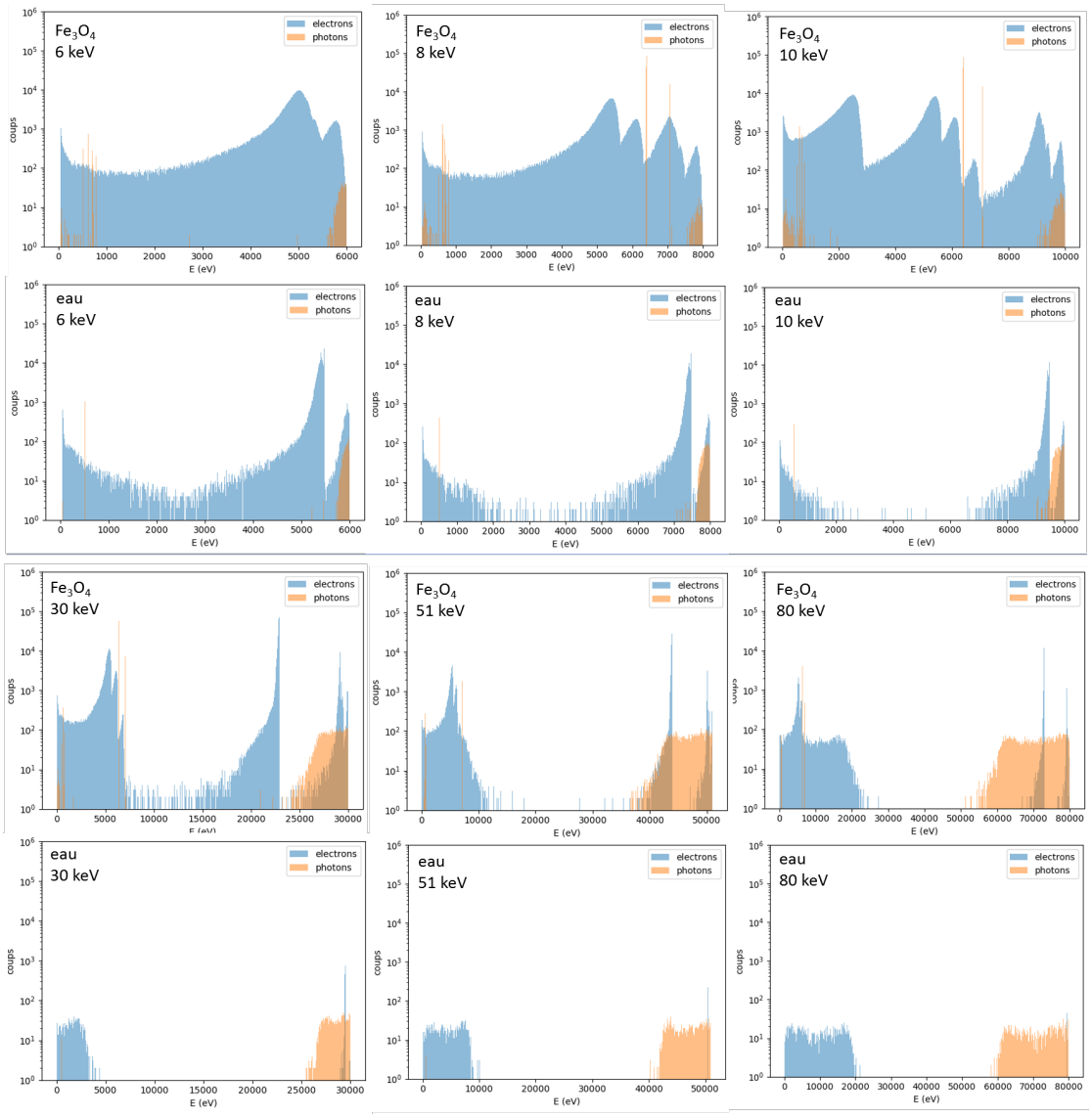


Figure 4.5 – *Spectre en énergie des photons et des électrons secondaires émis hors d'une NP d'oxyde de fer Fe_3O_4 de 50 nm de diamètre lors d'une irradiation à 6, 8, 10, 30, 51 ou 80 keV. Le spectre relatif à l'irradiation d'une NP identique remplie d'eau est donnée à titre comparatif.*

issus directement ou indirectement (relaxation) de l'interaction photoélectrique deviennent moins nombreux.

A 300 nm de la NP, plus de 80% des électrons Auger sont encore présents. Les photoélectrons de la couche K du fer et de l'oxygène ont presque tous été absorbés pour une énergie d'irradiation de 10 keV : en effet, l'énergie qui leur était attribuée ne leur permet pas de parcourir plus de 800 nm selon les données de la Fig. 4.8. A 675 nm de la NP, il reste moins de 20% des électrons Auger, ce qui suggèrent que ceux-ci sont absorbés en majorité entre 300 et 700 nm. A 5 µm de la NP, les électrons "émis" par la NP Fe sont à plus de 80% les électrons de la couche K du fer et de l'oxygène. Les autres ont été absorbés. A 30 µm de la NP, il ne reste que peu d'électrons n'ayant pas été absorbés.

Figure 4.6 – *Proportions des électrons émis sortant d'une NP d'oxyde de fer Fe_3O_4 (ou remplie d'eau) de 50 nm de diamètre, selon le processus qui les a mis en mouvement ou les interactions qu'ils ont subis (diffusion). La NP est irradiée à différentes énergies (6, 7.12, 8, 10, 30, 51 et 80 keV) et les spectres des particules secondaires sont mesurés à différentes distances radiales (50 nm, juste en surface, puis 325 nm, 700 nm, 5 µm, 30 µm). Le faisceau est ponctuel et traverse la NP en son centre.*

Cependant, il est intéressant de remarquer que, dans le cas de l'irradiation d'une NP d'"eau", très peu d'électrons parviennent à atteindre une distance de 5 µm. A l'inverse, à 30 keV, il reste encore plus de 70% de photoélectrons de la couche K du fer et de l'oxygène. Pour une énergie d'irradiation de 80 keV, plus de 80% des photoélectrons de la couche K du fer et de l'oxygène sont encore présents à 30 µm de la NP, bien qu'ils soient peu nombreux dès le départ.

En résumé, ces simulations suggèrent que les électrons de relaxation déposent leur énergie localement, à plusieurs centaines de nm de la NP. Le "rayon d'action" des photoélectrons dépend de l'énergie d'irradiation. Pour une énergie d'irradiation de 80 keV, la plupart des photoélectrons seront transportés sur plusieurs dizaines de µm (donc potentiellement plusieurs cellules), ce qui

rendrait possible l'approche Cheval de Troie à ces énergies. Aux énergies d'irradiations proches du K-edge du fer, la plupart de l'énergie serait déposée dans la cellule, dans un périmètre inférieur à 5 µm. Cependant, ces données prennent seulement en compte les particules traversant la surface considérée pour le *PSF*. **Les interactions internes aux volumes, comme par exemple les interactions photons-électrons générant des électrons de très basse énergie contribuant à un dépôt local de dose, n'apparaissent pas puisque ces électrons sont très rapidement absorbés et ne traversent pas la surface "détecteur". La section suivante tente de faire apparaître cette composante.**

En comparaison avec l'iode ou le gadolinium, le fer a l'intérêt d'avoir une probabilité de relaxation non radiative bien plus grande (65% pour le fer, contre 12% pour l'iode et moins de 10% pour le Gd, voir Fig. 11.11). Dans ses travaux, Corde *et al.* suggèrent que les électrons Auger sont responsables de l'effet de "photoactivation" de l'IUdR [Cord 04]. L'IUdR étant directement fixé à l'ADN, ce cas n'est donc pas directement comparable aux NPs cytoplasmiques (comme, *a priori*, les NPs Fe de ces travaux). Cependant, si les électrons Auger sont bien responsables d'une partie importante de l'effet d'augmentation de mort cellulaire, l'utilisation du fer devient avantageuse par rapport à l'iode ou au Gd.

4.4 Rayons d'action des électrons secondaires : l'outil *Tracks*

Dans cette étude de simulations, la géométrie utilisée est celle d'une nanoparticule cylindrique de 50 nm de diamètre, contenant soit de l'eau, soit un mélange homogène d'eau et de fer à 100 mg/mL (dans l'objectif de diminuer le nombre d'interactions, pour pouvoir par la suite exploiter les résultats).

4.4.1 Cartes 2D des trajectoires des électrons

La figure 4.7 représente le **"parcours" des électrons** selon l'énergie d'irradiation à l'échelle de plusieurs cellules (100 µm). Chaque point représente un endroit où l'électron a subi une interaction, et l'énergie avec laquelle il ressort de cette interaction. Nous pouvons remarquer qu'à 6 keV, la même tendance est observée à cette échelle que la nanoparticule soit remplie d'eau ou d'oxyde de fer. Les électrons sont mis en mouvement au niveau du faisceau de photons au centre de la nanoparticule. N'ayant qu'une faible énergie (6 keV au maximum), les électrons qui résultent de ces interactions parcourent moins de 700 nm (fig. 4.8).

En plus de ces interactions regroupées autour de la "nanoparticule" (d'eau ou de fer), nous pouvons observer des **point épars**. Ils représentent des cas d'électrons de faible énergie, mis en mouvement en dehors de la nanoparticule et presque aussitôt absorbés par le milieu : ils corrèlent avec la position d'un photon (données non montrées). Avec cette stratégie, il est difficile de dire par quel moyen l'électron a été mis en mouvement. Il peut s'agir par exemple d'un photon Compton interagissant à nouveau avec l'effet Compton. Dès que l'énergie d'irradiation dépasse le K-edge du fer, ces points épars sont plus nombreux pour le fer, suggérant le fait que les photons de fluorescence interagissent aussi à cette échelle, probablement par effet Compton.

A l'énergie d'irradiation de **30 keV**, nous pouvons remarquer que la "tache" centrale représentant les traces des électrons s'est élargie par rapport aux énergies d'irradiation 6, 8 et 10 keV. Il s'agit probablement des photoélectrons, donc le parcours augmente avec l'énergie d'irradiation. Les électrons

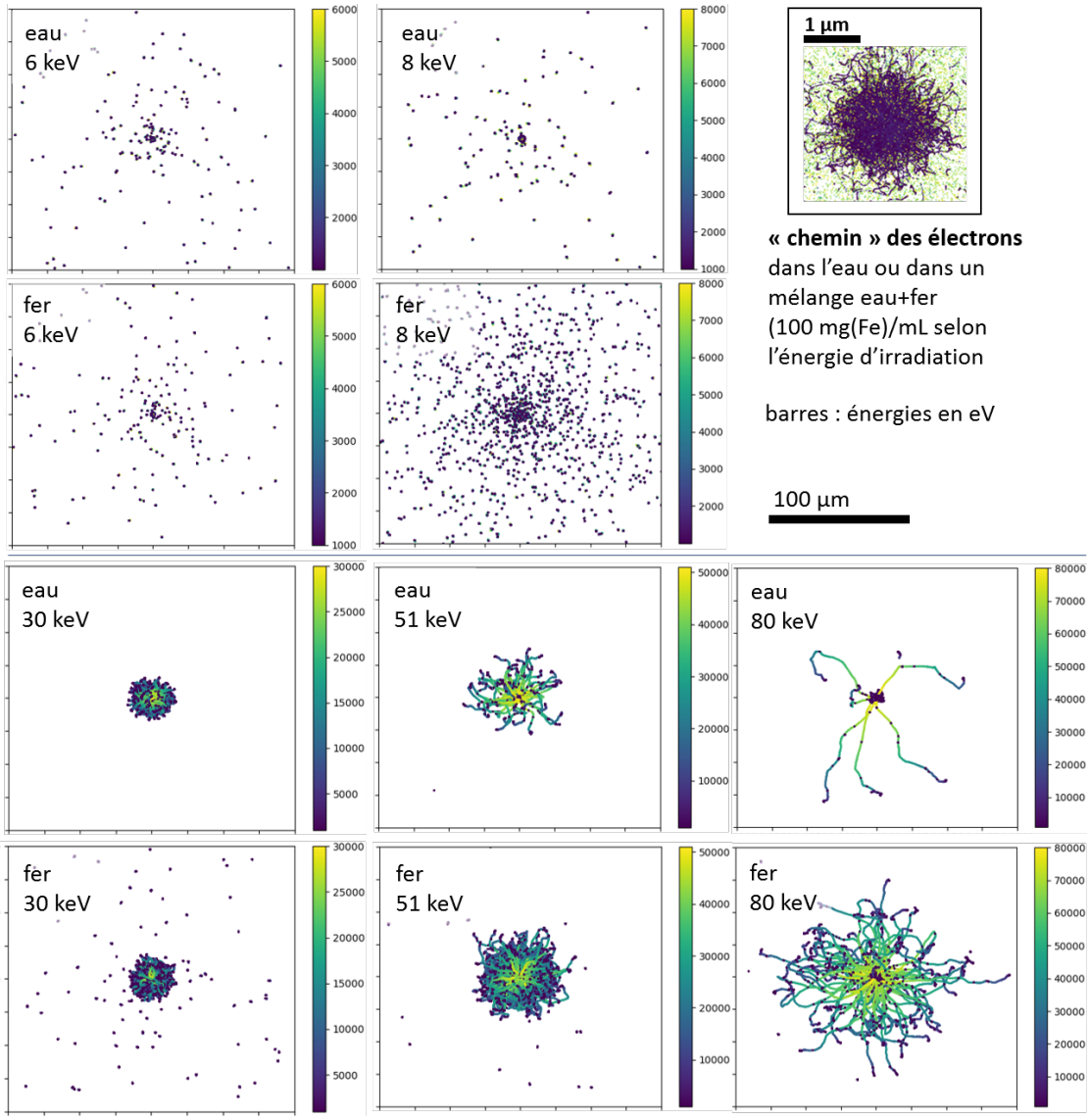


Figure 4.7 – *Parcours des électrons sur le plan normal à l'irradiation suite à l'irradiation d'une NP de 50 nm de diamètre remplie d'eau ou de fer à 100 mg/mL. Les énergies d'irradiation sont 6, 8, 30, 51 et 80 keV. L'échelle de couleur représente l'énergie des électrons en eV. En médaillon en haut à droite : électrons de plus faible énergie, probablement les électrons de relaxation.*

de relaxation, dont les électrons Auger, sont bien moins énergétiques comme nous l'avons vu dans la section précédente (4.3.1). Il est possible de retrouver leurs traces si l'on change l'échelle d'observation (voir le médaillon Fig. 4.7).

A 30 keV, il est encore possible d'observer des électrons mis en mouvement en dehors de la nanoparticule. Ce phénomène est bien plus rare à 51 et 80 keV et n'est pas observable avec l'eau à ces énergies d'irradiation. Ces différents éléments suggèrent que ce sont bien les photons de relaxation du fer qui mettent ces électrons en mouvement. Plus l'énergie d'irradiation augmente, moins l'interaction photoélectrique est probable, donc moins de photons de fluorescence sont émis. De plus, plus l'énergie d'irradiation augmente, plus l'énergie des photons Compton augmente, et plus ils sont susceptibles de parcourir une distance importante avant d'interagir avec la matière.

Ainsi, les “points” épars observés à 6 keV avec l’eau ne sont pas retrouvé à 30 ou 80 keV à cette échelle.

Enfin, nous pouvons remarquer que plus l’énergie d’irradiation augmente, plus le parcours des électrons résultant des interactions de la zone irradiée augmente. Ce parcours semble similaire pour l’eau et pour le fer. D’autre part, plus l’énergie d’irradiation augmente et moins ces électrons sont nombreux. La présence d’une NP d’oxyde de fer permet de densifier cette distribution.

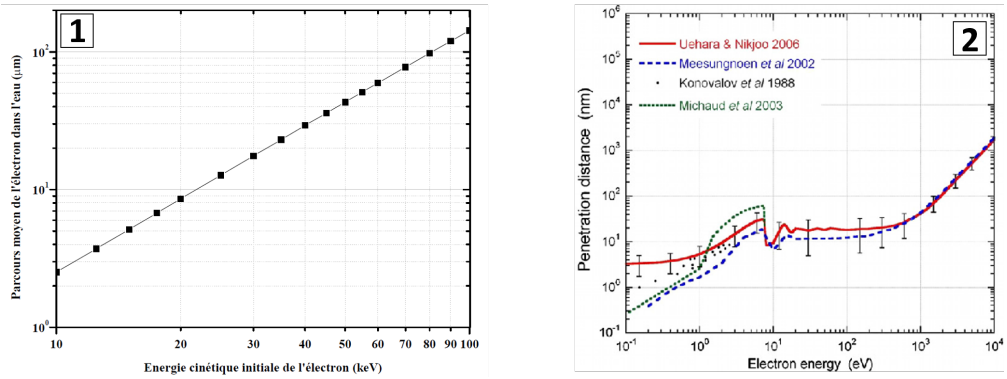


Figure 4.8 – *(1) Parcours moyen d’un électron dans l’eau (en µm) pour des énergies cinétiques initiales comprises entre 10 et 100 keV. Données provenant du NIST. (2) Parcours moyen d’un électron dans l’eau pour des énergies cinétiques comprises entre 0.1 eV et 10 keV [Nikj 10].*

4.4.2 Parcours théoriques des électrons : combinaison avec données PSF

Le libre parcours moyen d’un électron dans l’eau en fonction de son énergie est indiqué dans la figure 4.8. Selon leur origine -et selon l’énergie des photons incidents-, les électrons auront donc un parcours moyen différent.

- L’énergie cédée par les photons aux **électrons Compton** dépend de l’énergie du photon incident. Ce n’est qu’à partir d’une énergie d’irradiation de 1.5 MeV que la moitié ou plus de l’énergie du photon incident est attribuée à l’électron Compton. Pour une irradiation de 80 keV, la majorité des électrons Compton produits ont une énergie inférieure à 20 keV. Ils vont donc déposer leur énergie dans un volume de 9 µm de rayon centré autour de la NP.
- L’énergie du **photoélectron** dépend de l’élément et de l’énergie du photon incident. Si l’énergie d’irradiation est proche de l’énergie de liaison de l’électron, celui-ci ne sera peu ou pas transporté. Cependant, dès que l’énergie d’irradiation devient suffisamment grande devant l’énergie de liaison, les photoélectrons peuvent parcourir plusieurs microns. Par exemple, le photoélectron K du fer parcourt environ 10 µm et plus de 80 µm pour des énergies d’irradiation respectives de 30 keV et 80 keV.
- L’énergie des **électrons de relaxation** Auger, Coster-Krönig et super Coster-Krönig ne dépend que de la nature de l’atome considéré. Ce sont des énergies relativement faibles en comparaison aux énergies des photoélectrons lors d’une irradiation de 30 keV. Selon les énergies obtenues dans la section précédente (4.3.1), nous pouvons déduire que ces électrons de relaxation contribuent à l’augmentation de dose très locale autour de la nanoparticule, ne pouvant parcourir plus de 800 nm environ.

4.4.3 Portée des interactions

Les mêmes données ont été utilisées de manière à calculer la distance par rapport à l'axe d'irradiation de chaque interaction. Cette distance est simplement calculée sous la forme $\sqrt{\Delta_X^2 - \Delta_Y^2}$, avec Δ_X et Δ_Y la différence des coordonnées obtenues dans le fichier de sortie *electron.trk* (voir 4.1.3.3). Comme les électrons interagissent de plus en plus lorsqu'ils perdent de l'énergie, il est possible d'observer la limite à partir de laquelle les électrons n'interagissent plus -et donc, sont absorbés. Par exemple, un électron dont le parcours s'achève à 5 µm va interagir à de nombreux endroits, et ce, de plus en plus fréquemment lorsqu'il perdra son énergie.

Les figures 4.9 et 4.10 représentent, pour chaque distance radiale, le nombre d'interactions subies par les électrons. Ces deux figures sont identiques mais représentent les courbes sur deux échelles différentes : l'une, sous 10 µ, illustrant les interactions à l'échelle d'une cellule, et l'autre s'étalant jusqu'à 100 µ, illustrant les interactions à l'échelle de plusieurs cellules. Comme expliqué précédemment, ces figures ne sont pas une représentation du dépôt de dose, mais bien de nombre d'interactions pour chaque distance radiale.

A l'échelle "cellulaire" ($<$ 10 µm), aucune gain ne semble obtenu avec la présence d'une NP de fer à 6 keV (fig. 4.9). Pour une énergie d'irradiation de 6 keV, un premier front d'électrons s'arrête à 2 µm : en reliant ces données aux résultats des sections précédentes (4.3.1 et 4.3.2), nous pouvons supposer que ce front est majoritairement causé par les photoélectrons des couches "externes" ainsi que des couches L du fer et K de l'oxygène. A 8 keV, juste au-dessus du K-edge du fer, ce front est décalé dans le cas où la NP contient du fer. En effet, si les électrons issus des interactions avec les photons X dans l'eau restent globalement de même énergie, les mécanismes d'interaction avec le fer sont différents. Les photoélectrons de la couche K n'ont pas assez d'énergie pour être transportés, et les électrons de relaxation qui s'ajoutent ont un parcours plus faible que les photoélectrons arrachés des couches externes dans le cas de la NP d'"eau". Sur les plus grandes distances, nous pouvons observer, bien que cela soit encore dans le "bruit", une différence entre le fer et l'eau : cette différence pourrait être attribuée aux photons mettant en mouvement des électrons de basse énergie.

A 30 keV et aux énergies supérieures, le "front" d'électrons résultant des interactions des rayons X avec l'eau se tasse jusqu'à disparaître peu à peu. De même, le gain obtenu avec le fer se tasse et se fond dans la courbe des interactions relatives à une NPs pleine d'eau quand l'énergie augmente. Nous pouvons relier ces observations à plusieurs phénomènes : les électrons de relaxation du fer sont moins nombreux (effet photoélectrique moins probable), les photoélectrons sont bien plus énergétiques et déposent peu de dose à cette échelle, et les électrons Compton deviennent de plus en plus nombreux (les électrons Compton représentent 94% des électrons sortant d'une NP d'"eau" à 80 keV).

A l'échelle de plusieurs cellules (100 µm), nous n'observons pas de différence entre le nombre d'interactions subies par des électrons sortant d'une NP contenant du fer ou d'une NP pleine d'eau, que ce soit sous ou juste au-dessus du K-edge (fig. 4.10). A 8 keV, nous pouvons toutefois observer un "gain" avec le fer sur les plus longues distances, probablement causé par des photons mettant des électrons faiblement énergétiques en mouvement. Cependant, cette mesure manque de statistique et il serait risqué d'en tirer des conclusions. A 30 keV et aux énergies d'irradiation supérieures, un "front" se tasse et s'étale. Il s'arrête à 20 µm à 30 keV pour arriver à 80 µm à 80 keV. Nous suggérons que ce front soit attribué aux photoélectrons : plus l'énergie d'irradiation augmente, plus les photoélectrons ont d'énergie et plus leur parcours sera long. A ces énergies, les simulations

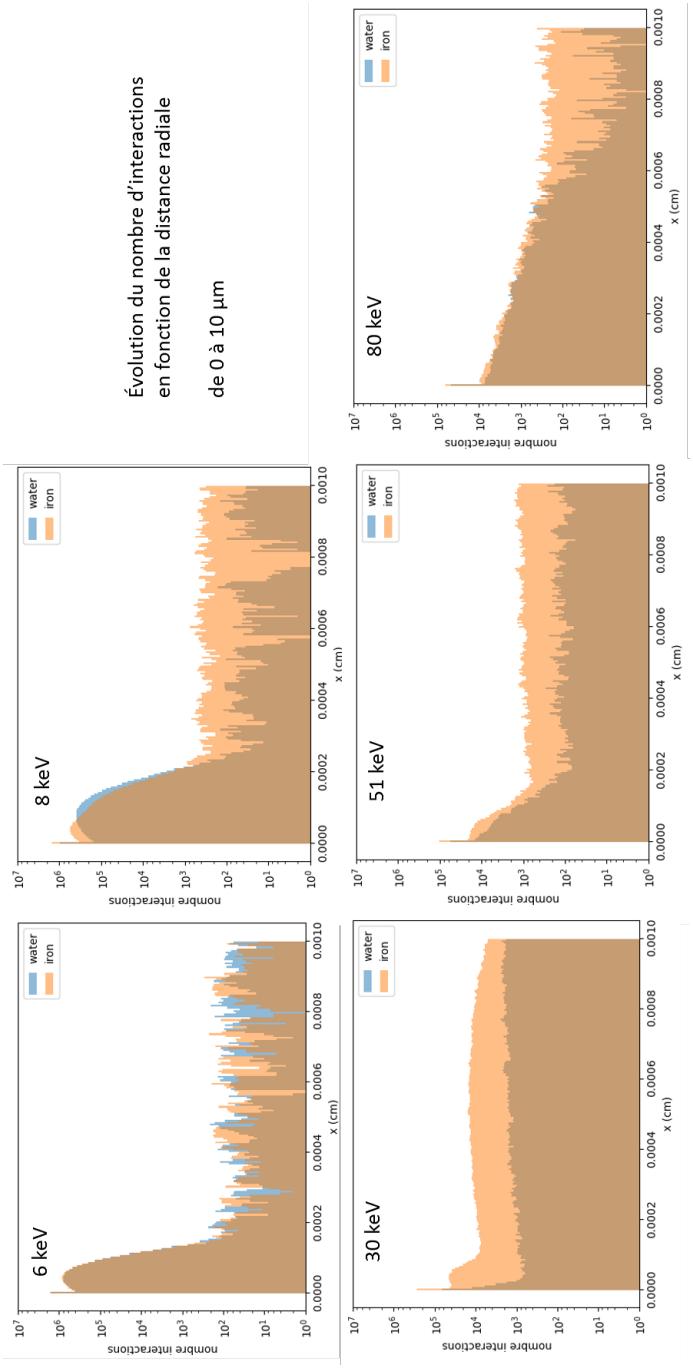


Figure 4.9 – *Nombre d'interactions subies par les électrons sortant d'une NP de 50 nm de diamètre remplie d'eau ou de 100 mg(Fe)/mL pour une distance radiale comprise entre 0 et 10 µm (échelle "intracellulaire"). La NP est irradiée à différentes énergies (6, 8, 30, 51 et 80 keV). Le faisceau est ponctuel et traverse la NP en son centre.*

montrent une augmentation du nombre d'interactions grâce à la présence de la NP de fer sur le trajet du faisceau de photons incidents.

En résumé : les électrons de relaxation (dont les électrons Auger) semblent responsables du dépôt de dose dans un **périmètre de 800 nm autour de la NP**. Dans ce même périmètre,

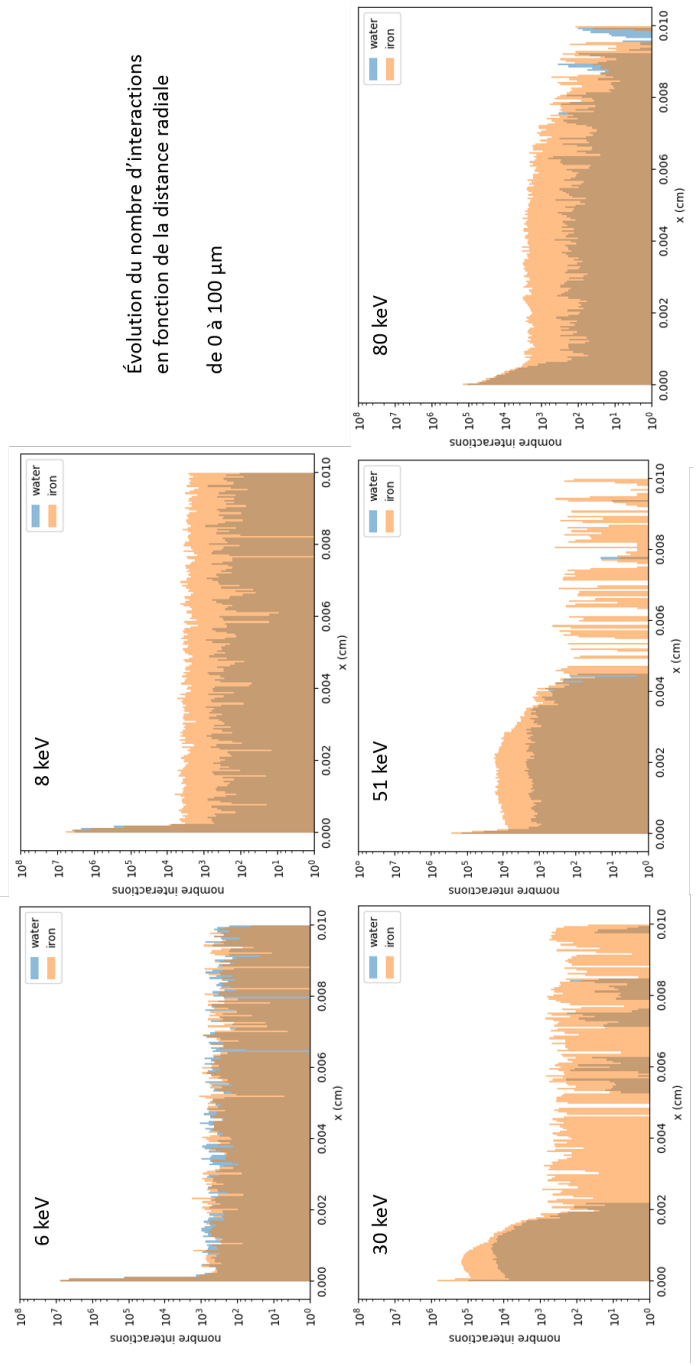


Figure 4.10 – *Nombre d'interactions subies par les électrons sortant d'une NP de 50 nm de diamètre remplie d'eau ou de 100 mg(Fe)/mL pour une distance radiale comprise entre 0 et 100 µm (à l'échelle de plusieurs cellules). La NP est irradiée à différentes énergies (6, 8, 30, 51 et 80 keV). Le faisceau est ponctuel et traverse la NP en son centre.*

les photoélectrons issus de la couche K de l'oxygène et L du fer semblent intervenir pour les plus petites énergies étudiées (6 et 8 keV). Les électrons Compton déposent aussi leur énergie à une échelle similaire, mais leur contribution apparaît surtout aux plus hautes énergies d'irradiation (51 et 80 keV). Le plus gros différentiel à cette échelle parmi les énergies d'irradiation étudiées semble être obtenu à 30 keV.

A des **échelles plus grandes**, l'effet semble n'être obtenu qu'à partir d'une certaine énergie d'irradiation (30 keV parmi les énergies étudiées), même si l'influence des photons de fluorescence du fer dans le cas d'une irradiation à 8 keV pourrait peut-être jouer un rôle. Plus l'énergie d'irradiation augmente et plus le rayon d'action des électrons est élevé. Ces interactions "éloignées" de la NP sont moins nombreuses à 80 keV qu'à 30 keV, mais il est difficile de conclure avec cette seule étude sur le différentiel obtenu par rapport à l'eau.

Ces ordres de grandeur font écho aux résultats de la littérature. Selon l'énergie d'irradiation, les mécanismes entrant en jeu seront différents (en fonction des lois de probabilité de chaque interaction), tout comme les modes de dépôt d'énergie qui en découlent. La plupart des auteurs affirment que le parcours des électrons secondaires est très limité, de quelques dizaines de nm à quelques µm. Par exemple, Chattopadhyay *et al.* ont utilisé un faisceau de 100 kVp et des nanoparticules d'or, et ont reporté que 99% les électrons Auger étaient stoppés avant 100 nm. Meesungnoen *et al.* concluent de leurs expériences que les photoélectrons d'énergie moyenne de 43 keV ont moins de 20 µm de portée [Reti 15]. Si l'on considère qu'une cellule mesure entre 10 et 20 µm, les effets létaux additionnels obtenus par la présence d'atomes lourds ne pourraient donc être obtenus que si les NPs sont à l'intérieur ou proches des zones vitales de la cellule. Les résultats présentés dans ce manuscrit semblent indiquer que les photoélectrons peuvent parcourir plusieurs dizaines de µm lors d'une irradiation à 80 keV. De plus, même lors d'une irradiation à 30 keV, il suffit d'après ces résultats que les NPs soient situées dans le cytoplasme pour causer des dommages à la cellules : l'incorporation de ces agents dans le noyau ou au sein de l'ADN ne semble pas nécessaire. Les éléments lourds pourraient aussi endommager les cellules s'ils sont localisés dans le milieu extracellulaire selon ces résultats.

4.5 Discussions autour des simulations

L'un des points faibles de cette étude réside dans le **nombre de photons incidents simulés**. Il serait intéressant de poursuivre ces simulations en se servant d'un *cluster* de manière à obtenir une meilleure statistique sur les résultats. De plus, dans l'objectif de réaliser une carte en 2D du dépôt de dose autour de la nanoparticule, il serait intéressant de pouvoir "favoriser" les interactions entre les photons et la matière. En effet, un photon d'une dizaine à une centaine de keV n'a qu'une probabilité de 10^{-3} à 10^{-6} d'interagir dans une cible telle que des cellules ou des NPs [Delo 13]. De fait, certaines méthodes permettent de diminuer le temps de calcul en favorisant les interactions étudiées pour lesquelles la probabilité d'occurence est très faible (ce qui s'applique en particulier aux interactions dans les très petits objets).

L'outil IFORCE disponible dans PENELOPE est une méthode de réduction de la variance permettant de favoriser une interaction donnée. Les particules secondaires qui en résultent sont pondérées de manière à ne pas perturber le résultat final, bien que les auteurs conseillent de vérifier que les doses obtenues ne s'en retrouvent pas biaisées. La mise en place de cet outil n'a pas permis de réaliser de carte 2D du dépôt de dose au cours de ces travaux de thèse. Il s'agirait par la suite d'une information intéressante à étudier au cours de futures simulations.

D'autre part, le **dépôt de dose radial** provoqué par l'irradiation d'une NP Fe d'eau ou de fer a été tracé en utilisant la dose déposée dans chacun des cylindres "en couches d'oignons" de la géométrie de la section 4.1.3.2. L'obtention de ce type de données est d'ailleurs ce qui a initialement motivé l'utilisation du code Monte-Carlo PENELOPE. Cependant, ce genre d'étude se heurte à plusieurs difficultés.

1. Tout d'abord, peu d'électrons émis parviennent à atteindre les volumes les plus éloignés. Dans ces simulations, les volumes extérieurs ne n'absorbent parfois aucune énergie, surtout dans le cas de la NP d'eau car les interactions sont rares et le nombre de photons incidents simulés est insuffisant. Le DEF n'est donc pas toujours calculable.
2. D'autre part, le fichier *penmain-res.dat* indique le dépôt d'énergie dans chaque volume. Il faut donc normaliser par la masse de ce volume pour obtenir une dose. Si l'on utilise un modèle dans lequel les "couches d'oignon" ont la même épaisseur, le volume des couches extérieures sera plus grand que celui des couches intérieures. Un dépôt local d'énergie dans les couches extérieures sera donc associé à une dose plus faible que ce même dépôt d'énergie dans les couches les plus proches de la NP, alors que les conséquences biologiques de ce dépôt d'énergie seront similaires.
3. Enfin, ce dépôt de dose radial moyen n'indique pas si l'énergie a été déposée en grappes ou de manière homogène dans tout le volume. Or, les réponses biologiques dans les deux cas peuvent être très différentes. Si toute l'énergie a été déposée au même endroit, les dommages engendrés peuvent être plus létaux qu'un dépôt diffus de l'énergie (par exemple, dans le cas des lésions à l'ADN).

4.6 Le Chapitre 4 en quelques mots

Les simulations présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec le code Monte-Carlo PENELOPE 2014. Cette étude avait pour premier objectif de caractériser la dépendance de l'effet d'augmentation de dose par éléments lourds à l'énergie d'irradiation et à la concentration de l'élément dans le milieu. Pour cela, le DEF macroscopique a été calculé pour plusieurs conditions. Le **DEF** quantifie l'augmentation de la dose provoquée par la présence d'atomes lourds par rapport au milieu sans atomes lourds. Un DEF de 2 indique que les atomes lourds permettent de multiplier la dose par 2 dans le volume considéré.

Les simulations macroscopiques montrent que la présence de fer homogène dans le milieu contribue à l'augmentation de la dose. Bien que le fer ne soit pas *a priori* le candidat idéal (Z_{Fe} =26, contre Z_{Gd}=64 et Z_I= 53), il est possible d'obtenir des DEF macroscopiques du même ordre de grandeur (environ 1.4) que ceux obtenus pour le Gd ou pour l'iode si les concentrations en fer sont suffisamment élevées (10 mg/mL pour le fer, contre 2.5 mg(Gd)/mL et 2 mg(I)/mL). De plus, le DEF dépend de l'énergie d'irradiation : l'énergie optimale se situerait entre 30 et 45 keV pour le fer. Enfin, plus la concentration de l'élément dans le milieu augmente et plus le DEF est important (DEF de 4.5 à 40 keV pour 100 mg(Fe)/mL). Ces simulations sont toutefois à prendre avec prudence : le DEF macroscopique ne prend pas en compte le regroupement des atomes de fer sous forme de NP.

D'autre part, les simulations ont permis d'étudier le spectre des photons et des électrons " émis" par une NP irradiée ainsi que le parcours de ces particules dans l'eau environnante. Les résultats suivants ont été observés :

- L'énergie des **photoélectrons** dépend de l'énergie d'irradiation.
  - Juste au-dessus du K-edge du fer (7.11 keV), les photoélectrons K du fer ne participent pas à l'augmentation de la dose dans la cellule car ils n'ont pas suffisamment d'énergie pour sortir de la NP.
  - A une énergie d'irradiation supérieure à 30 keV, l'interaction photoélectrique de-

vient moins probable mais les photoélectrons acquièrent une énergie cinétique plus importante et peuvent être transportés sur plusieurs µm.
  - A une énergie d'irradiation de 80 keV, les simulations suggèrent que plus de 80% des photoélectrons issus de la couche K du fer et de l'oxygène sont encore présents à 30 µm de la NP et peuvent atteindre 80 µm : ils peuvent donc endommager les cellules voisines.
- L'énergie des **électrons de relaxation** (dont les électrons Auger) est spécifique de l'atome. La relaxation de l'atome de fer libère des électrons entre 5 et 7 keV environ. Les simulations suggèrent que ces électrons déposent principalement leur énergie entre 300 et 700 nm autour de la NP. A 300 nm de la NP, 80% des électrons Auger sont encore présents, mais moins de 20% des électrons Auger sont transportés au-delà de 675 nm de la NP.
- L'énergie des **électrons Compton** dépend de l'énergie d'irradiation. A 80 keV, la majorité des électrons Compton a une énergie inférieure à 20 keV : ils contribuent à l'augmentation du dépôt de dose dans un volume de 9 µm de rayon autour de la NP.

Chapitre 5

Caractérisation des NPs Fe_3O_4 coréennes

Sommaire

5.1 Matériels et méthodes 124
5.1.1 Matériels 124
5.1.2 Méthodes 125
5.2 Résultats : taille des nanoparticules 125
5.2.1 Discussion : taille des NPs, sonication et reproductibilité 129
5.3 Concentration de la solution mère de NPs Fe 132
5.3.1 Mesure de la concentration par ICP-MS 132
5.3.2 Discussion : concentration de la solution mère de NPs Fe 133
5.4 Discussion : autres caractéristiques des NPs Fe coréennes 133
5.5 Adaptation des protocoles : "correspondance volume/surface" 134
5.6 Le chapitre 5 en quelques mots 135

Objectifs de la caractérisation des NPs

Le contrôle de la taille des NPs est un facteur essentiel autant pour les travaux *in vitro* ou *in vivo*. En effet, une variation de la taille des NPs peut par exemple changer la capacité de ces NPs à passer à travers la BHE, ou encore promouvoir un autre type d'interaction entre les NPs et les cellules. La caractérisation de la taille des NPs et la connaissance de l'évolution de cette taille en fonction du temps est donc nécessaire pour l'obtention de résultats reproductibles. Les expériences en biologie subissent déjà de nombreux *aléas* dus à l'étude du vivant (cellules ou animaux) ; un mauvais contrôle des NPs ajoute encore des incertitudes au protocole. Assurer une caractérisation rigoureuse des NPs permet donc d'exploiter des résultats comparables entre eux, et peut ainsi permettre une meilleure compréhension des phénomènes physiques et biologiques étudiés. On s'affranchirait ainsi du questionnement malheureusement trop commun : *cette différence observée est-elle due à un phénomène biologique additionnel, ou mes NPs ont-elles évolué depuis la dernière expérience ?*.

Ce chapitre présente la caractérisation des les NPs Fe utilisées dans ces travaux de thèse. Tout d'abord, leur taille a été mesurée et la sonication a été étudiée comme solution pour contrôler la taille des NPs malgré leur propension à s'agglomérer. D'autre part, la concentration de la solution mère a été mesurée afin de s'assurer de l'exactitude des conditions d'exposition aux cellules.

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Matériels

Les NPs FerInject sont des nanoparticules d'oxyde de fer Fe_2O3 utilisées pour le traitement de l'anémie. Ayant une autorisation de mise sur le marché, la production de ces dernières est très contrôlée et la taille de ces NPs est *a priori* peu variable entre les différents lots. Elles mesurent 23 nm de diamètre (taille hydrodynamique mesurée par DLS, indice de polydispersité de 0.07) [Jahn 11]. Nous n'avons pas observé de variations dans la solution de NPs FerInject entre les différents lots utilisés lors des expériences. Nous avons donc réalisé nos expériences sans effectuer d'autre contrôle plus précis de la taille de ces NPs, comptant sur la fiabilité d'un médicament autorisé à la vente -ce qui, bien sûr, peut être sujet à discussion. Ces nanoparticules sont décrites plus en détail dans la section A.1.1.

Nous avons aussi utilisé au cours de ces travaux des **NPs d'oxyde de fer Fe_3O4**, qui nous sont gracieusement offertes dans ce cadre d'une collaboration avec l'équipe coréenne de J.K. Kim [Choi 12a]. L'équipe de J.K. Kim étudie le potentiel de ces NPs pour renforcer le dépôt de dose dans la tumeur lors de la radiothérapie (par rayons X) [Choi 12a], et plus récemment lors de l'hadronthérapie [Kim 10a]. Au contraire des NPs FerInject, les NPs de l'équipe coréenne n'ont pas d'autorisation de mise sur le marché. Elles sont synthétisées au sein de l'équipe collaboratrice et ont, selon leurs conseils, une stabilité de trois mois environ. Au cours des expériences, il s'est avéré que ces NPs avaient une forte tendance à s'agglomérer puis à s'accumuler au fond du tube dans lequel elles sont conservées. Il s'est donc posé la question de la reproductibilité des résultats et de l'évolution dans le temps des caractéristiques des NPs Fe utilisées. Ces travaux présentent donc une tentative de caractérisation de ces NPs Fe. Ces nanoparticules sont décrites plus en détail dans la section A.1.2.

5.1.2 Méthodes

Comprendre le fonctionnement d'une méthode de mesure et connaître ses limites permet d'avoir un peu plus de recul sur les résultats. Dans cette section, les méthodes seront simplement nommées. Toutefois, s'il est en effet superflu de connaître le principe de fonctionnement d'un microscope pour mesurer les dimensions d'un objet, ceci se révèle par contre utile si l'on souhaite comprendre comment "appréhender" la valeur mesurée. Une description plus détaillée des méthodes, de leur fonctionnement, de leurs limites ainsi que du protocole utilisé se trouve en annexe dans le chapitre B.

Deux stratégies ont été employées pour **mesurer la taille des NPs Fe** : la microscopie électronique à transmission (TEM, *Transmission Electron Microscopy*), et la diffusion dynamique de la lumière (DLS, de l'anglais *Dynamic Light Scattering*). Ces deux stratégies ne donnent pas exactement le même type d'information. La TEM renseigne sur la taille du coeur métallique de la NP, tandis que la DLS donne la taille globale des amas de NPs en solution, comprenant le coeur métallique, le *coating* et la couronne de protéines adsorbées qui l'entoure. Les NPs ont été imagées par TEM à l'Institut Albert Bonniot (IAB, Grenoble) après avoir été fixées sur des grilles spécifiques (voir B.1.1). Les mesures par DLS ont été réalisées au CEA de Grenoble à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, voir refsec :DLS).

D'autre part, la **concentration des NPs Fe** a été mesurée par deux méthodes différentes : il est possible de mesurer la concentration d'un élément dans un échantillon en analysant les images obtenues par tomographie X synchrotron. Cette stratégie est détaillée en annexe dans la section B.1.3. Elle repose sur l'utilisation d'un système d'équations reliant entre eux les divers coefficients d'atténuation massique des éléments présents dans le milieu et leurs volumes respectifs. Par ailleurs, l'ICP-MS (Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif) permet d'obtenir une mesure absolue de la concentration d'un élément dans un échantillon : l'échantillon est minéralisé, ionisé par une torche à plasma et les différents ions sont séparés et détectés selon leur nature grâce à un spectromètre de masse.

Enfin, le **protocole de sonication** habituellement utilisé consiste à soniquer les NPs pendant 15 min à 600 W la veille de leur emploi. Pendant toute la durée de la sonication, les NPs sont refroidies à 4°C par un système de circulation d'eau réfrigérée. Le protocole est détaillé plus précisément en annexe.

5.2 Résultats : taille des nanoparticules

5.2.0.1 Mesure de la taille par TEM

Nous avons effectué une mesure en microscopie électronique de trois échantillons plus ou moins dilués dans l'eau des NPs Fe coréennes. Les échantillons ont été préparés selon les conseils de Marie Carrière (CEA Grenoble). L'imagerie a eu lieu au GIN (Grenoble) au sein de l'équipe de Karine Pernet-Gallay.

La figure 5.1 (B) est une image représentative de celles obtenues lors de l'observation TEM des NPs Fe de l'équipe coréenne. On observe que les NPs Fe individuelles sont plutôt de forme sphérique et que leur coeur métallique mesure entre 10 et 15 nm de diamètre.

D'autre part, dans le but de connaître la taille des agrégats, les NPs Fe ont été très diluées lors

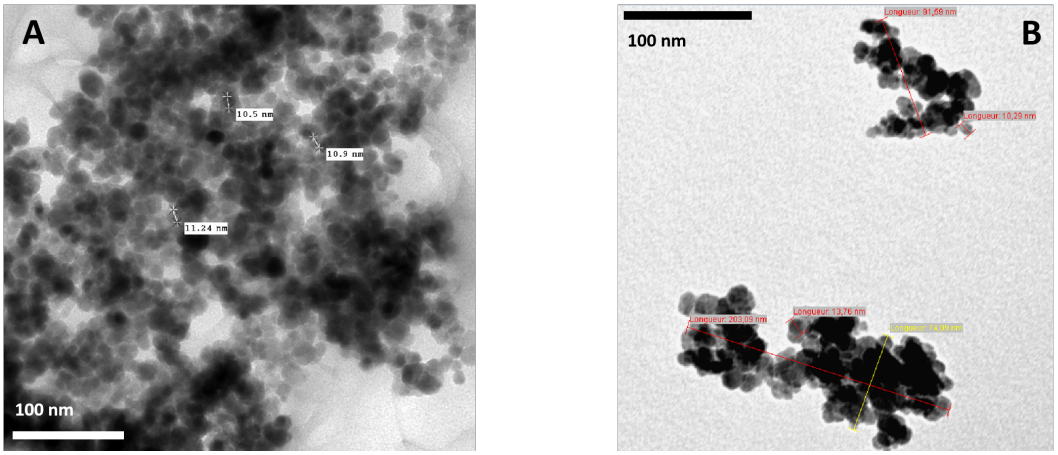


Figure 5.1 – *Observations TEM des NPs Fe de l'équipe coréenne (A) tirée d'une de leurs publications [Kim 10b] et (B) réalisée lors de ces travaux de thèse.*

de la réalisation de l'échantillon de manière à bien séparer les amas potentiels. Selon les images, on peut remarquer une tendance des NPs à s'agglomérer en formant des amas d'une cinquantaine de nanomètres allant jusqu'à plusieurs centaines de nm, comme l'illustre l'image présentée.

5.2.0.2 Mesure par DLS et influence de la sonication

Comme expliqué dans la section B.1.2, la DLS donne une mesure de la taille des NPs en solution grâce aux variations de la figure de diffraction formée par le passage d'un rayon laser dans l'échantillon. Elle indique de fait la taille hydrodynamique de la NP, c'est-à-dire la taille de l'ensemble du coeur métallique, du *coating* qui l'enrobe ainsi que des éventuelles protéines fixées à sa surface. La taille hydrodynamique est donc supérieure au diamètre du coeur métallique de la nanoparticule. Les mesures DLS ont été réalisées au CEA grâce aux précieux conseils de Marie Dorier et à la formation à l'utilisation de la machine par Olivier Renard et Pierrick Lambert.

Les mesures DLS ont été réalisées avec les NPs Fe juste vortexées de façon à ré-homogénéiser la solution mère avant l'expérience. De plus, l'agglomération des NPs Fe limite la reproductibilité des résultats. Il a donc été envisagé de **soniquer les NPs** de façon à briser les agrégats et à conserver une taille constante de NPs Fe entre les différentes expériences. Ces résultats présentent aussi la conséquence de la sonication sur la taille des NPs Fe. Le procotole et les caractéristiques d'utilisation du bain à ultrasons sont indiqués dans la section B.1.4.

D'autre part, observant les NPs Fe dans le **milieu de culture cellulaire**, il apparaît que celles-ci sédimentent en quasi-totalité, ce qui n'est pas le cas des NPs Fe de la solution mère, diluées dans l'eau, qui restent en suspension pendant la durée de stabilité de la solution. Il est possible que le milieu de culture amplifie le phénomène d'agglomération des NPs Fe : des protéines du milieu complet peuvent se fixer à la surface des particules, augmentant leur diamètre hydrodynamique et la probabilité de former des amas. Une série de mesures a donc été entreprise afin de mesurer la taille des agglomérats dans le milieu de culture et de tester l'influence de la sonication sur leur diamètre.

Résultats : taille des NPs Fe diluées dans l'eau

Les figures 5.2 (A, B, C, D) montrent l'évolution de la taille des NPs Fe en fonction du protocole

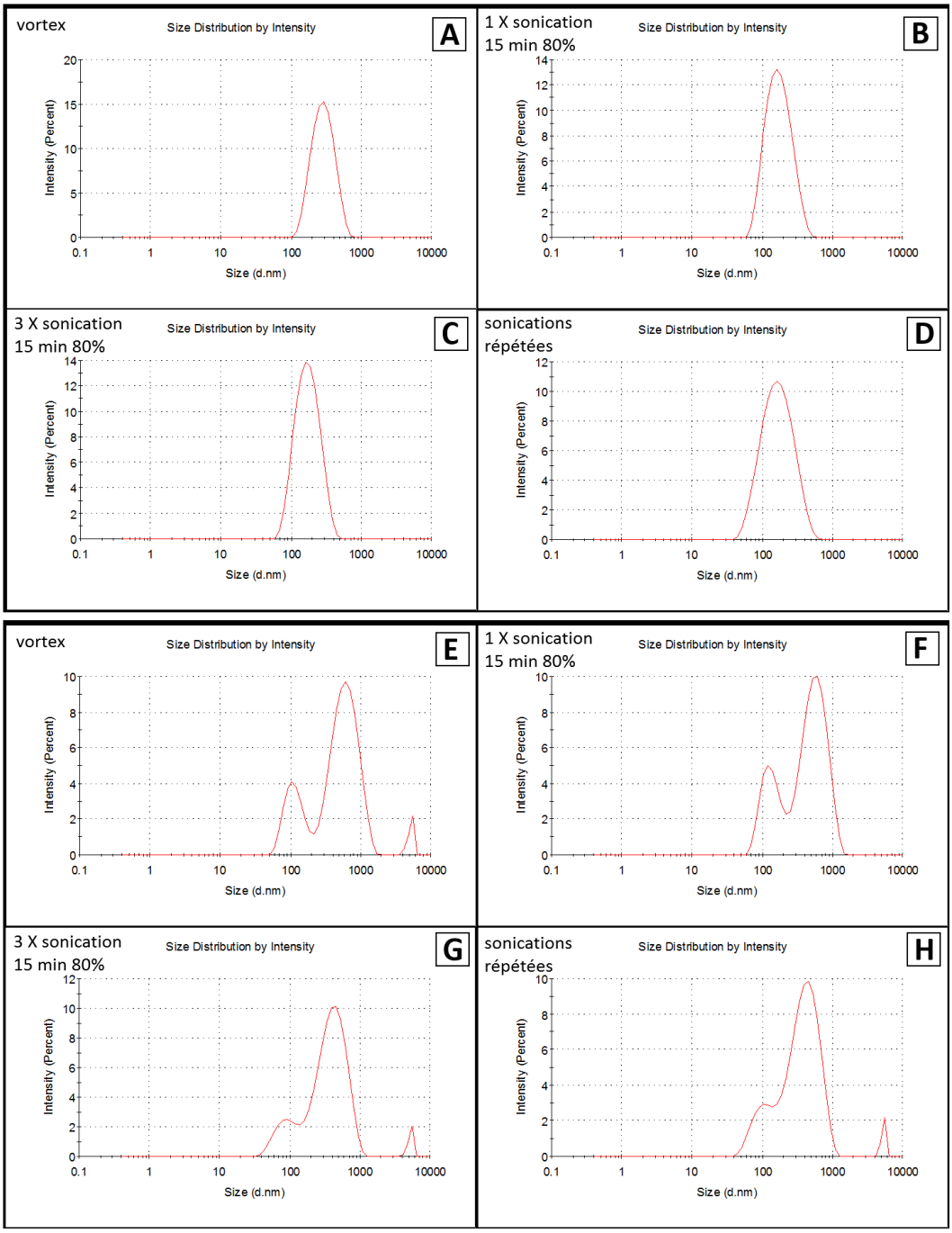


Figure 5.2 – *Distribution des diamètres (en intensité) des NPs mesurée par DLS pour des échantillons de NPs Fe coréennes, diluées dans l'eau (A, B, C, D) ou dans du milieu complet de culture cellulaire (E, F, G, H). Quatre conditions de sonications ont été testées : vortex pour homogénéiser, sans sonication (A et E), une sonication la veille de 15 min à 80% (B et F), trois sonications la veille de 15 min à 80% (C et G), et une sonication la veille 15 min à 80% après quatre sonications identiques réparties la semaine précédente (H et F).*

de sonication auquel elles sont soumises. Quatre protocoles ont été testés :

- Les NPs sont juste vortexées.
- Les NPs sont soniquées la veille pendant 15 minutes à 80%.

- Les NPs sont soniquées la veille pendant 15 minutes à 80%. Cette opération est encore répétée deux fois avec cinq minutes d'attente entre chaque étape.
- Les NPs sont soniquées la veille pendant 15 minutes à 80%. Elles ont précédemment subi quatre sonications identiques réparties la semaine précédente.

D'après ces mesures, les NPs non soniquées et juste vortexées forment des amas de tailles très disparates de 303.1 ± 106.8 nm de diamètre. La sonication permet de décaler la distribution de taille vers des diamètres plus faibles (208.0 ± 97.3 nm de diamètre pour une sonication, 184.4 ± 71.1 nm de diamètre pour trois sonications identiques successives), en gardant toutefois les amas de plus grand diamètre. Plus la sonication est intense et plus la base de la courbe s'étire, montrant l'apparition de particules ou d'amas de diamètres inférieurs. Les histogrammes de la figure 5.3 (A) et (B) illustrent plus quantitativement cette observation : le Z-average et les valeurs des pics pondérés en intensité (la différence entre ces deux mesures est expliquée dans la section B.1.2) sont cohérents et semblent indiquer que la sonication permet de faire diminuer de moitié la taille moyenne des amas. En effet, le Z-average pour des NPs Fe juste vortexées est de 271.9 nm (indice de polydispersité : 0.219), tandis qu'il est de 151.2 nm (indice de polydispersité : 0.171) après trois sonications successives. D'autre part, les différents protocoles de sonication testés semblent agir d'une manière similaire sur la taille des NPs (208.0 ± 97.3 nm, 184.4 ± 71.1 nm ou 183.7 ± 94.1 nm pour les trois protocoles décrits, respectivement).

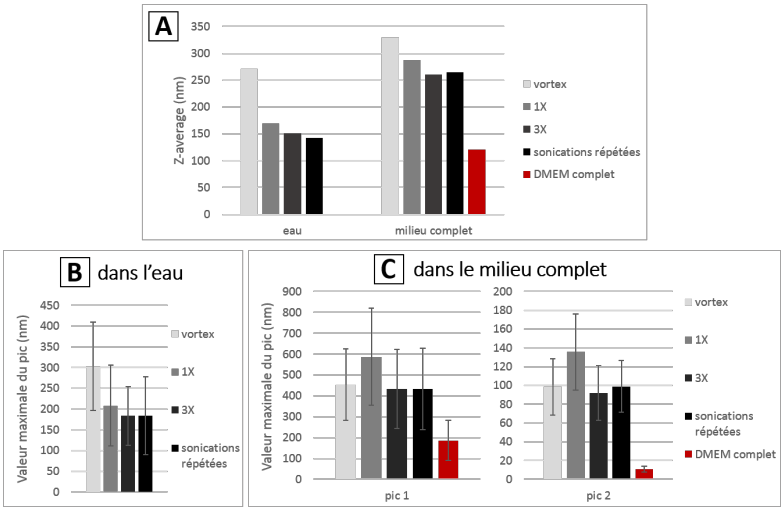


Figure 5.3 – *Mesure de la taille des NPs Fe de l'équipe coréenne par DLS suivant différents algorithmes : (A) Z-average dans l'eau ou dans le milieu complet avec ou sans sonication. Cette mesure ne donne pas de barre d'erreur mais la fiabilité de la mesure est décrite par l'indice de polydispersité. Les mesures sont déclarées fiables par l'algorithme pour les mesures de diamètre de NPs dans l'eau uniquement. (B) Valeur du pic de la distribution de taille pondérée en intensité des NPs Fe diluées dans de l'eau. Les barres d'erreur représentent l'écart type du diamètre en nm. (C) Valeur des deux premiers pics de la distribution de taille pondérée en intensité des NPs Fe diluées dans du milieu complet. Les barres d'erreur représentent l'écart type du diamètre en nm pour chaque pic.*

Résultats : taille des NPs diluées dans du milieu de culture complet

Les figures5.2 (E, F, G, H) montrent l'évolution de la taille de NPs Fe (soniquées ou non) une fois diluées dans du milieu de culture cellulaire complet. Les mesures de DLS sont bien plus erratiques et moins reproductibles que lors d'une mesure de taille des NPs Fe diluées dans l'eau. Les courbes des figures 5.2 (E, F, G, H) indiquent la présence de gros (environ 400 nm) voir même

de très gros objets (plusieurs µ de diamètre) ainsi que d'objets plus petits autour de la centaine de nm.

De plus, comme observé dans le cas de l'eau, la sonication préalable permet de faire apparaître des objets de plus petites tailles (Fig. 5.3 B). La distribution de taille des NPs juste vortexées est répartie selon trois pics : 454.0 ± 171.8 nm, 98.6 ± 29.9 nm et 5427 ± 288 nm. Les sonications répétées ne permettent pas de changer la position des pics, puisque les mesures indiquent les pics suivants : 433.3 ± 195.8 nm, 99.0 ± 27.52 nm et 5374 ± 326 nm. Cependant, la population de ces pics change avec les sonications : le deuxième pic représente 14.8% de l'intensité émise pour les NPs vortexées et 16.9% pour les NPs ayant subi les sonications répétées. Il est plus exact de parler de la population avec les analyses en volume et/ou en nombre (voir B.1.2) : le deuxième pic représente 8.1% du volume pour les NPs vortexées contre 16.4% pour les NPs ayant subi les sonications répétées. En effet, l'étude de la distribution pondérée en intensité induit un biais : les agglomérats les plus grands diffusent plus de lumière que les NPs individuelles, "écrasant" ainsi les données sur la distribution des plus petits amas.

L'étalement de la courbe vers les petits diamètres prend de l'ampleur, s'étend et se renforce au fur et à mesure des sonications. Si cette tendance est observée dans la mesure du Z-average (Fig. 5.3 A), où le diamètre moyen diminue grâce à l'utilisation de la sonication. Il passe de 329.8 nm (indice de polydispersité : 0.444) à 287.6 nm (indice de polydispersité : 0.522) puis 260.8 nm (indice de polydispersité : 0.645) pour les NPs vortexées, soniquées une fois et soniquées trois fois respectivement.

5.2.1 Discussion : taille des NPs, sonication et reproductibilité

5.2.1.1 Taille du coeur métallique, taille hydrodynamique : quelle mesure est pertinente dans notre contexte ?

Taille des NPs Fe mesurée par TEM

La figure 5.1 (A) représente une observation eb TEM des NPs Fe coréennes intégrée dans une de leurs publications [Kim 10b]. Ils remarquent que les NPs sont de forme sphérique et ont une taille approximative de 10.6 nm ± 0.78 nm. Cependant, il s'agit là d'une mesure du coeur métallique de la NP : la taille des NPs Fe après *coating* monte alors à 13 - 15 nm [Choi 12a, Seo 13]. Ces mesures sont en bon accord avec nos propres observations en TEM.

De plus, nous avons tenté d'obtenir une mesure de la taille des amas de NPs Fe par TEM. Cette mesure, bien qu'indicatrice d'une agglomération des NPs Fe, est à prendre avec prudence pour les raisons suivantes : (1) d'une part, les NPs ont une propension à s'agglomérer lors de la réalisation de l'échantillon. (2) D'autre part, ces échantillons sont conçus en déposant une goutte de solution de NPs sur une grille : les NPs Fe coulent et se déposent sur la grille où elles se fixent. Les plus gros agglomérats coulant plus vite que les petits, l'observation se retrouve alors faussée car la durée de dépôt des NPs avant le séchage de la grille peut donc influencer la taille des agglomérats observés. Si l'on veut observer les plus petits agglomérats ou les éventuelles NPs individuelles, il faudrait attendre plus longtemps que ces petits objets, coulant moins rapidement, se déposent sur la grille. Dans tous les cas, il semble délicat de conclure sur l'état de la population des NPs en solution simplement en mesurant la taille des les agglomérats observés par TEM.

Taille des NPs Fe diluées dans l'eau et mesurée par DLS

Pendant sa thèse, Paul Gimenez avait effectué une mesure de la taille hydrodynamique des

NPs coréennes qu'il avait utilisées pendant ses expériences. Il avait alors trouvé un diamètre moyen de 571 nm, et prouvé par ses mesures une grande hétérogénéité dans la taille de ces agglomérats [Gime 15]. Les tailles mesurées par DLS, bien différentes des tailles mesurées par TEM exposées dans la section précédentes, semblent en accord avec la simple observation macroscopique de la solution de NPs évoluant au fil des semaines. Celle-ci, bien homogène après réception, devient de plus en plus hétérogène et des dépôts métalliques se forment peu à peu sur les bords du tube. Paul Gimenez a d'ailleurs mesuré le diamètre moyen des NPs Fe provenant de deux lots préparés à deux ans d'intervalle : le diamètre moyen des NPs venant du plus vieux lot est de 500.5 ± 118 nm contre 117.03 ± 2.55 nm pour le lot le plus récent.

J.K. Kim et collaborateurs ne présentent malheureusement aucune mesure de taille hydrodynamique dans leurs publications, excepté dans un de leurs articles où ils caractérisent des NPs Fe *coatées* avec de l'alginate et synthétisées selon le même protocole [Klei 12b]. Bien que nous ne puissions pas être certains qu'il s'agisse exactement des mêmes NPs Fe que celles que nous utilisons aujourd'hui, il est intéressant de remarquer que la mesure en DLS indique une distribution hétérogène de particules d'une taille de l'ordre de 200 nm en moyenne.

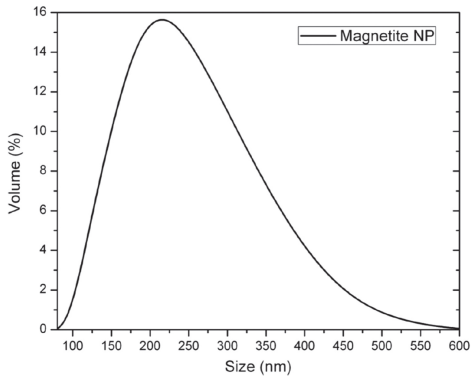


Figure 5.4 – *Mesure par DLS de la taille des NPs Fe coatées en alginate synthétisées par l'équipe de J.K. Kim. Mesure tirée de [Klei 12b].*

Taille des NPs Fe diluées dans du milieu de culture, mesurée par DLS

Enfin, il est très probable que le phénomène d'agglomération s'accentue lors de la dilution des NPs Fe dans le milieu de culture, où celle-ci s'enrobent potentiellement d'une couche de protéines. La mesure en DLS indiquant la présence d'objets d'une centaine de nm n'est pas aberrante et ce résultat est retrouvé dans d'autres références, comme dans les travaux de l'équipe de Hauser : leurs NPs d'oxyde de fer Fe_3O_4 coatées avec le peptide TAT ont un coeur métallique de 9-12 nm. Cependant, le diamètre hydrodynamique de ces mêmes NPs Fe mesuré dans l'eau distillée est de 127 nm, et celui-ci évolue lorsque les NPs sont diluées dans du milieu de culture cellulaire pour atteindre 202 nm [Haus 16].

L'analyse d'un échantillon de milieu complet seul a aussi été réalisée afin de déterminer la taille des objets naturellement présents dans le milieu (cf Fig. 5.5). Nous observons sur ces mesures l'existence d'un premier pic, autour de 10 nm, ainsi qu'un second à plusieurs centaines de nm. Le premier pic peut être expliqué par la présence de protéines, qui mesurent en général de la dizaine à la centaine d'Å, ce qui correspond à une dizaine de nm.

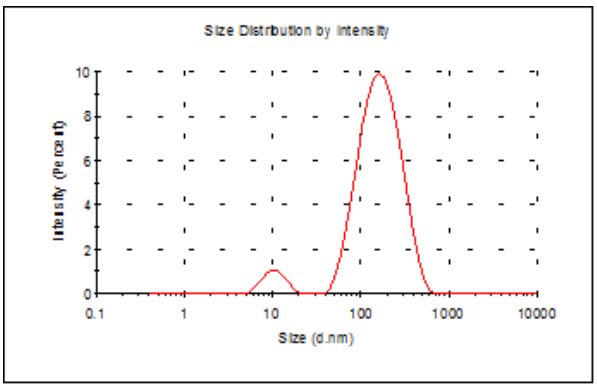


Figure 5.5 – *Distribution pondérée en intensité de la taille des composés présents dans le DMEM complet seul (mesure par DLS).*

5.2.1.2 Influence de la sonication

Dans l'eau

Les trois protocoles de sonication semblent affecter la taille des NPs d'une manière similaire. Cependant, il s'agit là de mesures de ***distribution pondérée en intensité***. Or un amas de grande taille aura bien plus d'influence sur l'intensité enregistrée qu'une NP individuelle. C'est pourquoi la valeur des pics est intéressante à discuter mais il ne faut pas perdre de vue que la distribution pondérée en intensité n'est pas représentative de la quantité d'éléments possédant un diamètre donné. Il serait possible de travailler avec les distributions pondérées en volume ou nombre pour corriger ce biais : cependant, ces types de distribution sont déconseillées par le fournisseur lors de l'étude de la taille de NPs Fe (voir section B.1.2).

Dans le milieu de culture

La dilution des NPs Fe dans le milieu de culture des cellules entraîne une augmentation de la taille des agglomérats. Le fait de soniquer les NPs Fe avant dilution dans le milieu de culture permet toutefois de conserver des NPs de taille inférieure à 100 nm, bien que ces mesures pondérées en intensité ne permettent pas de rendre compte de la quantité de ces NPs dans la population totale. Comme vu précédemment, le milieu complet contient aussi des objets détectés par DLS : il est difficile de différencier la composante de la courbe due aux NPs de celle due aux molécules du milieu complet. En comparant les distributions des NPs soniquées avec celles des NPs vortexées, on peut toutefois constater que la sonication permet bien l'"étirement" de la population des NPs vers des NPs de plus petite taille.

Nous pourrions imaginer soniquer les NPs Fe directement dans du milieu pour tenter d'apporter une solution à ce problème. Cependant, dans le cas d'une expérience *in vivo*, la taille des NPs sera encore modifiée en entrant en contact avec le sang. Il semble donc illusoire d'essayer de résoudre ce problème qui sera dans tous les cas rencontré à nouveau *in vivo*.

D'autre part, l'existence d'amas plus petits (autour de 50 nm) est encourageante : les NPs d'oxyde de fer entre 10 et 100 nm sont considérées comme étant optimales pour l'administration intraveineuse. Les particules supérieures à 200 nm ont une propension à s'accumuler dans la rate, et des NPs de taille inférieure à 10 nm sont souvent filtrées par les reins [Sing 10].

5.2.1.3 Conclusion des expériences de mesure de taille des NPs

Il est certain qu'un travail de caractérisation reste à faire afin de travailler dans des conditions plus propres et reproductibles. Cependant, cette difficulté a été révélée au cours de la thèse et il a fallu poursuivre le travail. Cette décision est bien entendu discutable mais le choix pris a été fait en connaissance de cause : pour les expériences *in vitro*, la taille des NPs change possiblement l'internalisation des NPs par les cellules, donc la masse de fer internalisée par les cellules, ce qui peut entraîner des variations importantes dans la survie des cellules après exposition au rayonnement X. Nous avons donc, pour compenser ce fait, effectué une mesure ICP-MS en parallèle de chaque expérience pour rendre compte de la masse de fer moyenne réellement internalisée par les cellules. Pour la suite des études, il serait intéressant de communiquer avec le chimiste en charge de la synthèse des NPs Fe de façon à construire un modèle de NPs stables dans le temps et restant dispersées une fois diluées dans le milieu de culture de cellules.

La sonication, faute de résoudre le problème, permet toutefois de faire apparaître une population de NPs ayant une taille compatible avec le *vivo*. Suite à cette caractérisation, la sonication a donc été ajoutée au protocole d'utilisation des NPs Fe. Pour des raisons pratiques, la sonication aura toujours lieu la veille de l'expérience dans la suite des travaux. Par ailleurs, les conséquences exactes de la sonication sur les NPs n'ont pas été étudiées. Certes, la taille des agrégats est affectée de manière favorable pour nos expériences, mais cette opération est plutôt "brutale" : en résulte notamment l'importance de refroidir les NPs pendant la sonication suite au chauffage qu'elle entraîne. La sonication pourrait donc jouer aussi un rôle sur la qualité du *coating* des NPs, en détériorant ou en modifiant la couche externe des NPs qui est directement en contact avec les cellules. C'est pourquoi, dans ces travaux de thèse, une sonication de 15 min sera donc préférée à une sonication plus longue.

5.3 Concentration de la solution mère de NPs Fe

5.3.1 Mesure de la concentration par ICP-MS

La concentration de la solution mère de NPs Fe fournie par l'équipe collaboratrice a aussi été mesurée par ICP-MS. Pour ce faire, 100 µL de différentes dilutions de la solution mère ont été minéralisés avec 400 µL d'acide nitrique, puis dosés par ICP-MS. Le protocole de mesure de concentration par ICP-MS est décrit dans la section B.4.

On obtient ainsi les résultats présentés dans la figure 5.6 :

Concentration indiquée ($mg\ (Fe_3O_4)/mL$)	Concentration mesurée (mg(Fe)/mL mesurée)	Concentration mesurée ($mg\ (Fe_3O_4)/mL$)
1.5	1.05	1.46
1.25	0.89	1.23
1	0.75	1.03

Figure 5.6 – *Comparaison des concentrations calculées à partir de la concentration de la solution mère indiquée par l'équipe coréenne avec les concentrations mesurées par ICP-MS pour plusieurs dilutions de la solution de NPs Fe.*

La concentration de la solution mère est donnée par l'équipe collaboratrice en $mg(Fe_3O_4)/mL$. Dans ce manuscrit, nous travaillerons avec l'unité du mg(Fe)/ mL plutôt qu'en $mg(Fe_3O_4)/mL$.

Les résultats de cette expérience sont donc donnés en mg(Fe_3O_4)/mL et en mg(Fe)/mL [1].

L'équipe coréenne nous indique la concentration de la solution mère à 25 mg/mL [Choi 12a]. Nous mesurons bien, par ICP-MS, la concentration attendue pour chaque dilution. Ainsi, cette expérience permet de valider la concentration de la solution mère de NPs Fe étudiée.

5.3.2 Discussion : concentration de la solution mère de NPs Fe

La concentration mesurée par ICP-MS est cohérente avec les données de l'équipe coréenne. La concentration de la solution mère est donc de 25 mg(Fe_3O_4)/mL ou 18.1 mg(Fe)/mL. Cependant, des mesures réalisées par tomographie lors de la thèse de Paul Gimenez ont montré que la concentration de la solution était de 15 mg(Fe)/mL. Cette valeur, la seule disponible au début de ces travaux, a donc été utilisée pour les calculs de concentration des premières expériences. Pour garder une cohérence entre les différentes expériences, nous avons donc calculé toutes les dilutions de cette thèse en prenant comme concentration de la solution mère 15 mg(Fe)/mL. Cette solution de NPs Fe est diluée lors des expériences *in vitro* d'exposition aux cellules à des concentrations habituellement comprises entre 0.02 et 0.3 mg/mL.

5.4 Discussion : autres caractéristiques des NPs Fe coréennes

Les NPs Fe coréennes possèdent un *coating* en Alginate. Les NPs d'oxyde de fer non *coatées* ont de très basses solubilités et une forte tendance à la précipitation. En plus de la toxicité qu'elles engendrent généralement, elles peuvent aussi s'agglomérer au contact du sang et gêner la circulation dans les vaisseaux sanguins [Sing 10]. Le *coating* en alginate des NPs Fe utilisées dans cette thèse permet donc aussi potentiellement de freiner le phénomène d'agglomération des NPs Fe.

Potentiel Zeta des NPs Fe coréennes : Paul Gimenez a effectué pendant sa thèse une mesure du Potentiel Zeta des NPs coréennes grâce au Zetasizer Nano-ZS (Malvern, Royaume-Uni). Lorsqu'une particule est en solution, elle s'entoure d'ions qui modifient sa charge électrique. Le potentiel Zeta représente la charge électrique d'une particule en solution. La mesure de ce potentiel Zeta sur les NPs Fe coréennes donne une valeur de -21,7 ± 4,09 mV. On estime généralement qu'un potentiel Zeta inférieur à ± 30 mV ne permet pas d'empêcher les interactions électrostatiques entre les NPs Fe : celles-ci peuvent donc former des agrégats et sédimenter [Gime 15]. Selon cet ordre de grandeur, le potentiel Zeta des NPs Fe mesuré ici est plutôt faible. Cela explique peut-être en partie la stabilité des NPs limitée à quelques semaines et la taille importante des amas mesurée par DLS.

Vieillissement des NPs Fe coréennes ? Dans ses travaux, Klein observe un processus de vieillissement de NPs Fe coatées avec du malate ou du citrate (NPs Fe mixtes maghémite/magnétite) : l'efficacité de ces NPs diminue au bout de deux à trois semaines [Klei 14]. Après expériences, l'auteur propose l'hypothèse que le processus de vieillissement contribue à remplacer les ions Fe^{2+} par des ions Fe^{3+} à la surface de la particule. Nous ne savons pas si un tel phénomène s'associe au phénomène de sédimentation des NPs Fe coréennes : il serait important par la suite de le caractériser, car les résultats biologiques observés peuvent être impactés par ce type de changement.

1. Une concentration de 25 mg(Fe_3O_4)/mL correspond à une concentration de 18.1 mg(Fe)/mL.

5.5 Adaptation des protocoles : "correspondance volume/surface"

Il m'a été important de préciser dans cette section que l'utilisation de NPs dans les expériences est souvent à l'origine de quelques obstacles qu'il est parfois possible de contourner en adaptant les tests réalisés en routine dans les laboratoires. Nous parlerons par la suite (7.4) de l'adaptation des tests de viabilité cellulaire aux NPs d'oxyde de fer utilisées : celles-ci, de par leur opacité, ont une propension à fausser les tests habituels fondés sur une mesure de l'absorbance, de la luminescence, ou sur un algorithme comportant une analyse d'image de fluorescence.

Aux difficultés de la maîtrise de la taille des NPs en fonction du temps et du lot s'ajoute une autre problématique, elle aussi apparue pendant la thèse. Les NPs ayant tendance à s'agglomérer, celles-ci ne restent pas en solution homogène comme cela peut être le cas pour les NPs de FerInject. Les NPs Fe de l'équipe coréenne sédimentent dans les puits de culture cellulaire ou au fond des flasques. Les cellules étant adhérentes, elles sont donc directement en contact avec les NPs ayant coulé. Cela modifie d'une part les interactions possibles, mais aussi la façon de calculer les concentrations de NPs dans les plaques de culture.

Le schéma 5.7 illustre le raisonnement que nous avons suivi. Les puits de plaque 96 puits ont un diamètre de 6.2 mm et sont plus hauts que larges : nous utilisons habituellement 200 µL de milieu par puits, ce qui permet de recouvrir les cellules avec environ 6.7 mm de milieu. Pour les flasques T25, nous utilisons habituellement 7 mL de milieu, ce qui permet de recouvrir les cellules avec environ 3 mm de milieu. Pour une même concentration volumique de NPs, les NPs sédimentent et se répartissent sur toute la surface de la flasque pour la culture en T25, tandis qu'elles s'accumulent sur la petite surface des puits de plaque 96 puits. Les cellules, qui sont adhérentes au support, vont donc être incubées avec des concentrations surfaciques en NPs Fe plus grandes dans les puits que dans les flasques T25 pour une même concentration volumique initiale.

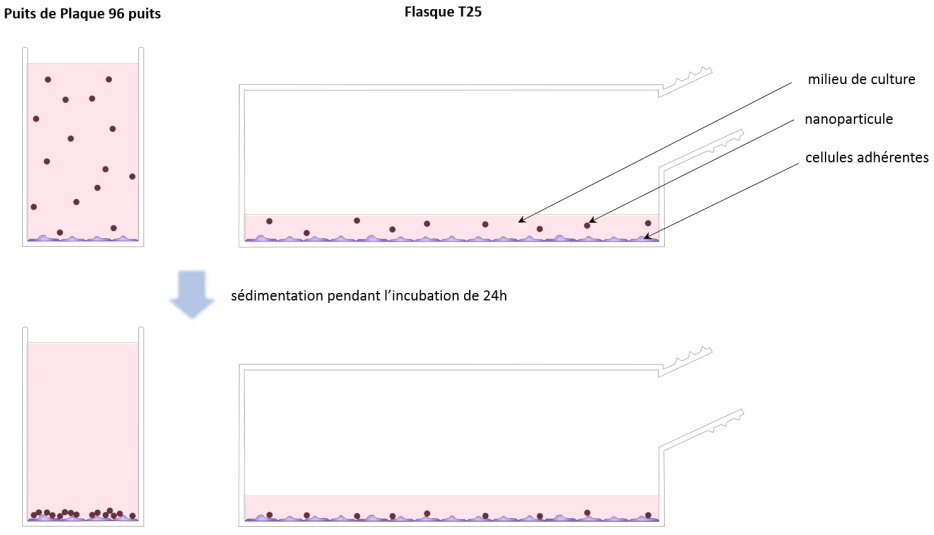


Figure 5.7 – *Schéma illustrant la correspondance "volume/surface". Pour une même concentration de NPs dans le milieu, les cellules en culture dans un puits de plaque 96 puits "rencontreront" plus de NPs que les cellules en culture dans une flasque T25 : en 24 h, les NPs auront sédimenté et se seront accumulées sur le tapis cellulaire.*

Nous avons donc adapté les calculs de concentration en utilisant des correspondances "volume/surface" : les tableaux de la figure 5.8 permettent d'évaluer la concentration en NPs à utiliser

pour obtenir une concentration surfacique similaire selon les flasques ou plaques utilisées. Pour un puits de plaques 96 puits, il faudra donc une concentration volumique de NPs Fe inférieure à celle utilisée dans une flasque T25 pour tenter d'obtenir une condition d'exposition aux NPs identique pour les cellules de ces deux récipients. Même en prenant ces précautions, les conditions d'expositions aux NPs sont susceptibles de varier d'un type de flasque à un autre. Il serait intéressant par la suite de vérifier par mesure ICP-MS que cette méthode permet bien d'obtenir la même masse de fer par cellule en "corrigeant" les concentrations de fer selon les flasques de culture utilisées.

A

	Volume (mL)	Surface (cm^2)	Volume/Surface
Puits 48 puits	1	0.95	1.05
Puits 96 puits	0.2	0.3	0.67
Puits 12 puits	2	3.9	0.51
Puits 6 puits	3	9.5	0.32
Flasque T25	7	25	0.28
T75	12	75	0.16

B

	Concentration équivalente (mg/mL)		
	T25	T75	6 puits
0.02 mg/mL	0.02	0.03	0.02
0.06 mg/mL	0.06	0.10	0.05
0.15 mg/mL	0.15	0.26	0.13

Figure 5.8 – *(A) Table des équivalences volume/surface selon le type de récipient de culture cellulaire utilisé. (B) Exemples de concentrations équivalentes pour plusieurs types de récipients de culture cellulaire.*

5.6 Le chapitre 5 en quelques mots

Les NPs coréennes utilisées dans les expériences d'augmentation de dose sont constituées d'un cœur métallique en Fe_3O_4, enrobé d'alginate. Une fois mises en contact avec le milieu de culture cellulaire, elles sont susceptibles d'adsorber des protéines présentes dans le sérum. Plusieurs caractéristiques de ces NPs ont été étudiées afin de mieux connaître ces outils avec lesquels nous travaillons.

- Le diamètre du cœur métallique des NPs Fe mesure une quinzaine de nanomètres (mesures TEM réalisées par notre équipe et confirmées par les articles de J.K. Kim *et al* [Choi 12a, Seo 13]).
- Ces NPs Fe ont tendance à s'agglomérer, et la taille de ces agglomérats évolue en fonction du temps. Les mesures par DLS indiquent que les NPs peuvent former des amas allant de la cinquantaine de nm à plusieurs centaines de nm. Par exemple, les NPs Fe juste vortexées mesurent 303.1 ± 106.8 nm de diamètre.
- Nous avons utilisé la sonication pour réduire la taille des amas afin d'améliorer la reproductibilité des expériences. Trois sonications successives (protocole : B.1.4) permettent d'obtenir une population de NPs de 184.4 ± 71 nm de diamètre.
- Une fois mises en contact avec le milieu de culture des cellules, la taille des agglomérats évolue. La distribution de taille pondérée en intensité comprend alors deux ou trois pics. La sonication permet toutefois de conserver une population de NPs de moins de 100 nm de diamètre. Par exemple, la distribution de taille des NPs soniquées trois fois comprend les pics suivants : 433.4 ± 189.7 nm, 91.75 ± 29.06 nm et 5297 ± 405 nm.
- Le processus de vieillissement des NPs n'a pas été caractérisé, mais par expérience celles-ci deviennent inutilisables après deux ou trois mois de stockage : l'agglomération des NPs devient trop importante et la sonication ne permet pas de rendre ce processus réversible. Pour freiner ce phénomène, les NPs Fe sont conservées à 4°C.

D'autre part, quelques difficultés ont été rencontrées lors de l'étude de ces NPs Fe opaques : celles-ci faussent les résultats de nombreux tests cellulaires utilisés en routine. De plus, lorsqu'elles sont injectées dans le milieu de culture, les NPs Fe sédimentent. Les cellules sont donc exposées à des concentrations surfaciques de NPs différentes selon la flasque ou les puits plaque de culture utilisés, pour une même concentration volumique étudiée. Nous avons donc utilisé une correspondance "volume/surface" afin de corriger ce phénomène.

Chapitre 6

Interactions entre NPs Fe et cellules tumorales : résultats *in vitro*

Sommaire

6.1 Matériels et méthodes 138
6.1.1 NPs Fe, agents de contraste et cellules 138
6.1.2 Méthodes expérimentales 138
6.2 Résultats : interactions entre NPs Fe et cellules 139
6.2.1 Les cellules tumorales internalisent les NPs Fe 140
6.2.2 Distribution des NPs Fe dans les cellules tumorales 141
6.2.3 Conséquences de l'internalisation des NPs sur les cellules 143
6.3 Discussions sur l'interaction entre les NPs et les cellules tumorales . . 145
6.3.1 Internalisation du fer dans les cellules tumorales 145
6.3.2 Distribution du fer dans les cellules tumorales 148
6.3.3 Radiosensibilisation des NPs Fe ? 149
6.3.4 Externalisation des nanoparticules ? 153
6.3.5 Etude comparative : influence des agents de contraste au Gd sur les cellules de gliome de rat 154
6.4 Le Chapitre 6 en quelques mots 159

Objectif des expériences : étudier les conséquences de l'exposition des cellules de gliome de rat aux NPs Fe

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les NPs Fe irradiées par des rayons X émettent des électrons secondaires qui déposent leur énergie localement autour des NPs. Selon les résultats des simulations du chapitre 4, le parcours des électrons secondaires dans l'eau ne dépasse pas 800 nm pour les électrons Auger et une centaine de µm pour les photoélectrons. Ainsi, l'effet biologique mesuré après irradiation aux rayons X est susceptible de varier selon la localisation des NPs dans la cellule [Delo 13] : si les électrons secondaires parviennent à endommager les cibles vitales de la cellule (ADN, mitochondries, voire membranes), l'effet de l'irradiation sera amplifié. Par exemple, des NPs proches ou à l'intérieur du noyau sont susceptibles de causer des dégâts plus importants à la cellule que des NPs cytoplasmiques. D'autre part, en plus de l'effet physique d'augmentation de la dose, les NPs Fe sont susceptibles d'affecter le comportement ou la viabilité des cellules par d'autres mécanismes.

Les résultats présentés dans ce chapitre avaient tout d'abord pour objectif de déterminer si les NPs Fe s'accumulent dans les cellules, et, le cas échéant, en quelles quantités : plus les cellules internalisent de NPs Fe et plus la dose déposée lors de l'irradiation sera -en théorie- élevée. D'autre part, les études ont permis de déterminer dans quelles zones de la cellule les NPs Fe sont accumulées.

D'autre part, ce chapitre abordera la question des conséquences biologiques de l'exposition des cellules aux NPs Fe pendant 24 h : la présence de NPs Fe dans le milieu de culture est-elle toxique pour les cellules ? Quel impact les NPs Fe ont-elles sur le métabolisme des cellules ? En effet, si les NPs permettent d'augmenter *physiquement* la dose lors de l'irradiation *via* les électrons secondaires, il est aussi possible qu'elles aient un impact *biologique* sur la survie des cellules.

6.1 Matériels et méthodes

6.1.1 NPs Fe, agents de contraste et cellules

Les NPs utilisées dans ce chapitre sont les NPs Fe de l'équipe coréenne présentées dans le chapitre A.1.2 et caractérisées dans le chapitre 5. Par ailleurs, d'autres composés ont aussi été utilisés lors d'expériences similaires de manière ponctuelle : les NPs FerInject (voir A.1.1) ainsi que deux agents de contraste au Gd, le Dotarem et le Magnevist (voir A.3). Les résultats obtenus avec les NPs Fe coréennes pourront donc être comparés dans un second temps avec les résultats obtenus pour ces autres composés. Les différences de comportement des cellules ou de résultats de survie pourront alimenter la discussion et aider à prendre du recul sur les effets physiques et biologiques en jeu.

La lignée cellulaire utilisée dans ce chapitre est la lignée F98. Il s'agit d'une lignée de gliome de rat. Nous comparerons parfois les résultats avec ceux obtenus pour une autre lignée de gliome de rat, la lignée 9L. Ces deux lignées sont décrites dans la section A.4.

Les protocoles de culture cellulaire sont décrits en détail en annexe (B.2).

6.1.2 Méthodes expérimentales

Plusieurs méthodes d'imagerie ont été utilisées de manière à caractériser la distribution des NPs Fe dans les cellules. Les premières observations ont été réalisées avec le microscope optique du

laboratoire. Par la suite, d'autres méthodes plus fines ont été utilisées : l'observation au microscope optique de **coupes de cellules** prises dans la résine EPON a été réalisée à l'Institut d'Anatomie de l'Université de Berne, en collaboration avec Werner Graber, Jean-Albert Laissue et Valentin Djonov. Le protocole est détaillé en annexe (voir B.5.2). D'autre part, des échantillons de cellules exposées aux NPs ont été analysées sur la ligne ID-16 A en collaboration avec Sylvain Bohic et Murielle Salome par **spectrométrie de fluorescence de rayons X**. Le fonctionnement de cette méthode ainsi que le traitement des données et le protocole expérimental de préparation des échantillons sont décrits en annexe (voir B.5.1). Rapidement, il s'agit d'irradier une cellule à imager "pixel par pixel" à 17 keV. A chaque pixel, des détecteurs enregistrent le spectre de photons de fluorescence émis par les éléments contenus dans le pixel. Après un traitement des données, il devient donc possible de remonter à la quantité de fer (ou d'un autre élément) présente dans ce pixel, et ainsi de connaître la distribution de chaque élément dans la cellule.

La masse de fer accumulée dans les cellules de gliome suite à l'exposition aux NPs Fe a été mesurée par **ICP-MS**. Le principe et le protocole précis de cette méthode sont présentés en annexe (voir B.4). Rapidement, il s'agit d'exposer les cellules aux NPs Fe (un triplicat par condition) puis de compter le nombre de cellules par échantillon. Les échantillons sont ensuite centrifugés et les culots secs sont minéralisés avec 500 µL d'acide nitrique. Les échantillons sont ensuite ionisés et les ions sont séparés et détectés selon leur nature dans par un spectromètre de masse. Connaissant ainsi la concentration de fer dans l'échantillon d'une part, et le nombre de cellules dans l'échantillon d'autre part, il devient possible d'en déduire la masse de fer moyenne accumulée par cellule.

Le cycle cellulaire des F98 exposées ou non aux NPs Fe a été étudié par **cytométrie en flux**. Le protocole de préparation des échantillons est décrit en détail en annexe (B.3.6). Rapidement, les cellules F98 sont exposées pendant 24h aux NPs Fe à différentes concentrations. Après rinçage au PBS, elles sont fixées à l'éthanol absolu puis conservées au congélateur (-20°C). Le jour de l'expérience, les cellules sont rincées au PBS-EDTA. Elles sont ensuite resuspendues dans 500 μL de PBS-EDTA, 5 μL d'Iodure de Propidium et 5 μL d'ARNase. Après 30 minutes d'incubation, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux sur la plateforme BIG du CEA de Grenoble, sous les conseils de Véronique Collin-Faure. Le cytomètre utilisé est un BD FACSCalibur.

Le protocole de sonication des NPs Fe a déjà été présenté dans le chapitre 5 et est détaillé dans la section B.1.4.

6.2 Résultats : interactions entre NPs Fe et cellules

C'est au cours de la thèse de Paul Gimenez que l'engouement pour les NPs Fe coréennes fut lancé dans l'équipe RSRM [Gime 15]. Nous l'avons vu précédemment, au moins deux paramètres influent sur les effets physiques responsables de l'augmentation du dépôt de dose dans la zone contenant des NPs : la nature de l'élément composant les NPs et la concentration de cet élément dans la zone irradiée. Le Gd, de numéro atomique 64, est favorable par rapport au fer de numéro atomique 26 : plus le numéro atomique est élevé, plus la section efficace de l'effet photoélectrique est importante. Cependant, lors de ses travaux, Paul Gimenez a remarqué que les NPs Fe coréennes s'accumulaient en grandes quantités dans les cellules, de telle sorte que la concentration élevée en NPs Fe compensait le plus faible Z de cet élément. L'effet théorique obtenu peut donc se comparer à l'effet obtenu avec d'autres éléments comme le Gd.

6.2.1 Les cellules tumorales internalisent les NPs Fe

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons tout d'abord cherché à retrouver ces résultats prometteurs. Pour ce faire, des cellules de gliome F98 ont été exposées aux NPs Fe coréennes pendant 24h, à des concentrations comprises en moyenne entre 0.03 et 0.3 mg (Fe)/mL. Le temps d'incubation de 24h a été choisi car utilisé par Paul Gimenez pendant ses travaux.

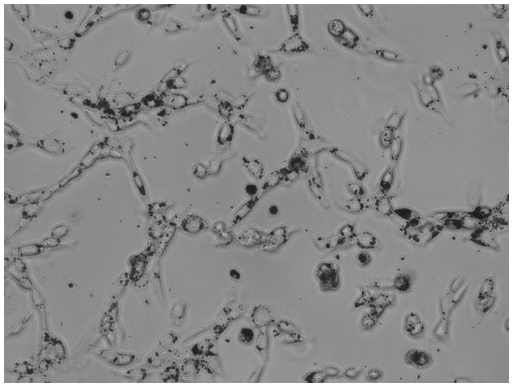


Figure 6.1 – *Observation des cellules F98 au microscope optique après exposition pendant 24h aux NPs Fe de l'équipe coréenne.*

La figure 6.1 représente une observation caractéristique au microscope optique des cellules F98 après exposition pendant 24h aux NPs Fe. On remarque que le cytoplasme de celles-ci est noir ; il semble raisonnable de penser que les cellules sont chargées en particules. De plus, la taille des amas visibles au microscope est clairement supérieure aux 15 nm de diamètre des NPs Fe individuelles, ce qui confirme l'agrégation de ces particules en solution.

Résultats des mesures par ICP-MS

Des cellules de gliome de rat 9L et F98 ont été exposées aux NPs Fe coréennes pendant 24 h à différentes concentrations. Le résultat des analyses par ICP-MS est présenté dans les figures 6.2 (A) et (B) : les deux types de cellules tumorales F98 et 9L internalisent une quantité similaire de NPs Fe, de l'ordre de la centaine de pg par cellule, bien que les 9L semblent internaliser plus efficacement les NPs Fe que les F98. En effet, pour une concentration de 0.06 mg(Fe)/mL dans le milieu de culture, les 9L internalisent 110 $\pm$ 17 pg/cellule et les F98 internalisent 71 $\pm$ 22 pg/cellule.

D'autre part, la sonication des NPs Fe coréennes impacte la masse de fer internalisée par les F98 (Fig. 6.2 (B) et (C)). Les F98 internalisent 71 $\pm$ 22 pg(Fe)/cellule lorsqu'elles sont exposées à 0.06 mg/mL de NPs Fe non soniquées, contre 30 $\pm$ 2 pg(Fe)/cellule lorsqu'elles sont exposées à 0.06 mg/mL de NPs Fe soniquées.

De plus, nous pouvons remarquer que la masse de fer par cellule semble atteindre un seuil de saturation à partir d'une certaine concentration de fer dans le milieu. Selon les figures 6.2 (B) et (C), la valeur de ce plateau n'est pas identique bien qu'il s'agisse du même type cellulaire. En effet, pour les NPs non soniquées, ce plateau se situe aux alentours de 120 pg(Fe)/cellule et la saturation débute pour des concentrations de fer dans le milieu de culture avoisinant les 0.2 mg/mL. Lorsque les NPs sont soniquées, ce plateau se situe alors à 30 pg(Fe)/cellule et la saturation est atteinte dès la concentration de 0.06 mg/mL.

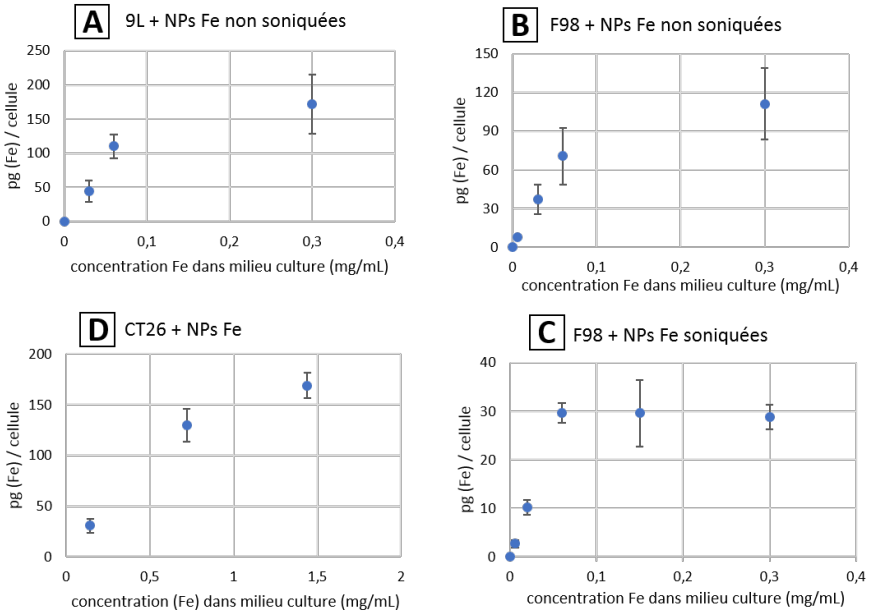


Figure 6.2 – *Masse de fer internalisée par cellule après une exposition pendant 24 h aux NPs Fe coréennes, mesurée par ICP-MS. Exposition de cellules de gliome 9L (A) et F98 (B) aux NPs Fe non soniquées. (C) Exposition des F98 aux NPs soniquées. (D) Résultats présentés dans l'article de l'équipe coréenne exposant des cellules CT26 aux mêmes NPs Fe [Choi 12a].*

6.2.2 Distribution des NPs Fe dans les cellules tumorales

6.2.2.1 Observation de coupes de cellules au microscope optique

Des cellules F98 ont été exposées aux NPs Fe coréennes pendant 24h à une concentration de 0.3 mg(Fe)/mL. Après fixation des cellules et préparation des échantillons dans la résine EPON, les coupes ont été observées au microscope optique avec un objectif 40x.

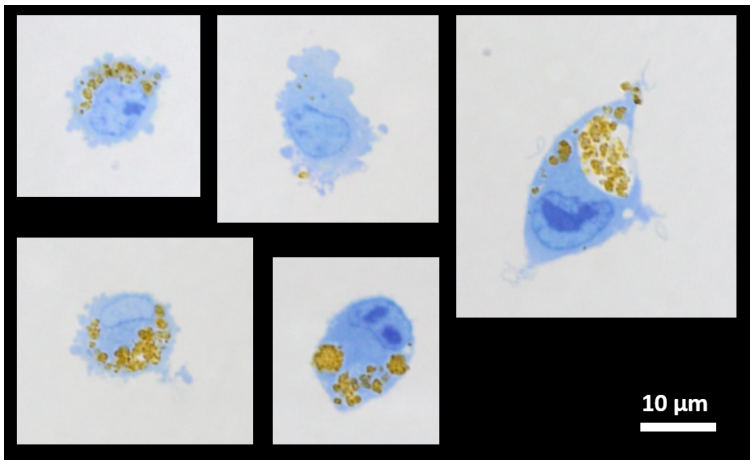


Figure 6.3 – *Observation au microscope optique (40x) de F98 après exposition aux NPs Fe coréennes (non soniquées) pendant 24h à 0.3 mg(Fe)/mL.*

Comme nous pouvions le constater avec le microscope du laboratoire, les NPs Fe sont bien internalisées dans les cellules. Elles sont accumulées dans des vésicules dans le cytoplasme des cellules. On peut noter que les cellules ont tendance à se déformer pour internaliser les NPs, et même une fois les NPs internalisées. Ces déformations ont une envergure importante si on la compare à la taille des cellules ; on peut se demander si ces cellules sont réellement capables de poursuivre leur métabolisme habituel une fois les NPs Fe dans les vésicules. Sur certaines images de la figure 6.3, on remarque d'ailleurs que la surface de certaines cellules forme des sortes de vacuoles, ce qui peut rappeler la morphologie des cellules en apoptose.

Un comptage sur 251 cellules observées lors de cette expérience permet d'estimer qu'au moins 76% des cellules ont internalisé des NPs Fe. Pour 13%, il est difficile de déterminer si les cellules contiennent ou non des NPs, et pour 11% les cellules ne semblent pas contenir de NPs Fe. Cependant, il s'agit là de coupes cellulaires : parmi les cellules ne contenant pas de NPs Fe visibles, des vacuoles emplies de fer seraient peut-être visibles sur d'autres coupes.

6.2.2.2 Réalisation des cartographies en SR-XRF

Pour déterminer plus précisément la distribution des NPs Fe dans les cellules, nous avons analysé des échantillons de cellules F98 ayant été exposées aux NPs Fe par microfluorescence X sur la ligne ID-16 en collaboration avec Sylvain Bohic et Murielle Salome. La SR-XRF permet d'obtenir de manière précise la distribution d'un élément dans une cellule.

Les échantillons sont composés de cellules F98 cultivées sur des membranes, exposées aux NPs Fe à deux concentrations différentes (0.02 et 0.06 mg/mL) pendant 24h et fixées au PFA.

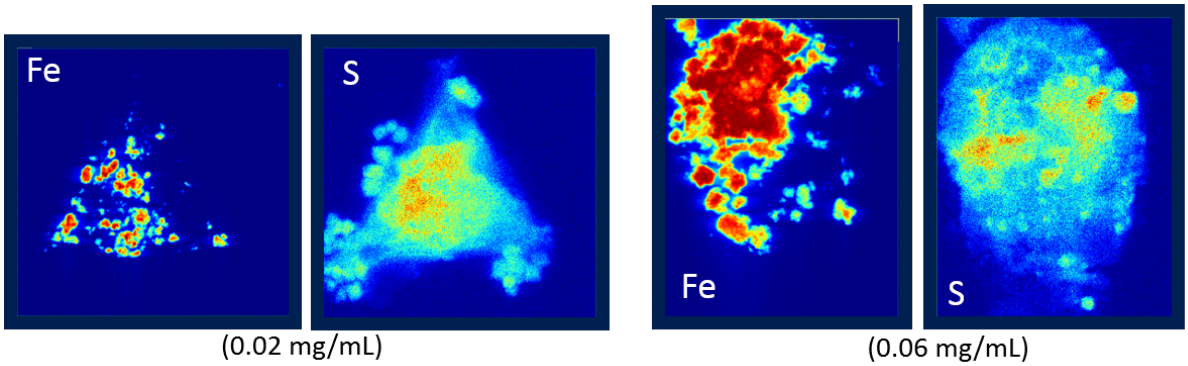


Figure 6.4 – *Images caractéristiques de cellules F98 après exposition pendant 24 h aux NPs Fe de l'équipe coréenne (soniquées) observées sur ID-16 par SR-XRF (concentrations d'exposition : [gauche] 0.02 mg/mL ; [droite] 0.06 mg/mL). Ces cartes indiquent la concentration surfacique de fer (Fe) ou de soufre (S) mesurée pour chaque "pixel" de la cellule.*

La figure 6.4 représente quelques images caractéristiques obtenues lors de l'observation des échantillons. Le soufre étant un élément naturellement présent et réparti dans les cellules, il permet de montrer les délimitations des cellules. Comme vu précédemment, les NPs sont bien internalisées dans les cellules. Plus précisément, elles sont accumulées dans des vacuoles du cytoplasme. D'autre part, les cellules exposées à 0.06 mg(Fe)/mL ont amassé plus de fer que les cellules exposées à 0.02 mg(Fe)/mL. Aucune présence de fer dans le noyau n'a été détectée.

6.2.3 Conséquences de l'internalisation des NPs sur les cellules

Les observations au microscope de la morphologie des cellules tumorales mises en contact avec les NPs Fe coréennes peuvent interpeller. En effet, les cellules semblent subir une déformation de grande échelle comparée à leur taille. Certaines cellules semblent même être en début d'apoptose. Il est alors naturel de se demander si ces NPs n'ont pas d'effet sur les cellules, même sans irradiation.

6.2.3.1 Comportement des cellules exposées aux NPs Fe

Le comportement de cellules F98 exposées ou non aux NPs Fe (concentration : 0.3 mg(Fe)/mL) a été filmé pendant approximativement 12 h. Les résultats sont présentés sur la figure 6.5.

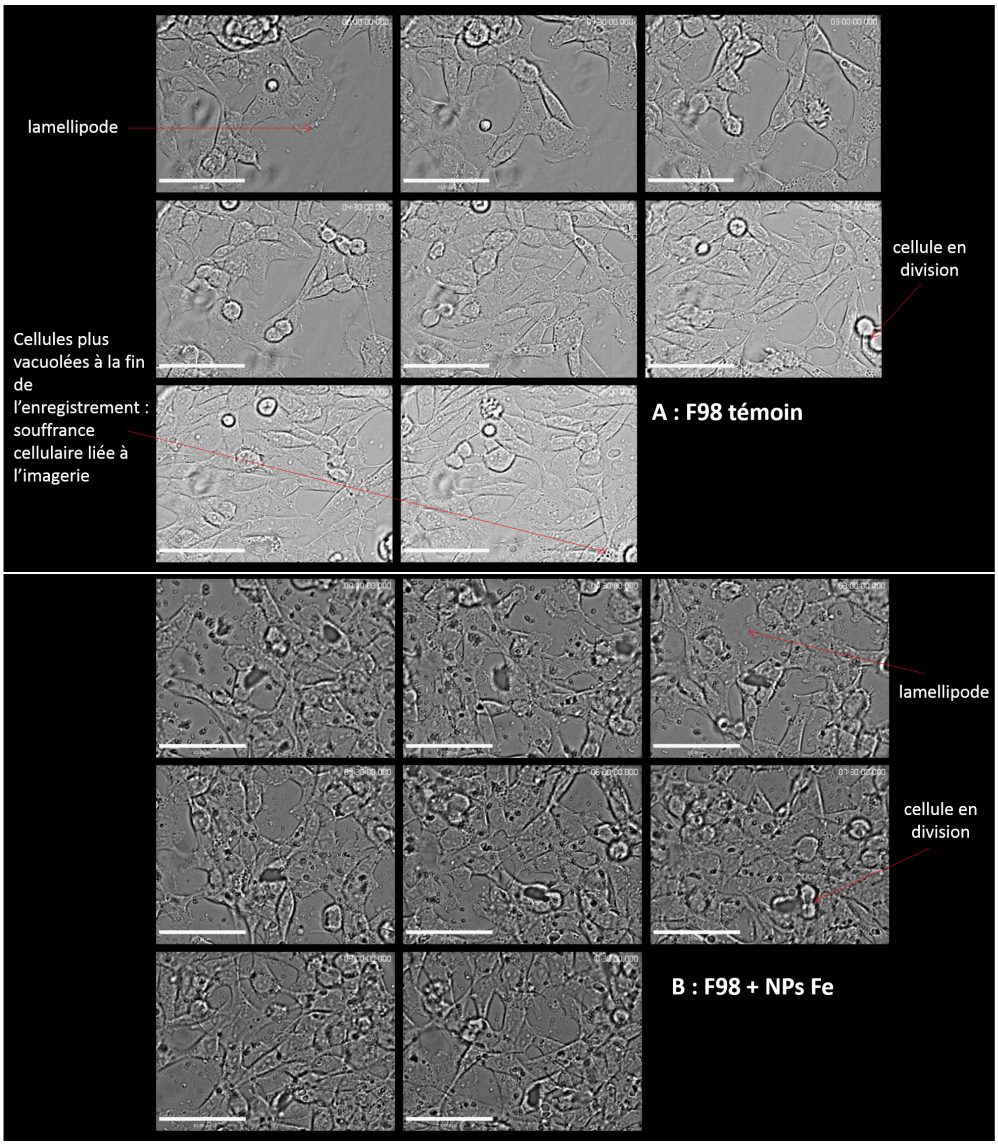


Figure 6.5 – *Observation du comportement des cellules F98 en live imaging à intervalles réguliers pendant approximativement 12 h. (A) Cellules témoin. (B) Cellules exposées à 0.3 mg(Fe)/mL de NPs Fe de l'équipe coréenne non soniquées.*

Les cellules témoin et les cellules exposées aux NPs Fe se divisent et prolifèrent tout au long de l'expérience. Dans les deux conditions étudiées, elles sont mobiles et possèdent des lamellipodes. De plus, les cellules sont plus vacuolées à la fin de l'enregistrement qu'au début, et ce aussi pour les cellules témoin. Cette observation est assez commune selon notre collaborateur Jean-Philippe Kléman, car les conditions recréées par le pseudo-incubateur ne sont pas parfaitement identiques à celles d'un vrai incubateur : au bout de plusieurs heures, les cellules commencent à en souffrir. De plus, dans le puits des cellules exposées aux NPs Fe, seulement les plus gros amas de NPs Fe sont visibles à ce grossissement. Là encore, il est possible d'observer leur internalisation par les F98 dans des vacuoles.

D'après ces résultats, les capacités de prolifération et de mobilité des cellules F98 ne sont pas être affectées par la présence de NPs Fe à cette concentration, bien que les observations soient seulement qualitatives.

6.2.3.2 Cycle cellulaire

D'autre part, nous avons réalisé une étude de cycle cellulaire sur des cellules F98 ayant été exposées ou non à des NPs Fe coréennes pendant 24h à plusieurs concentrations : 0.06 mg(Fe)/mL et 0.15 mg(Fe)/mL.

La figure 6.6 illustre la distribution des cellules dans le cycle cellulaire selon les conditions auxquelles elles ont été soumises. Les cellules contrôle sont réparties "normalement" dans le cycle cellulaire (observation similaire aux cas d'école). Cette répartition se déséquilibre lorsque les cellules ont été exposées pendant plus de 24h aux NPs Fe aux concentrations étudiées. Une composante révélant la présence de corps apoptotiques apparaît dans le cas des cellules exposées aux NPs Fe. Cette composante est d'autant plus importante que la concentration en fer dans le milieu de culture est élevée. En effet, la composante de corps apoptotiques est de 0.28 ± 0.05 % pour les cellules contrôle. Elle représente 14.8 ± 3.0 % des cellules exposées à 0.06 mg(Fe)/mL et 28.6 ± 2.4 % des cellules exposées à 0.15 mg(Fe)/mL. De plus, à cette concentration, le cycle cellulaire semble se "tasser" et présente moins de cellules en phase G1 (65.0 ± 2.1 % pour les cellules contrôle contre 40.1 ± 3.5 % pour les cellules exposées à 0.15 mg(Fe)/mL).

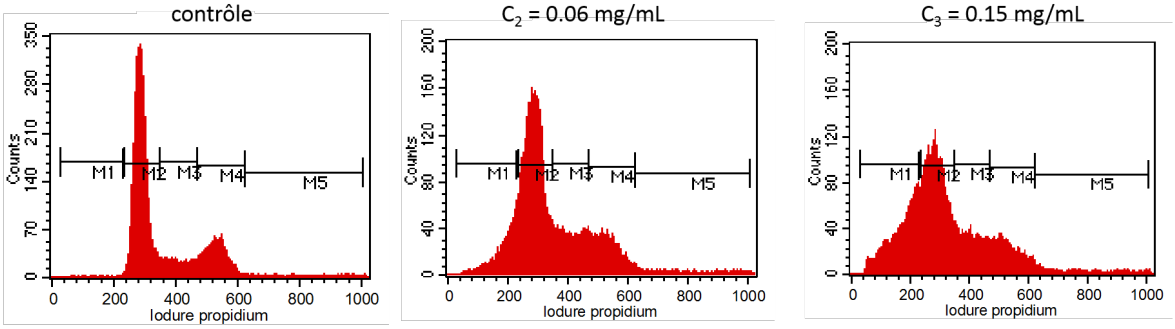


Figure 6.6 – *Etude du cycle cellulaire des F98 exposées (ou non) pendant 24h aux NPs Fe coréennes soniquées (C2=0.06 mg(Fe)/mL et C3=0.15 mg(Fe)/mL). Images représentatives des triplicats réalisés pendant l'expérience.*

Dans la figure 6.7, la population de chaque étape du cycle cellulaire est illustrée plus quantitativement pour les trois conditions étudiées. La présence de corps apoptotiques est bien visible pour les cellules exposées aux NPs Fe, ainsi que sa dépendance à la concentration de fer dans

le milieu de culture (différence significative pour les deux conditions d'exposition, ANOVA à un facteur, p<0.0005). De plus, le nombre de cellules en phases G1, G2 et M diminue au profit de la formation des corps apoptotiques et des cellules en phase S. La phase S se révèle significativement plus peuplée pour les cellules exposées aux NPs Fe (ANOVA à un facteur, p=0.005 et p=0.035 pour une exposition à 0.06 mg(Fe)/mL et 0.15 mg(Fe)/mL respectivement). En effet, les cellules en phase S représentent 12.4 ± 0.8 % des cellules contrôle, contre 19.1 ± 2.4 % des cellules exposées à 0.06 mg(Fe)/mL et 16.7 ± 1.1 % des cellules exposées à 0.15 mg(Fe)/mL.

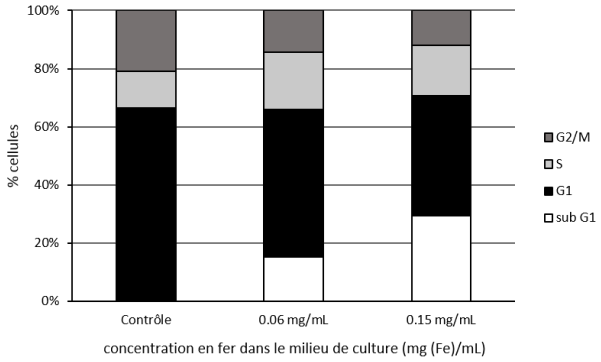


Figure 6.7 – *Distribution des cellules F98 dans le cycle cellulaire après exposition pendant 24h aux NPs coréennes soniquées (0.06 et 0.15 mg/mL).*

6.3 Discussions sur l'interaction entre les NPs et les cellules tumorales

6.3.1 Internalisation du fer dans les cellules tumorales

6.3.1.1 Les capacités d'accumulation des NPs Fe par les cellules sont encourageantes pour la "photoactivation"

Le fait que les NPs soient internalisées par les cellules de gliome constitue un avantage conséquent : les électrons secondaires ont ainsi plus de probabilité d'atteindre les organes sensibles des cellules lors de l'irradiation. De plus, si l'on suppose que les cellules en suspension sont comparables à des cubes de 10 µm de côté, une centaine de pg par cellule correspond à une concentration intracellulaire de 100 mg(Fe)/mL. Le DEF macroscopique correspondant est de 3.86 à 30 keV et 2.55 à 80 keV, ce qui justifie largement l'utilisation de ces NPs Fe dans un but thérapeutique.

Limites des mesures ICP-MS et remarques :

1. Lors de la création des échantillons pour l'ICP-MS, les rinçages, centrifugations et temps d'attente, bien que limités, peuvent laisser le temps aux cellules d'externaliser certains composés, notamment dans le cas de l'étude d'internalisation de petites molécules.
2. Le rinçage des cellules exposées aux NPs Fe coréennes s'est révélé complexe. Il n'est pas exclu que les mesures soient un peu biaisées par la présence de NPs Fe non internalisées dans les échantillons. Au contraire, le rinçage des NPs FerInject est bien plus aisé : les NPs ne sédimentent pas.
3. *Objections sur la précision de la mesure :* la mesure de la concentration par ICP-MS est très précise. L'ICP-MS est trois ordres de grandeur plus sensible que l'ICP-AES [Subi 16]. Cependant, les étapes précédant la mesure en elle-même peuvent contribuer à rendre les

résultats imprécis ou biaisés : notamment, la perte des cellules lorsque le surnageant est retiré ou le volume de milieu pouvant rester au fond du tube. La minéralisation étant réalisée avec 500 μL d'acide nitrique, laisser 50 μ dans le tube peut déjà engendrer une erreur de 10% sur la mesure.

Les mécanismes d'internalisation des NPs Fe par les cellules n'ont pas été étudiés. D'après la littérature, les processus mis en jeu seraient principalement la phagocytose (dans le cas de cellules phagocytaires), la macropinocytose et l'endocytose médiée par la clathrine (voir annexe **??**).

6.3.1.2 Comparaison avec les résultats de la littérature

La figure 6.2 (D) représente les résultats obtenus par l'équipe coréenne avec ces mêmes NPs Fe lorsqu'elles sont incubées pendant 24h avec des cellules CT26 (cellules de cancer du colon murines) [Choi 12a]. Nous remarquons que les CT26 sont capables d'internaliser des masses de fer aussi importantes que les F98 : les CT26 internalisent 129.7 $\pm$ 16.3 pg/cellules lorsqu'elles sont exposées à une concentration de 0.72 mg(Fe)/mL. Cependant, ce résultat n'était pas forcément attendu car les F98 et les 9L ne sont pas issues du même type cellulaire que les CT26, qui sont dérivées de fibroblastes. Nous pouvons aussi remarquer que les concentrations en fer dans le milieu de culture des cellules sont bien supérieures à celles de nos expériences, bien qu'elles ne provoquent aucune toxicité pour les cellules selon l'article [Choi 12a]. Alors que les concentrations de l'équipe coréenne dépassent le mg (Fe)/mL, nous peinons à réaliser des expériences incluant des concentrations supérieures à 0.3 mg (Fe)/mL à cause de la toxicité que cela engendre. A ce jour, ce phénomène reste encore incompris, et la seule hypothèse que je peux proposer consiste à supposer que les NPs Fe utilisées dans les deux équipes ne sont pas identiques, bien que provenant du même protocole de synthèse (agrégation, transport, attente avant utilisation...).

A titre comparatif, l'équipe de Mazur a exposé des cellules de cancer du sein murines (MTG-B) à des NPs d'oxide de fer (100 nm, *coatées* à l'amidon) à une concentration de 0.2 mg(Fe)/mL. Les mesures par ICP-MS montrent une accumulation de 40 pg de fer par cellule après 72h d'incubation et environ 13 pg par cellule après 24h d'incubation [Mazu 13].

Il serait aussi intéressant de discuter du temps d'incubation des NPs fixé ici à 24h : cette durée n'a pas particulièrement plus de sens qu'une autre par rapport à ce qui peut se dérouler *in vivo* lors de l'accumulation des NPs Fe dans la tumeur. Bien que la majorité des auteurs de la littérature utilisent aussi un temps d'exposition de 24h, ce qui rend les expériences notamment plus commodes, d'autres auteurs utilisent des temps d'incubation plus longs, comme 48h ou 72h (voir section 2.2.4). Cet aspect n'a pas été abordé au cours de cette thèse.

6.3.1.3 Masse de fer maximale que les cellules peuvent internaliser ?

Nous pouvons remarquer, sur les courbes présentées dans la figure 6.2, que la masse de fer par cellule semble atteindre une phase de saturation à partir d'une certaine concentration de fer dans le milieu. Une première hypothèse consisterait à dire que les cellules ne peuvent pas internaliser plus qu'une certaine quantité de fer égale au plateau atteint pour les concentrations les plus élevées. Cependant, entre les figures 6.2 (B) et (C), le plateau n'est pas identique bien qu'il s'agisse du même type cellulaire. Si les cellules F98 de la courbe (C) atteignent une saturation dans la masse de fer internalisée à partir d'une certaine concentration, ce n'est donc pas parce qu'elles ne sont plus capables d'accumuler ce fer. Les NPs Fe sédimentant au fond des flasques de culture, on peut alors imaginer que les cellules internaliseraient les NPs déposées autour d'elle dans un certain périmètre

et à une vitesse donnée : 24h ne leur suffirait plus pour internaliser toutes les NPs présentes dans ce périmètre pour les grandes concentrations. Ce phénomène de "périmètre" est visible dans la figure 6.8 pour le cas de cellules de gliome 9L.

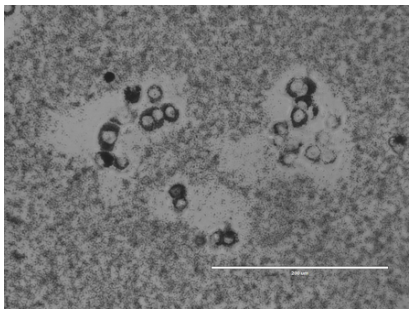


Figure 6.8 – *Les cellules de gliome 9L internalisent les NPs Fe présentes dans un certain périmètre autour de leur localisation.*

6.3.1.4 Rôle de la sonication

Nous avons observé dans les résultats des mesures ICP-MS que la masse de fer accumulée par les cellules F98 était significativement plus importante dans le cas où les NPs Fe n'étaient pas soniquées (Fig. 6.2 (B) et (C) ; test : ANOVA à un facteur, p=0.0187). Ce phénomène est peut être du au simple fait qu'une cellule amasse de nombreux d'atomes de fer en internalisant d'un coup un unique amas de NP Fe. Il faudrait que la cellule internalise de nombreuses NPs Fe individuelles pour arriver à accumuler cette même masse de fer. D'autre part, il semble que les astrocytes soient des cellules phagocytaires professionnelles [Caho 08]. Les cellules de gliomes étant dérivées d'astrocytes, il est aussi possible que ces cellules soient attirées par des NPs de taille plus conséquentes. Comme l'intérêt des NPs Fe réside en la masse de fer accumulée par les cellules, on peut alors se demander s'il est vraiment pertinent de soniquer les NPs Fe, puisque ce protocole réduit visiblement la masse de fer par cellule. Ne serait-il pas plus intéressant d'utiliser des particules de taille plus importante ? Si cela peut être favorable du point de vue des expériences *in vitro*, il semble au contraire désavantageux d'utiliser des NPs Fe de taille supérieure à la centaine de nm *in vivo*, celles-ci étant moins aptes à passer la BHE et/ou à diffuser dans la zone tumorale.

6.3.1.5 Comparaison avec l'internalisation du FerInject

La figure 6.9 représente la masse de fer internalisée par les cellules de gliome de rat F98 ou 9L exposées au FerInject pendant 24h. Même aux plus grandes concentrations étudiées lors de ces expériences (1.0 et 2.4 mg(Fe)/mL), aucun plateau de saturation n'est atteint. D'autre part, la masse de fer internalisée par les cellules est bien plus faible que dans le cas d'une exposition aux NPs Fe coréennes : pour la concentration d'exposition la plus élevée (2.4 mg/mL), les 9L internalisent 1.16 ± 0.15 pg(Fe)/cellule et les F98 internalisent 0.36 ± 0.03 pg(Fe)/cellule. Nous pouvons donc nous attendre à mesurer un effet d'augmentation de dose moindre avec ces NPs. Une des raisons possibles expliquant l'accumulation plus limitée du FerInject dans les cellules de gliome réside dans la raison clinique pour laquelle le FerInject a été développé : ces NPs Fe ont été conçues pour corriger les carences en fer de l'organisme. Elles ciblent donc les macrophages et évitent l'internalisation par les autres cellules du tissu afin de limiter la distribution de ce traitement aux tissus non concernés. Ce ciblage des macrophages peut notamment être induit par le *coating* de ces NPs. De plus, le FerInject est composé de NPs bien plus petites que les amas de NPs Fe coréennes et ces NPs

sédimentent pas. Il apparaît donc plausible que l'internalisation de ces NPs dans les cellules n'ait pas lieu de la même manière et avec les mêmes caractéristiques que l'internalisation des NPs Fe coréennes.

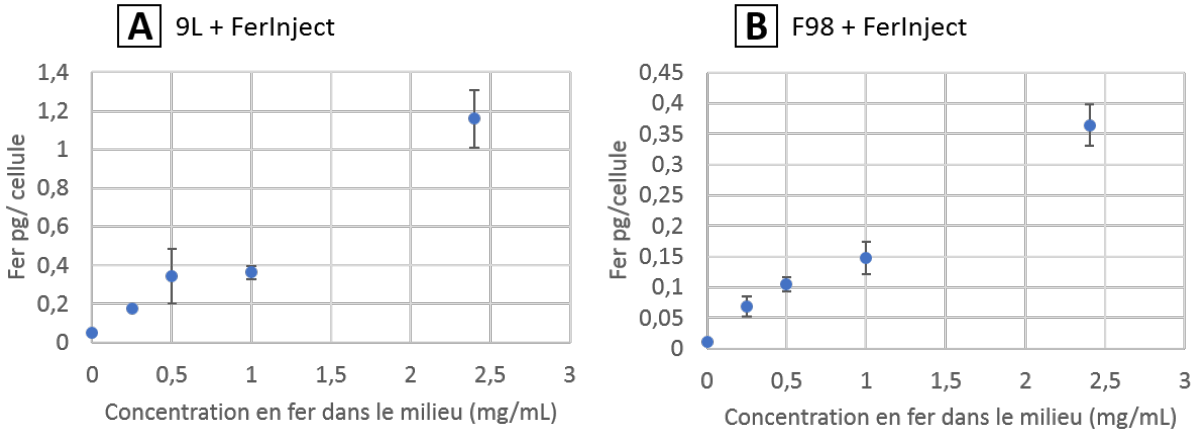


Figure 6.9 – *Masse de fer internalisée par cellule (A) 9L ou (B) F98, après une exposition pendant 24 h à différentes concentrations de NPs Fe FerInject, mesurée par ICP-MS.*

6.3.2 Distribution du fer dans les cellules tumorales

L'imagerie SR-XRF nous a permis de constater une accumulation des NPs Fe dans des vésicules du cytoplasme des cellules. Il est intéressant de constater que, dans notre étude, ces vésicules semblent répartis indifféremment dans le cytoplasme. Au contraire, Paul Gimenez avait observé une accumulation de ces vésicules autour du noyau lors d'expériences similaires [Gime 15]. L'équipe coréenne indique aussi une distribution des NPs Fe autour de la membrane périnucléaire chez les cellules C6 (gliome de rat) et CT-26 (cancer du côlon murin) [Choi 12a]. La localisation des NPs Fe proches du noyau est un avantage du point de vue thérapeutique : les électrons secondaires sont plus susceptibles de déposer leur énergie dans l'ADN et donc d'engendrer les lésions complexes à réparer. Ceci est particulièrement intéressant pour les électrons Auger, dont le rayon d'action n'excède pas quelques centaines de nm (voir 4.4.2).

Les cartographies réalisées lors de cette expérience peuvent ensuite être exploitées pour des simulations détaillées de dépôt de dose à l'échelle cellulaire. En effet, la concentration de fer en chaque "point" de la cellule est précisément quantifiable. Idéalement, connaître la répartition en trois dimensions du fer dans la cellule permettrait de réaliser des simulations encore plus représentatives. Le passage d'une cartographie en 2D à une cartographie en 3D (*via* une tomographie) a été tentée en collaboration avec R. Tucoulou et S. Bohic (ID-16, ESRF) en fixant les cellules chargées en fer sur des pointes. Cependant, la dose déposée dans la cellule lors de l'imagerie a endommagé l'échantillon et la reconstruction de l'image en 3D s'est révélée impossible.

Parmi les vésicules du cytoplasme dans lesquels les NPs Fe peuvent potentiellement être accumulés, les lysosomes constituent une hypothèse de choix (voir section **??**). Les lysosomes sont des organites cellulaires du cytoplasme mesurant plusieurs dixièmes de microns. Ils permettent à la cellule de "digérer" de nombreux types de molécules grâce aux enzymes qu'ils renferment. Il serait intéressant de déterminer si les lysosomes et les vésicules contenant le fer sont confondus : ceci peut

être réalisé grâce à des marqueurs comme le *lysotracker* par exemple. Connaître le devenir des NPs Fe dans les cellules permettrait d'aider à la caractérisation des mécanismes en jeu et à une meilleure compréhension du métabolisme des cellules associé à la présence de fer. Dans un second temps, il peut être intéressant de modifier chimiquement la surface des NPs Fe de façon à cibler une manière d'entrer dans la cellule pour contrôler la distribution des NPs Fe dans la cellule.

6.3.3 Radiosensibilisation des NPs Fe ?

Sur les films en *live imaging*, les cellules F98 exposées aux NPs Fe ne semblent pas affectées par la présence des nanoparticules dans leur milieu. Cette constatation rejoint les mesures de toxicité de J.K. Kim *et al.* selon lesquelles l'exposition des cellules aux NPs Fe à des concentrations inférieures à 2 mg(Fe)/mL n'aurait pas d'impact visible sur les cellules [Choi 12a].

Cependant, l'observation au microscope optique des coupes de cellules F98 montre que les cellules sont déformées et vacuolées suite à l'internalisation des NPs Fe. Certaines possèdent une morphologie rappelant l'apoptose. Ces observations peuvent être reliées aux travaux de Mahmoudi *et al.* : ils rapportent la formation de vésicules de gaz après exposition de cellules tumorales L929 à des NPs d'oxyde de fer non *coatées* [Mahm 10]. Ils déduisent d'expériences additionnelles que la présence de NPs Fe dans le milieu de culture altère les fonctions de certaines protéines, change l'équilibre ionique dans les cellules et cause le détachement des cellules en culture.

Ces observations ouvrent donc le questionnement sur les possibles conséquences toxiques d'une exposition des cellules à de telles concentrations et de l'internalisation de quantités conséquentes de NPs Fe.

6.3.3.1 La présence de fer bloque-t-elle la prolifération des cellules ?

La figure 6.10 montre les résultats d'un comptage de cellules dans des flasques (expérience réalisée en triplicat) après incubation ou non des cellules F98 avec des NPs Fe coréennes pendant 24h. Deux conditions de concentration de NPs Fe dans le milieu de culture ont été testées : 0.02 et 0.06 mg/mL.

Les cellules exposées aux NPs Fe pendant 24h sont moins nombreuses que les cellules témoins. Ce phénomène est d'autant plus important que la concentration en NPs Fe dans le milieu de culture est élevée : il y a 26 $\pm$ 14 % de cellules en moins lorsqu'elles sont exposées à 0.06 mg(Fe)/mL pendant 24h, et 49 $\pm$ 11 % de cellules en moins lorsqu'elles sont exposées à 0.15 mg(Fe)/mL. Cette différence par rapport aux cellules contrôle est significative pour les deux conditions d'exposition (test de Student, $p<0.01$).

Cependant, le nombre de cellules après l'expérience reste supérieur au nombre de cellules initialement ensemencé pour toutes les conditions. Il est donc possible que les cellules se soient arrêtées dans une des phases du cycle et/ou qu'elles aient été dans l'incapacité de se diviser. Dans leurs travaux, Soenen et collaborateurs montrent que l'exposition de cellules endothéliales et progéniteurs neuronaux à des NPs d'oxyde de fer diminue la prolifération en interférant notamment avec le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules [Soen 10]. Cet effet est d'autant plus visible que la masse de fer internalisée est élevée. Des doses non toxiques de NPs Fe peuvent donc causer un stress cellulaire affectant le métabolisme de la cellule sans la tuer.

La comparaison de ces données à celles obtenues avec les NPs FerInject indiquent que le FerInject n'a pas d'impact sur la prolifération des F98 et des 9L, même à des concentrations bien supérieures

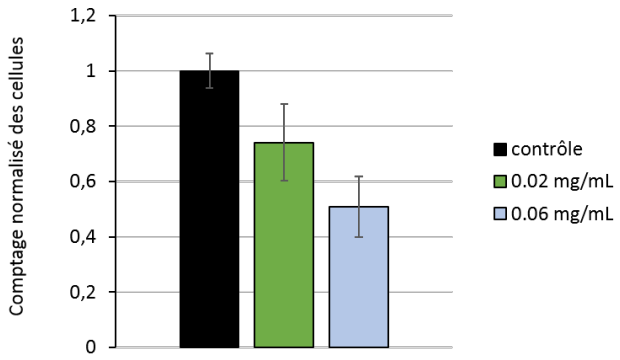


Figure 6.10 – *Comptage du nombre de cellules F98 par flasque après exposition pendant 24 h aux NPs Fe coréennes soniquées (N=3). Concentrations : 0.02 et 0.06 mg(Fe)/mL.*

à celles utilisées avec les NPs Fe coréennes (Fig. 6.14 (A) ; l'axe des ordonnées commence à 50%). D'une part, nous avons observé précédemment que la masse de fer internalisée par les cellules lors d'une exposition des F98 au FerInject est inférieure d'un à deux ordres de grandeur à la masse de fer internalisée lors d'une exposition aux NPs Fe coréennes. La toxicité qui en résulte est donc probablement moindre. De plus, le FerInject bénéficie d'une AMM : nous pouvons donc nous attendre à ce que ces NPs Fe ne soient pas toxiques aux concentrations utilisées lors de l'injection en intraveineuse (50 mg(Fe)/mL).

6.3.3.2 Blocage en phase S des cellules exposées

L'analyse du cycle cellulaire des F98 exposées aux NPs Fe coréennes montre un blocage des cellules dans le cycle, probablement en phase S, et l'entraînement de la mort cellulaire (apparition d'une composante de corps apoptotiques). Les "*checkpoints*" du cycle cellulaire les plus connus sont les *checkpoints* G1/S et G2/M (voir 1.3.4.1). En comparaison de ces deux *checkpoints* remarquables, les biologistes n'attribuaient qu'un rôle mineur au *checkpoint* de la phase S du fait de l'observation moins fréquente d'arrêts cellulaires en phase S [Hout 06].

L'avancée des recherches sur le *checkpoint* de la phase S a permis de prouver que celui-ci comprenait en réalité trois *checkpoints* distincts [Bart 04] :

- le *checkpoint* de réplication est déclenché lorsque la réplication de l'ADN se retrouve bloquée en réponse à un stress (inhibition des ADN-polymérases, sections lésées de l'ADN, ...)
- le *checkpoint* S-M est lui aussi dépendant du déroulement de la réplication de l'ADN. Il assure que la cellule n'entre pas en phase de division si l'ADN répliqué n'est pas parfaitement conforme. Une cellule ne validant pas le *checkpoint* S-M entre dans le processus de la catastrophe mitotique.
- le *checkpoint* intra-phase S ne dépend pas du déroulement de la réplication de l'ADN. Il est initié lorsque des cassures double brin sont détectées en dehors des zones en cours de réplication.

Il est intéressant de remarquer qu'aucun des *checkpoints* de la phase S ne nécessite le fonctionnement de la protéine p53. Cette protéine, considérée comme une "gardienne de l'intégrité du génôme" [Sena 06], est capable de se lier à l'ADN et d'activer des protéines responsables de l'arrêt du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN ou encore la mort programmée des cellules. En d'autres termes, p53 demande l'arrêt du cycle en cas de dommages à l'ADN, puis déclenche l'apoptose si les lésions

ne sont pas réparables. La p53 est mutée dans la majorité des cancers humains, qui esquivent ainsi la mort cellulaire malgré la non conformité de leur ADN. La protéine p53 est aussi mutée pour la lignée cellulaire F98 [Sena 06]. Un blocage des cellules en phase S serait donc un autre moyen de déclencher la mort cellulaire de ces cellules résistantes.

Référence	Type cellulaire	Composé	Observation	Processus et acteurs probablement en cause
Ge 2016	cellules cancéreuses du sein	bergaptol	arrêt du cycle en phase S, apoptose	mitochondries
Guo 2013	cellules cancéreuses de la prostate	triptolide	arrêt du cycle en phase S, apoptose	cycline D1, protéines pro-apoptotiques
Joe 2002	lignées cellulaires cancéreuses humaines	resveratrol	arrêt du cycle en phase S, apoptose	cyclines A, B1 et D1
Lange 2008	cellules cancéreuses ovariennes	*iron(III)-salophene*	arrêt du cycle en phase S, apoptose	voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose
Preya 2017	cellules cancéreuses ovariennes	α-terthienylmethanol	arrêt du cycle en phase S	stress ROS, dommages à l'ADN, cycline A
Salehi 2017	cellules cancéreuses du sein	chitosan	arrêt du cycle en phase S, apoptose	ROS, oxydation de l'ADN, mitochondries
Wei 2012	cellules cancéreuses rénales	tanshinone IIA	arrêt du cycle en phase S, apoptose	p53, p21, mitochondries
Zhong 2016	cellules cancéreuses colorectales	protocatechualdehyde	arrêt du cycle en phase S, apoptose	cyclines A, D1 et $p27^{KIP1}$, CDK2, mitochondries

Figure 6.11 – *Synthèse bibliographique d'articles traitant de l'arrêt en phase S. Les références sont, dans l'ordre alphabétique : [Ge 16, Guo 14, Joe 02, Lang 08, Prey 17, Sale 17, Wei 12, Zhon 16].*

Plusieurs articles issus de la littérature traitant de l'arrêt en phase S sont répertoriés dans le tableau de la figure 6.11. Parmi les articles étudiés, la plupart concernent l'arrêt en phase S de cellules cancéreuses causé par des traitements chimiothérapeutiques. Cet arrêt en phase S est presque systématiquement accompagné par le déclenchement de l'apoptose. D'autre part, certaines études lient cet arrêt en phase S à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Le blocage des cellules dans une phase du cycle peut être bénéfique ou néfaste du point de vue thérapeutique lorsque les cellules sont irradiées. Les cellules sont en effet plus ou moins résistantes au traitement selon la phase du cycle dans laquelle elles se trouvent lors de l'irradiation (cf 1.3.4.1). Le blocage des cellules en phase S causé par la présence des NPs Fe n'est pas avantageux dans le cadre de notre étude : les cellules bloquées en S sont plus résistantes à l'irradiation.

6.3.3.3 Origine de la toxicité engendrée : une augmentation de la production de ROS dans les cellules ?

Anne-Laure Bulin (EA 7442, Grenoble) et Jean-Luc Ravanat (CIBEST, CEA, Grenoble) ont exposé de l'ADN aux NPs Fe coréennes, puis les échantillons ont été irradiés sur la ligne ID-17 à 50 keV ou 80 keV (dose : 50 Gy). Les taux de 8-oxo-dG [1] ont été mesurés par HPLC-MS/MS. Les analyses ont montré des taux de 8-oxo-dG élevés pour une exposition de l'ADN à 1 mg(Fe)/mL, même pour les contrôles non irradiés (0 Gy : 1.35 ± 0.07 % dGuo ; 80 keV, 50 Gy : 3.12 ± 0.16 % dGuo ; données non montrées), signe que les NPs Fe génèrent un stress oxydatif par leur seule présence à cette concentration. En effet, les taux de 8-oxo-dG générés de manière endogène

1. La 8-oxo-dG, ou 8-oxo-2'-désoxyguanosine, est le résultat de l'oxydation de la désoxyguanosine (guanine liée à un sucre désoxyribose).

dépendent du type cellulaire mais sont de l'ordre de 0.5 8-oxo-dG pour 1.10^6 bases normales par cellule.

Discussion : régulation du fer dans les cellules et NPs Fe Le fer a un rôle critique dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont la synthèse de l'ADN, le fonctionnement des mitochondries ou encore le transport de l'oxygène. Une fois internalisé par la cellule et dissocié de la molécule de transport (la transferrine), le fer provenant du sang se retrouve dans le cytoplasme sous forme Fe^{2+}. Le fer libre étant extrêmement réactif et pouvant engendrer une toxicité, il est donc aussitôt pris en charge par la cellule : il peut être dirigé vers la mitochondrie pour y être métabolisé (synthèse de l'hème), être inclu dans des protéines Fer-Soufre ou être fixé à la ferritine sous forme Fe^{3+} pour stockage.

Le pool d'ions libres Fe^{2+} reste donc très limité. Il est régulé avec précision pour maintenir l'homéostasie et prévenir un excès de fer libre. La cellule possède un système de régulation propre au fer : le système de régulation IRP (*Iron Response Protein*) / IRE (*Iron Response Element*). L'IRE est une séquence de nucléotides particulière présente dans l'ARNm de certaines protéines jouant un rôle dans la régulation du fer. L'IRP est, schématiquement, une protéine capable de reconnaître et de se fixer sur la séquence IRE. Selon la position de la séquence IRE sur l'ARNm, l'arrimage d'une protéine IRP à l'IRE aura un rôle inhibiteur ou promoteur de la traduction de l'ARNm. D'autre part, la fixation de fer sur l'IRP empêche cette protéine de s'attacher à l'IRE.

Par exemple, si le pool d'ions libres est insuffisant, l'IRP se fixe sur l'ARNm de la ferritine, inhibant sa traduction. Le stockage du fer par la cellule est donc momentanément stoppé. Lorsque le pool d'ions libres revient dans la norme, le fer se fixe sur l'IRP. Celle-ci ne peut donc plus s'arrimer sur l'IRE de l'ARNm de la ferritine. La protéine est donc synthétisée et le stockage du fer reprend son cours [Wang 11].

Lorsque la cellule internalise des NPs Fe, celles-ci peuvent se dégrader et relâcher des ions libres. Si la cellule ne réagit pas assez rapidement en synthétisant de la ferritine pour "inactiver" et stocker ce fer en excès, ces ions libres peuvent réagir et mener à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [Klei 12a]. La réaction d'Haber-Weiss (6.3) est une réaction chimique entre l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène dont le produit est le radical hydroxyle très réactif. En conditions biologiques normales, cette réaction est très lente. Cependant, le fer peut catalyser cette réaction *via* la réaction de Fenton (6.2) montrée dans les équations ci-après. Ce mécanisme est considéré aujourd'hui comme étant le principal mode de production des radicaux libres dans les systèmes biologiques [Haus 16].

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \tag{6.1}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH \tag{6.2}$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + {}^{\bullet}OH \tag{6.3}$$

Le processus de libération du fer par dégradation des NPs Fe se déroulerait principalement dans les lysosomes [Hohn 13]. Les ions ainsi relachés peuvent potentiellement traverser les membranes nucléaires et mitochondriales, réagir avec le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène produits par la mitochondrie et produire des radicaux hydroxyles. Par ailleurs, les études de Petters ont prouvé que la neutralisation du pH des lysosomes entravait la production de ROS et la toxicité provenant de l'internalisation des NPs Fe par la microglie [Pett 16]. En plus de la production d'ions libres

réactifs, les NPs Fe seraient capables d'induire la production de ROS en catalysant des réactions enzymatiques *via* les ions à leur surface [Voin 11].

Les radicaux hydroxyles ainsi produits vont endommager l'ADN, les protéines, les glucides et les lipides [Sing 10, Yarj 17]. Le fonctionnement de la mitochondrie peut en être perturbé et mener à la production de composés cytotoxiques (*e.g.* libération du cytochrome c). Si la présence des NPs Fe n'est pas nécessairement létale pour la cellule, elle peut engendrer des dysfonctionnements dont la modulation du cytosquelette d'actine, la condensation des chromosomes, l'altération de l'expression des gènes, la perturbation de l'homéostasie du fer ou l'arrêt du cycle cellulaire (Fig. 6.12).

Ces capacités de catalyse accrues peuvent donc avoir des effets délétères en cas de stress déjà installé dans les cellules : par exemple, les NPs Fe sensibilisent les cellules H9c2 au stress produit par l'acroléine (un des irritants présents dans la fumée de cigarette) [Luo 15]. Certaines études détournent ces effets nuisibles au profit de solutions thérapeutiques contre le cancer : l'induction de ROS par le médicament β-lapachone peut être renforcée par la libération de NPs Fe dans les cellules tumorales, produisant ainsi un effet "synergique" toxique pour ces cellules [Huan 13].

Conclusion : dans notre cas, ces informations indiquent que nous pouvons nous attendre à un effet biologique additionnel à l'augmentation de dose physique provoquée par l'émission d'électrons secondaires lors de l'irradiation. Nous parlerons alors plutôt de "radiosensiblisation" pour définir ce procédé biologique.

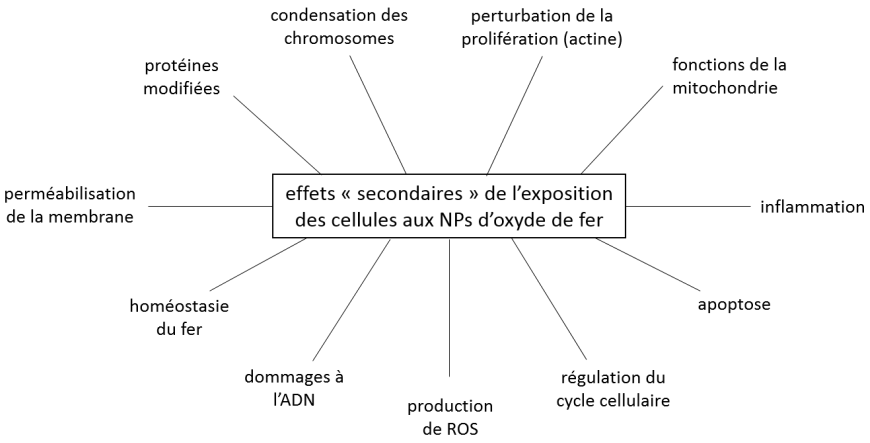


Figure 6.12 – *Quelques conséquences possibles de l'exposition des NPs d'oxyde de fer sur les cellules. D'après [Sing 10, Hohn 13, Haus 16, Yarj 17].*

6.3.4 Externalisation des nanoparticules ?

Il serait intéressant de savoir si, une fois chargées en fer, les cellules sont capables d'externaliser les NPs. Si le fer reste capturé par les cellules, cela peut être bénéfique dans le cadre d'une thérapie fractionnée. Si, au contraire, il est relaché rapidement, cette dynamique doit être prise en compte pour contrôler au mieux la concentration de NPs Fe dans la tumeur lors de l'irradiation.

Le suivi des cellules au microscope après internalisation des NPs Fe pendant 24 h permet déjà de donner quelques indices visuels. La figure 6.13 montre le suivi sur sept jours de ces cellules une fois ré-ensemencées dans du milieu complet (à noter que, pour des raisons pratiques, les cellules ont été trypsinées à J+1 et J+6). Les cellules ont été exposées aux NPs Fe coréennes à J-1, pendant

24 h. Elles ont été rincées à J_0 et remises en culture dans du milieu complet.

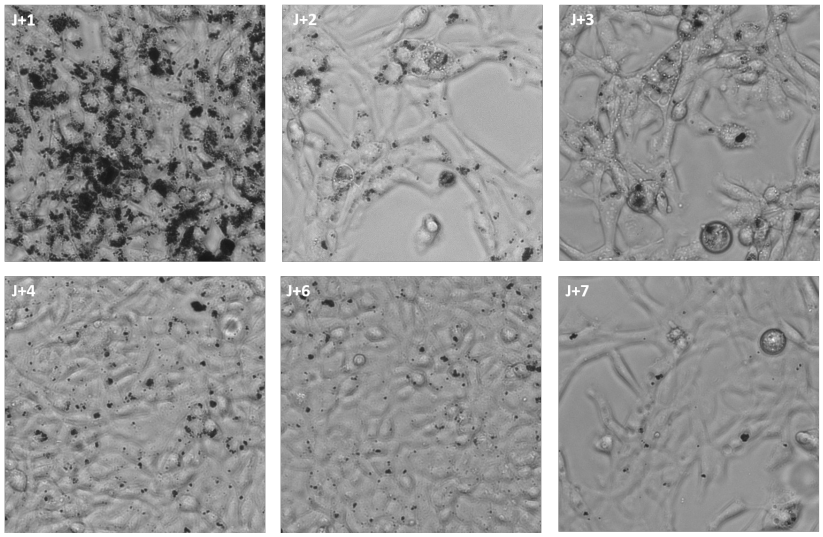


Figure 6.13 – *Observation de cellules F98 au microscope optique après exposition pendant 24 h aux NPs Fe coréennes et réensemencement dans des flasques de culture. Concentration : 0.06 mg(Fe)/mL. Les cellules ont été trypsinées à J+1. Faire en J+6.*

Selon ces images, les cellules continuent leur prolifération "normalement". La masse de fer par cellule semble diminuer au fil du temps : les NPs Fe peuvent être partagées entre les deux cellules filles ou éliminées pendant le métabolisme. En reliant ces observations aux études précédentes, nous pouvons donc imaginer la dynamique suivante : une fois mises en contact avec les NPs Fe, les cellules en internalisent un nombre conséquent, ce qui provoque l'arrêt en phase S voire l'entrée en apoptose. Par contre, une fois remises dans un environnement libre de toute NP, les cellules ont toujours un stock de fer conséquent mais celui-ci ne semble plus leur être toxique. *Pourquoi ce fer intracellulaire est-il toxique lorsque les cellules sont exposées aux NPs en solution, mais pas lorsque les cellules sont remises dans le milieu propre ?* Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une fois remises en culture, les cellules ont pu synthétiser assez de ferritine pour neutraliser le fer accumulé. Lors de l'exposition pendant 24h aux NPs Fe, les cellules ne sont peut être pas assez réactives pour produire la ferritine au même rythme que l'internalisation des NPs Fe.

6.3.5 Etude comparative : influence des agents de contraste au Gd sur les cellules de gliome de rat

Ces études ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec Rachel Delorme (CNRS, Grenoble). Elles sont présentées succinctement à la suite à titre de comparaison avec le fer.

6.3.5.1 Prolifération des cellules

Des cellules de gliome F98 et 9L sont exposées pendant 24h aux agents de contraste Magnevist et Dotarem (concentration : 5 mg(Gd)/mL). Le nombre de cellules par flasque (N=3) est ensuite compté. Nous pouvons observer que, pour une concentration d'exposition aux AC Gd de 5 mg(Gd)/mL, il y a 19 ± 13 % de cellules en moins lorsqu'elles sont exposées au Dotarem et 68 ± 8

% de cellules en moins lorsqu'elles sont exposées au Magnevist (Fig. 6.14 (B)). Le Magnevist étant un agent linéaire, il relâche potentiellement plus facilement l'ion Gd que le Dotarem, provoquant une cytotoxicité. Ce phénomène pourrait expliquer l'impact significatif (test de Student, p=0.019) du Magnevist sur la prolifération cellulaire après une exposition des cellules à 5 mg(Gd)/mL pendant 24 h, alors que cet impact n'est pas significatif (test t de Student, p=0.255) pour le Dotarem avec les mêmes conditions. L'AMM du Magnevist a par ailleurs été récemment retirée (source : Haute Autorité de Santé).

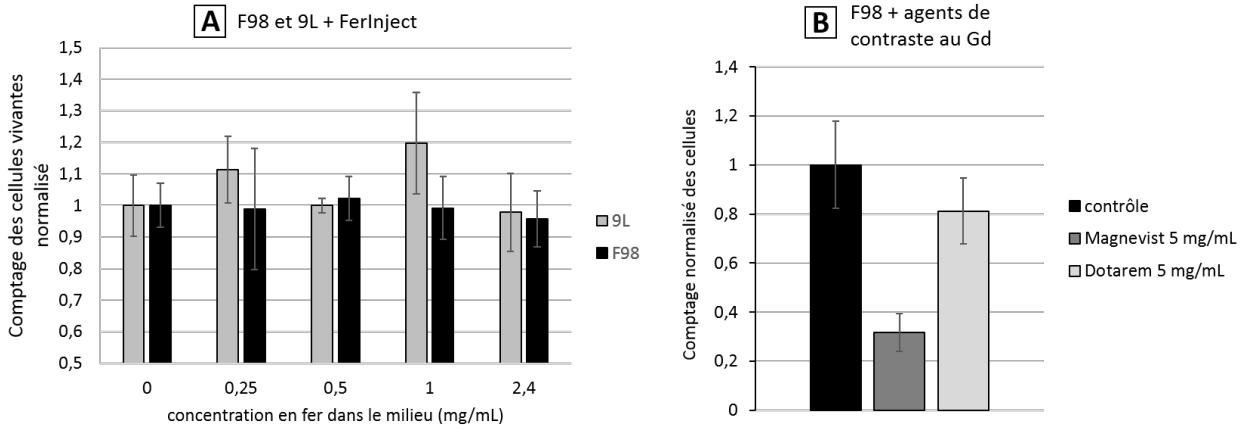


Figure 6.14 – *(A) Prolifération des F98 et 9L suite à l'exposition pendant 24 h aux NPs FerInject pour différentes concentrations (mesures en triplicat). (B) Comptage du nombre de cellules F98 par flasque après exposition pendant 24 h aux agents de contraste Magnevist et Dotarem (N=3). Concentration : 5 mg(Gd)/mL.*

6.3.5.2 Masses de Gd internalisée par les cellules de gliome après exposition aux agents de contraste

La figure 6.15 représente la masse de Gd internalisée par les cellules F98 lorsqu'elles sont exposées à deux types d'agents de contraste au Gd : le Magnevist et le Dotarem.

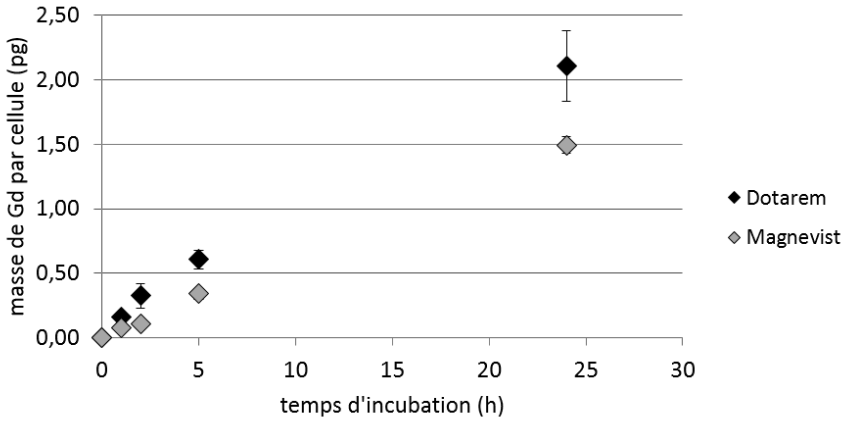


Figure 6.15 – *Masse de Gd internalisée par les cellules F98 après exposition aux agents de contraste au Gd Magnevist et Dotarem (10 mg(Gd)/mL) pendant différentes durées (mesures ICP-MS, triplicats).*

La masse de Gd accumulée dans les cellules F98 est bien moindre comparée aux masses de fer accumulées dans les cellules des études précédentes. Les cellules exposées à 10 mg(Gd)/mL internalisent 1.49 ± 0.06 pg(Gd)/cellule après 24h d'incubation pour le Magnevist et 2.10 ± 0.27 pg(Gd)/cellule pour le Dotarem. Si l'on compare avec la littérature, les ordres de grandeur sont similaires à nos résultats : l'équipe de De Stasio mesure environ 4 pg par cellule de gliome humain après 24h d'incubation avec un agent Gd-DTPA (donc similaire au Magnevist) [De S 01]. L'équipe de Peters, elle, trouve des valeurs inférieures aux nôtres : environ 0.25 pg(Gd)/cellule pour une exposition de 24 h au Magnevist à 0.9 mg/mL [Pete 15].

La courbe semble suggérer que le plateau n'est toujours pas atteint à 24 h : de plus longues durées d'exposition au Gd sont parfois étudiées, comme 48 h ou 72 h [Pete 15, De S 01]. **Cependant, il est complexe de dire quelle durée d'incubation et quelle concentration est pertinente du point de vue des conditions *in vivo*.** Ce questionnement est aussi valable pour le fer. Est-il réaliste de considérer que les NPs Fe vont rester accumulées dans la tumeur aux concentrations étudiées ? Est-ce qu'un gliome peut vraiment retenir les AC Gd pendant 48 ou 72 h ? Il s'agit, lors des expériences *in vitro*, de trouver un compromis permettant d'être réaliste par rapport aux aspects cliniques tout en travaillant dans des conditions permettant d'étudier les phénomènes en observant de vrais effets bien mesurables afin d'optimiser les paramètres. Pour construire un modèle *in vitro* réaliste par rapport aux conditions *in vivo*, il faudrait réaliser des études pharmacocinétiques de nos particules afin de connaître les vrais ordres de grandeur de durée d'accumulation et de concentration moyenne atteinte.

D'autre part, l'effet physique attendu avec le Gd est plus important que celui attendu avec le fer pour des concentrations identiques. Pour une irradiation à 80 keV, un DEF de 1.57 est atteint pour une concentration de 5 mg/mL en Gd (ce qui correspond à l'internalisation de 5 pg de Gd par cellule). Pour atteindre le même DEF avec du fer, il faudrait que les cellules accumulent environ 37 pg(Fe)/cellule (*cf* 7.3.5.1, concentration intracellulaire de 37 mg(Fe)/mL).

6.3.5.3 Distribution des Agents de Contraste au Gd dans les cellules de gliome F98

Des cellules F98 ont été exposées à deux agents de contraste (Magnevist et Dotarem) selon plusieurs conditions. Deux concentrations principales ont été étudiées : l'une représentative des concentrations qu'il est possible d'obtenir dans les tissus d'un être vivant et l'autre, plus grande, permettant d'étudier le potentiel des Gd AC pour augmenter le dépôt de dose dans les tumeurs. Les cellules ont été cultivées sur des membranes comme décrit précédemment (pour le protocole détaillé : B.5.1), puis fixées par cryogénisation. Ce protocole de fixation permet de préserver au maximum les membranes et d'éviter la fuite des éléments lors du temps d'attente de la fixation chimique.

Plusieurs conditions ont été étudiées :

- 0.5 mg(Gd)/mL et une incubation de 48h, plus proche des conditions *in vivo*,
- 5 mg(Gd)/mL et une incubation de 24h, plus proche de conditions "optimales" permettant d'observer un effet bénéfique des Gd AC après irradiation,
- 10 mg(Gd)/mL et une incubation de 48h, réalisée seulement avec le Dotarem, car cette condition s'est révélée trop toxique avec le Magnevist.

La figure 6.16 représente quelques images caractéristiques obtenues lors de cette expérience. La distribution du soufre, en vert, permet de délimiter la forme de la cellule. L'observation de vésicules contenant du Gd (en rouge) pour la condition 5 mg(Gd)/mL - 24h et même 0.5 mg(Gd)/mL est

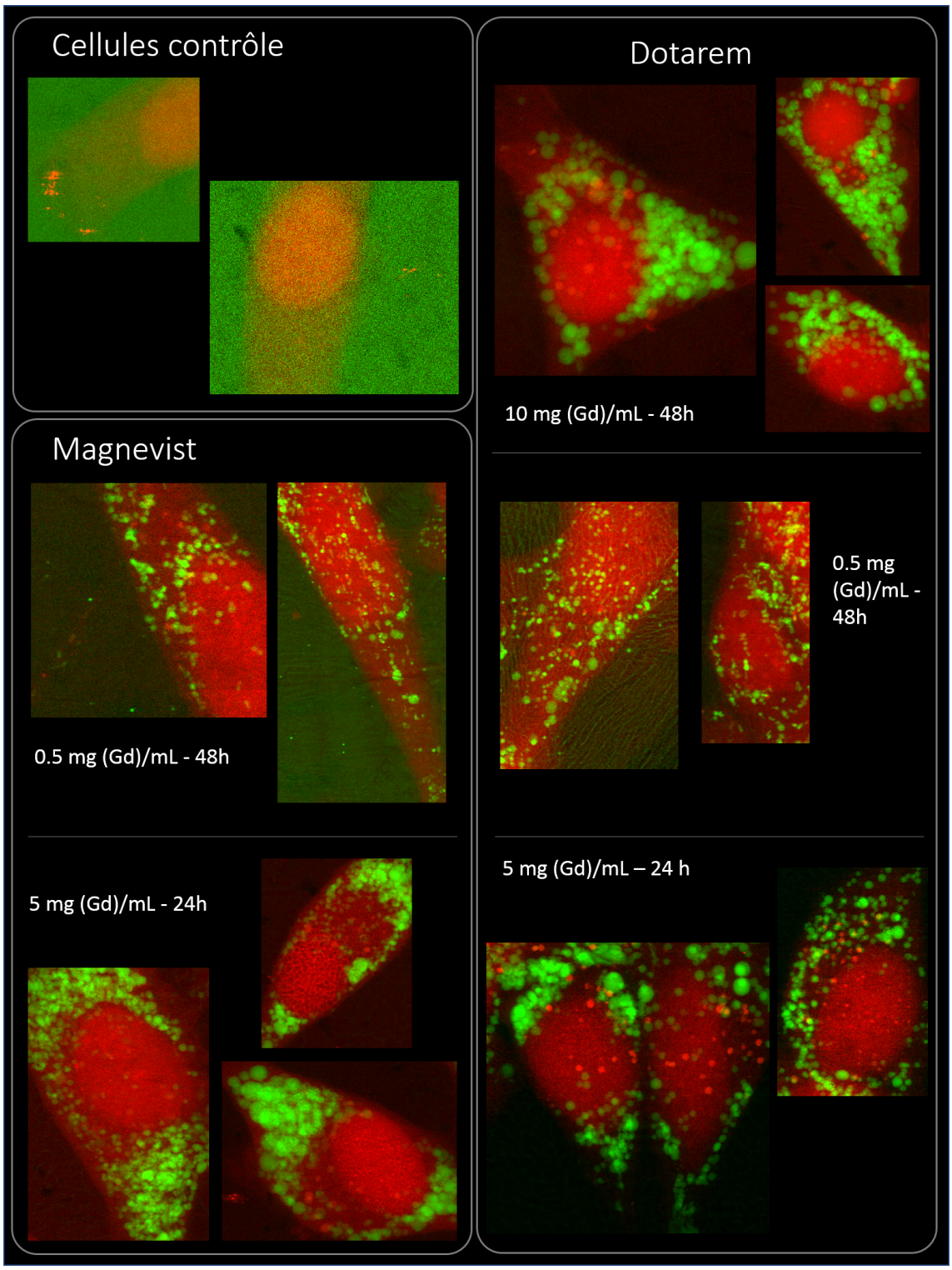


Figure 6.16 – *Cartes caractéristiques de cellules F98 après exposition pendant 24 h aux agents de contraste au Gd Magnevist (0.5 mg(Gd)/mL, 48 h d'incubation et 5 mg(Gd)/mL, 24 h d'incubation) ou Dotarem (0.5 mg(Gd)/mL, 48 h d'incubation ; 5 mg(Gd)/mL, 24 h d'incubation ; 10 mg(Gd)/mL, 48 h d'incubation). Ces cartes ont été obtenues par SR-XRF sur ID-16 (ESRF, Grenoble). Les différentes cartes n'ont pas la même échelle : l'objectif de cette figure est de montrer la distribution intracellulaire du Gd pour plusieurs conditions d'exposition. [Vert] : soufre. [Rouge] : gadolinium. L'échelle de couleur est différente selon les conditions, de manière à rendre visibles les vésicules remplies de Gd dans les cellules exposées aux plus basses concentrations.*

encourageante de notre point de vue, car cela signifie que les cellules internalisent du Gd en quantités suffisantes pour être détectées. Cependant, les agents peuvent être internalisés rapidement mais aussi très rapidement externalisés, ce qu'il faudra prendre en compte lors du passage éventuel au stade préclinique. D'un point de vue clinique, le fait que les Gd AC soient autant internalisé dans les cellules n'a, à notre connaissance, que peu été mis en valeur. Cela peut soulever un questionnement quant à la toxicité que ce phénomène peut engendrer. Cependant, il s'agit là de conditions peu représentatives que ce qui a lieu dans les tissus d'un organisme. Il est possible que les Gd AC soient aussi très rapidement externalisés des cellules.

Nos observations ne nous ont pas permis de constater la présence de Gd dans le noyau des cellules. Il est possible que, si de faibles quantités de Gd ont effectivement pénétré dans le noyau, celles-ci ne soient pas détectables. L'accumulation de Gd dans le noyau des cellules tumorales permettrait d'augmenter les dégâts à l'ADN lors de la radiothérapie grâce aux électrons Auger. A cette fin, Crossley *et al.* ont développé un complexe Pt-Gd ayant la caractéristique de s'accumuler à l'intérieur du noyau des cellules [Cros 10].

Comme expliqué précédemment (section B.5.1), il est possible de remonter à la masse de Gd internalisée dans chaque cellule grâce aux cartographies réalisées sur ID-16. Les résultats sont présentés dans la figure 6.17 (A). Nous remarquons que les masses de Gd par cellule sont supérieures à celles mesurées par ICP-MS, même si elles restent du même ordre de grandeur : les F98 exposées à 10 mg(Gd)/mL de Dotarem pendant 24h accumulent 2.10 ± 0.27 pg(Gd)/cellule selon les mesures ICP-MS et 3.87 ± 1.68 pg(Gd)/cellule selon les mesures ID-16. Lors de la réalisation des échantillons ICP-MS, les étapes, bien que rapides, peuvent laisser aux molécules d'AC le temps de d'être externalisées des cellules. Cependant, dans les cas des expériences sur ID-16, les cellules ont été congelées : le temps d'attente est négligeable et les membranes sont préservées, limitant ainsi les risques que les molécules de Gd AC s'échappent des cellules.

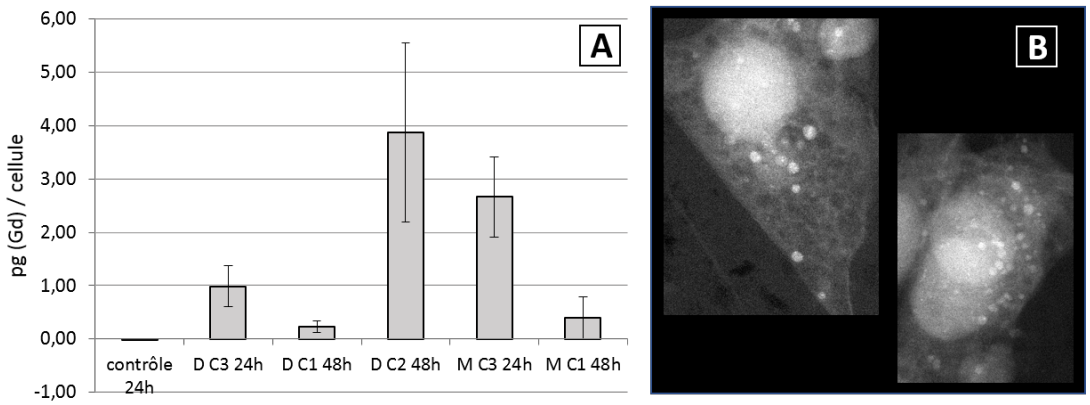


Figure 6.17 – *(A) Masse de Gadolinium intracellulaire mesurée par analyse ImageJ des images obtenues sur ID-16 par fluorescence X. Des F98 ont été exposées pendant 24 h ou 48 h à différentes concentrations de Dotarem (D) ou de Magnevist (M) : C1 = 0.5 mg/mL, C2 = 10 mg/mL et C3 = 5 mg/mL. (B) Cartographies de la répartition du Zinc réalisées par fluorescence X sur ID-16, pour ces cellules F98 exposées à 10 mg/mL de Dotarem pendant 48h.*

De plus, l'observation des cartographies de distribution du zinc indique la présence de vésicules de Zn présents dans le cytoplasme, et ne colocalisant pas avec les vésicules dans lesquels le Gd s'est accumulé (cf Fig. 6.17). Il ne s'agit donc probablement pas d'un artéfact. De tels vésicules de Zn sont parfois décrits dans la littérature sous le nom de "zincosomes". En remontant à la masse de

Zn par cellule, on ne mesure pas plus de Zn dans les cellules pour lesquelles les zincosomes ont été observés. Peut-être s'agit-il d'une variation massique de Zn trop faible pour pouvoir être détectée, ou simplement d'une répartition différente du zinc dans la cellule.

D'après la littérature, la formation de zincosomes pourrait être le signe d'un stress cellulaire. Haase *et al.* montrent en 2002 que la répartition du zinc dans la cellule est due à un effet biologique réel et non pas à une erreur de mesure [Haas 02]. Ils suspectent alors un rôle du zinc dans l'apoptose. Chai et collaborateurs précisent que le zinc aurait un rôle de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Il permettrait de protéger les acides nucléiques et les protéines de l'oxydation et sa présence impacterait la sensibilité d'une cellule face à certaines toxines [Chai 99]. Enfin, selon [Eide 06], la plupart du Zn dans la cellule serait lié à des protéines, formant le "proteome de Zn". Pour c'est le cas pour le fer, les cellules possèderaient très peu de Zn "libre" : la cellule contrôlerait très précisément ce *pool* de zinc, étant en constant réajustement des concentrations. Le zinc serait alors libéré à des moments stratégiques pour jouer son rôle de détoxification.

6.4 Le Chapitre 6 en quelques mots

Les études présentées dans ce chapitre avaient pour objectif d'étudier les conséquences de l'exposition des cellules de gliome F98 non irradiées aux NPs Fe de l'équipe coréenne (sans irradiation). Après analyse des résultats, les points suivants ont pu être mis en évidence :

- Les cellules internalisent les NPs Fe dans des vésicules dans le cytoplasme. Lorsqu'elles sont exposées aux NPs Fe coréennes à 0.06 mg(Fe)/mL, les cellules accumulent 71 ± 22 pg(Fe)/cellule si les NPs ne sont pas soniquées, et 30 ± 2 pg(Fe)/cellule si elles le sont. Ces résultats sont encourageants, car une masse de fer de 100 pg/cellule correspond schématiquement à une concentration intracellulaire en fer de 100 mg/mL : le DEF théorique obtenu pour cette concentration est de 2.55 à 80 keV. D'autre part, le fait que les NPs soient directement localisées dans le cytoplasme constitue un avantage certain car les électrons Auger ont plus de probabilité d'atteindre les zones vitales de la cellule (*i.e.* ADN, mitochondries).
- L'étude du cycle cellulaire suggère que l'exposition des F98 aux NPs Fe de l'équipe coréenne induit un blocage des cellules en phase S, la phase la plus radiorésistante du cycle (part de cellules en phase S : 12.4 ± 0.8 % pour les cellules contrôle et 19.1 ± 2.4 % pour les cellules exposées à 0.06 mg(Fe)/mL). Ce blocage est aussi associé à l'augmentation de la composante de corps apoptotiques dans l'échantillon (0.28 ± 0.05 % pour les cellules contrôle, 14.8 ± 3.0 % pour les cellules exposées à 0.06 mg(Fe)/mL).
- Une fois remises en culture après 24h d'exposition aux NPs Fe, les cellules F98 se divisent normalement et partagent probablement les NPs entre les deux cellules filles.

La toxicité engendrée par les NPs Fe aux concentrations étudiées pourrait être provoquée par la dégradation des NPs dans les lysosomes, menant à la libération d'ions fer très réactifs. Ces ions (ainsi que la surface non coatées des particules) catalyseraient la réaction d'Haber-Weiss dont l'un des produits est le radical hydroxyle, source de stress oxydant et de lésions de l'ADN.

Chapitre 7

Augmentation de dose liée aux NPs Fe : résultats *in vitro*

Sommaire

7.1 Matériels et méthodes 162
7.1.1 Irradiation des cellules 162
7.1.2 Mesure de la survie cellulaire 163
7.2 Résultats : potentiel des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose lors d'une irradiation 169
7.2.1 Expérience 1 : test clonogénique et suivi MTT 169
7.2.2 Expérience 2 : test clonogénique et suivi MTT 172
7.3 Discussion 173
7.3.1 Dépendance du SER mesuré à l'énergie d'irradiation 173
7.3.2 Dépendance du SER mesuré à la concentration en NPs Fe dans le milieu de culture 175
7.3.3 Conséquences de l'internalisation des NPs Fe par les cellules : quel impact sur la survie cellulaire après irradiation ? 176
7.3.4 Influence du protocole d'irradiation : irradiation en plaques 179
7.3.5 Comparaison avec les simulations : du DEF au SER 181
7.3.6 Irradiation de cellules exposées aux agents de contraste au Gd : augmentation de dose ou radiosensibilisation ? 184
7.4 Importance de l'outil de mesure de la survie cellulaire 187
7.4.1 Test ATP-lite et suivi IncuCyte 187
7.4.2 Comparaison test clonogénique et MTT 187
7.4.3 Quels outils pour les NPs ? 192
7.5 Le Chapitre 7 en quelques mots 192

Objectif : étudier le potentiel des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose lors de l'irradiation de cellules de gliome

Les simulations du chapitre 4 ont permis de prouver théoriquement l'intérêt du fer pour augmenter le dépôt de dose lors d'une irradiation. L'influence de la concentration et de l'énergie d'irradiation y ont été étudiées, ainsi que les rayons d'action des électrons secondaires. Dans le chapitre précédent, une première étape *in vitro* a été réalisée : les NPs Fe ont été exposées aux cellules sans irradiation de manière à déterminer leur capacité à internaliser les NPs. Les conséquences de cette internalisation sur le métabolisme des cellules ont ensuite été questionnées. Au-delà d'une certaine concentration, les NPs Fe modifient le comportement des cellules F98. Leur capacité de prolifération est affectée et les cellules se retrouvent bloquées dans la phase S du cycle cellulaire. Une des raisons supposées serait la production d'espèces réactives de l'oxygène promue la dégradation des NPs Fe dans les cellules (réactions de Fenton et Haber-Weiss).

Ce chapitre présente les résultats de l'étude *in vitro* du potentiel des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose lors de l'irradiation de cellules de gliome. La dépendance de cet effet à l'énergie d'irradiation et à la concentration de NPs Fe sera étudiée et discutée. D'autre part, les méthodes de mesure de la survie cellulaire sera discutée, et plus particulièrement dans le cadre de l'utilisation de NPs.

7.1 Matériels et méthodes

Les NPs Fe coréennes sont présentées dans la section A.1.2 et caractérisées dans la section 5. Les agents de contraste au Gd (Dotarem et Magnevist) et les NPs Fe FerInject, pour lesquels les résultats seront présentés à titre comparatif, sont décrits dans la section A.3 et A.1.1 respectivement. Les NPs Fe de l'équipe coréenne ont été soniquées la veille des expériences pendant 15 min à 80 % (voir B.1.4).

Les cellules de gliome F98 sont décrites dans la section A.2.1 et les protocoles de culture cellulaire sont détaillés dans la section B.2.

7.1.1 Irradiation des cellules

La dosimétrie est réalisée avant l'irradiation des cellules et à chaque changement d'énergie. Pour cela, une sonde (PTW Semiflex ion chamber 31010 - 0.125 cm^3) est introduite dans le même support que celui qui contiendra les cellules. La mesure de la dose est effectuée dans l'air puis convertie dans l'eau et corrigée selon la pression et la température ambiante de la cabine expérimentale.

Les supports utilisés pour l'irradiation des cellules sont des tubes cryogéniques ou des plaques 96 puits inclinées (voir Fig. 7.1). Ces supports permettent l'irradiation des cellules dans leur milieu de culture malgré l'incidence horizontale du faisceau synchrotron qui complique l'irradiation de cellules en adhérence dans les flasques.

Irradiation des cellules en tubes cryogéniques : après incubation (ou non, pour les cellules contrôle) aux NPs Fe pendant 24h, les cellules sont rincées deux fois au PBS, trypsinées et comptées, puis resuspendues dans 1 mL de milieu complet dans des tubes cryogéniques. Elles sont aussitôt descendues dans la cabine de contrôle de la ligne ID-17 puis irradiées (ou non, pour les cellules contrôle) à l'énergie et selon la dose désirée. Les tubes sont irradiés avec la moitié de la dose, puis subissent une rotation de 180°avant d'être irradiés à nouveau avec la deuxième moitié de la dose.

Les tubes sont ensuite remontés dans le laboratoire de culture cellulaire pour la réalisation des tests de survie.

Remarque : les deux irradiations face à face ont pour but de compenser un peu l'atténuation du faisceau de 30 keV dans le milieu, bien que la rotation du tube n'implique pas réellement la rotation du milieu et des cellules qu'il contient.

Irradiation des cellules en plaques : Les cellules préalablement ensemencées dans des plaques 96 puits sont exposées pendant 24h (ou non, pour les cellules contrôle) aux NPs Fe. Le lendemain, les puits sont rincés deux fois au PBS et remplis avec du milieu de culture complet frais. Les cellules sont aussitôt amenées sur la ligne ID-17 pour irradiation (*set-up* présenté dans la figure 7.1). Une fois l'irradiation achevée, les plaques sont remontées et placées dans l'incubateur jusqu'à ce qu'elles soient utilisées pour les mesures de survie.

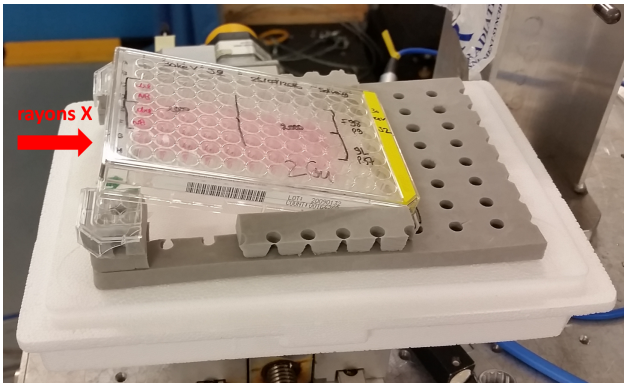


Figure 7.1 – *Set-up d'irradiation des plaques 96 puits sur la ligne ID-17 (SSRT).*

7.1.2 Mesure de la survie cellulaire

7.1.2.1 Survie et augmentation de dose : terminologies

Les terminologies peuvent parfois varier d'une publication à une autre et une même notation ne représente pas toujours la même grandeur. Pour plus de clarté, nous rappelons ici les grandeurs que nous allons utiliser et discuter par la suite.

Le DEF, facteur d'augmentation de la dose

Le DEF (pour *Dose Enhancement Factor*, ou Facteur d'Augmentation de Dose) ainsi nommé dans ces travaux est défini par l'équation suivante :

$$DEF = \frac{\text{dose déposée avec l'élément lourd}}{\text{dose déposée sans l'élément lourd}} \tag{7.1}$$

Il ne reflète donc que les phénomènes physiques mis en jeu : les photons X incidents interagissent avec les atomes d'élément lourd présents dans le milieu, produisant des électrons secondaires qui déposent une énergie supplémentaire dans le volume considéré. Un DEF supérieur à 1 indique donc que la présence de l'élément lourd dans le milieu contribue à augmenter la dose déposée dans le volume.

Le modèle Linéaire-Quadratique

La fraction de cellules survivantes à une irradiation varie selon la dose déposée : pour de faibles doses, les lésions sont peu nombreuses et réparables et la majorité des cellules survivent. Pour des doses plus élevées, le nombre de lésions augmente et les dommages se complexifient : la fraction de cellules survivantes diminue. L'étude de la survie cellulaire suite à l'irradiation aux rayons X donne une courbe usuellement ajustée avec une fonction linéaire quadratique (équation 7.2), illustrée dans l'exemple de la figure 7.2.

$$S = S_0 \cdot e^{-\alpha.D-\beta.D^2} \tag{7.2}$$

L'ajustement des données expérimentales à la fonction linéaire quadratique permet donc d'accéder à la valeur des deux paramètres α et β. Ces paramètres sont représentatifs de la sensibilité à l'irradiation de la lignée cellulaire étudiée :

- α, la tangente à l'origine, représente la contribution des lésions létales d'emblée, donc non réparables. La valeur d'α dépend donc de la lignée, mais aussi de nombreux paramètres biologiques et expérimentaux (*e.g.* phase du cycle, pH, oxygène, rayonnement).
- le paramètre β est corrélé aux lésions sub-létales, c'est-à-dire qui induiront la mort cellulaire sur un plus long terme suite à une réparation non conforme de la lésion.

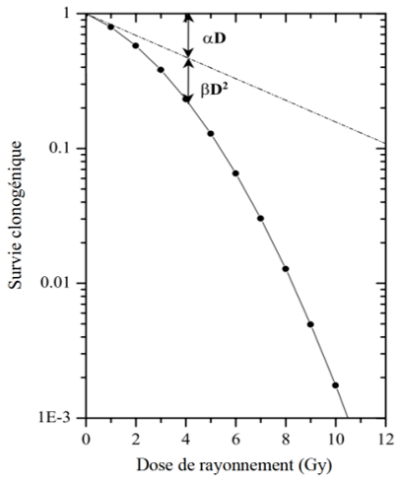


Figure 7.2 – *Exemple de courbe de survie cellulaire ajustée avec le modèle linéaire quadratique.*

Toutefois, les mécanismes physiques et biologiques responsables de la forme linéaire quadratique (LQ) de la courbe de survie ne sont pas entièrement compris. La fonction LQ doit donc seulement être considérée comme un outil permettant de comparer plusieurs expériences et son interprétation doit être faite avec prudence.

Survie cellulaire et SER

La survie cellulaire est mesurée en calculant le rapport du nombre de cellules "vivantes" sur le nombre total de cellules ayant subi le traitement. La définition d'une cellule "morte" dépend du protocole utilisé et sera précisée par la suite.

Le SER (pour *Sensitive Enhancement Ratio*, ou facteur d'augmentation de la sensibilité) est une grandeur mesurée suite aux expériences permettant de quantifier l'effet du traitement (irradiation en présence d'atomes lourds) par rapport aux cellules non traitées. A l'inverse du DEF qui ne reflète que la contribution des effets physiques, le SER reflète donc la contribution des effets physiques et des effets biologiques.

Dans la littérature, le SER est souvent calculé par rapport à un taux de survie donné (par exemple, 10%). Il est alors égal au rapport des doses nécessaires pour obtenir une survie similaire sans et avec la présence d'atomes lourds (cf eq. 7.3). La figure 7.3 illustre cette définition à l'aide des données de Laure Bobyk [Boby 10].

$$SER_{10\%} = \frac{\text{dose pour obtenir 10\% de survie normalisée } \textbf{sans} \text{ atomes lourds}}{\text{dose pour obtenir 10\% de survie normalisée } \textbf{avec} \text{ atomes lourds}} \tag{7.3}$$

Cependant, cette méthode de calcul nécessite de réaliser une mesure de la survie cellulaire pour plusieurs doses et ce, pour les cellules traitées et non traitées. Dans le but d'optimiser les temps de faisceau synchrotron, nous utiliserons une autre définition du SER, le SER_{4Gy}. Le SER_{4Gy} est défini par le rapport des survies sans et avec présence d'atomes lourds, pour un dépôt de dose de 4 Gy (sans prendre en compte les effets des atomes lourds) :

$$SER_{4Gy} = \frac{\text{survie normalisée à 4 Gy des cellules irradiées } \textbf{sans} \text{ atomes lourds}}{\text{survie normalisée à 4 Gy des cellules irradiées } \textbf{avec} \text{ atomes lourds}} \tag{7.4}$$

Un SER_{4Gy} supérieur à 1 indique une contribution des atomes lourds à l'augmentation de la mort cellulaire, tandis qu'un SER_{4Gy} inférieur à 1 indique un effet radioprotecteur des éléments lourds. La valeur intermédiaire de 4 Gy a été choisie car elle représente un bon compromis entre une faible dose (inférieure à 2 Gy) pour laquelle les réponses cellulaires à l'irradiation pour un même traitement sont trop disparates et une dose trop importante pour laquelle les effets de l'irradiation seule peut suffire à détruire les cellules.

Il est à noter que le SER ainsi calculé est un ratio entre les survies normalisées des cellules irradiées non traitées et traitées aux NPs. La survie des cellules irradiées et traitées est donc normalisée par la survie des cellules traitées et non irradiées. **La toxicité propre des NPs (sans irradiation) n'est donc pas prise en compte dans la valeur du SER.** D'autre part, la dose indiquée (4 Gy) est la dose déposée dans l'eau lors de l'expérience. Les cellules irradiées reçoivent donc 4 Gy lors de l'expérience, qu'elles soient traitées ou non aux NPs. Dans le cas des cellules traitées, la dose sera donc potentiellement renforcée par la présence des NPs.

Nous utiliserons donc pour la suite le terme de "SER" pour désigner le "SER_{4Gy}".

7.1.2.2 Le test de clonogénicité

La méthode la plus commune permettant de mesurer l'effet d'un traitement est le test de clonogénicité. Ce test est considéré comme étant le "gold standard" dans le domaine de par sa fiabilité et sa robustesse. Il s'agit, en quelque mots, d'ensemencer un faible nombre de cellules par boîte de Pétri après irradiation (par exemple 100 cellules), puis d'attendre que ces cellules se divisent et forment des colonies de cellules filles visibles à l'œil nu. Selon ce test, une cellule est considérée comme "morte" lorsqu'elle est dans l'incapacité de former une colonie supérieure à 50 cellules. La figure 7.4 donne l'exemple de deux boîtes de Pétri ayant reçu des cellules avec ou sans traitement.

Protocole : l'objectif étant d'obtenir une centaine de colonies par boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, entre 100 et 800 cellules sont ensemencées par boîte après traitement. Plusieurs réplicats sont réalisés pour une même condition : après irradiation des cellules, trois quantités différentes de cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri (dans nos expériences, il s'agissait de 200, 400

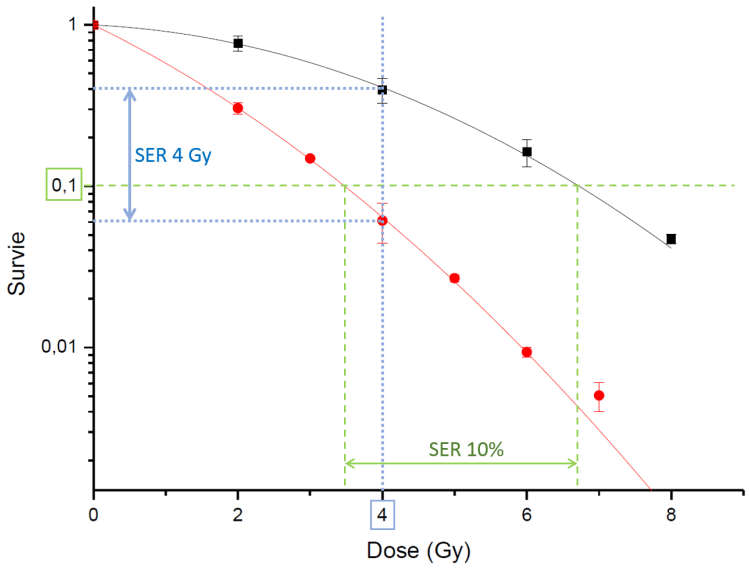


Figure 7.3 – *Courbe de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV avec (rond rouge) ou sans (carré noir) pré-exposition de 48h à 10 µM d'IUdR [Boby 10]. Deux méthodes de mesure de la survie y sont illustrées : le $SER_{10\%}$ et le SER_{4Gy}.*

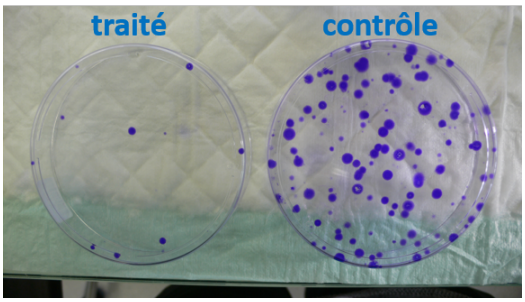


Figure 7.4 – *Test de clonogénicité : cellules contrôle et cellules traitées.*

et 800 cellules après irradiation). De plus, pour chacune de ces quantités, trois boîtes de Pétri sont ensemencées, ce qui donne 9 boîtes de Pétri par condition. Enfin, chaque condition a été répétée trois fois (réplicats d'irradiation), ce qui représente donc 27 boîtes par condition.

Après irradiation, la solution de cellules en suspension est diluée de manière à ensemencer les cellules dans un volume compris entre 5 et 500 µL par boîte de Pétri. Ces boîtes sont préalablement étiquetées et remplies avec 8 mL de milieu complet. Après ensemencement des cellules, les boîtes sont placées à l'incubateur. 14 jours plus tard, le milieu de culture est retiré, les boîtes sont rincées au PBS et 1 mL de crystal violet (25% crystal violet, 75% éthanol absolu) est ajouté dans chaque boîte pendant une minute. Les boîtes sont ensuite rincées à l'eau et mises à sécher à l'air libre. Les colonies sont comptées au compteur automatique de colonies et les résultats sont ensuite corrigés manuellement si besoin.

Avant de calculer le SER, les survies brutes calculées ont été **normalisées** :

- par la survie des cellules non irradiées et non traitées, appelée *plating efficiency*, dans le cas des cellules non traitées. Le *plating efficiency* est généralement compris entre 60 et 70% pour les F98.

- par la survie des cellules non irradiées et traitées à la même condition, dans le cas des cellules traitées. Ainsi, le SER n'indique que le gain obtenu lors de l'irradiation.

La **toxicité** est, par ailleurs, calculée avec la formule suivante :

$$tox = \frac{\text{survie des cellules non irradiées } \textbf{sans} \text{ atomes lourds}}{\text{survie des cellules non irradiées } \textbf{avec} \text{ atomes lourds}} \tag{7.5}$$

Les SER et la toxicité sont donnés avec des **barres d'erreur** représentant l'incertitude sur la mesure. Cette incertitude a été calculée, pour une condition, à partir de l'écart type entre les trois réplicats de densité de cellules. L'incertitude a ensuite été propagée lors de la normalisation par la condition non irradiée, grâce à la formule suivante :

$$\sigma_{A/B} = \left|\frac{A}{B}\right| \sqrt{\left(\frac{\sigma_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_B}{B}\right)^2} \tag{7.6}$$

L'incertitude n'a ensuite pas été propagée lors du calcul du SER. L'écart-type de la survie normalisée des cellules contrôle a été considéré comme nul, comme il est usuel de faire. La formule ci-dessus est donc appliquée avec $\sigma_A = 0$ pour le calcul de l'écart type sur le SER.

Les données d'une boîte de Pétri ont été considérées comme aberrantes lorsque l'écart entre le nombre de colonies compté dans la boîte et la moyenne obtenue pour la condition expérimentale concernée était supérieur à $2.59 \times \sigma$, avec σ l'écart type relatif à cette moyenne.

7.1.2.3 Test MTT et suivi sur dix jours

Le test MTT est une méthode rapide permettant de dénombrer les cellules vivantes dans un puits *via* une mesure d'absorbance. Son fonctionnement est fondé sur l'utilisation d'un sel réactif, le sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Ce sel est internalisé et métabolisé par les cellules vivantes ; la réduction de ce sel par les mitochondries produit un précipité violet, le formazan. La quantité de précipités formés est donc reliée à la quantité de cellules vivantes. Les précipités sont ensuite dissous dans du DMSO de façon à obtenir une solution homogène de couleur violette, dont l'absorbance est ensuite mesurée.

Bien qu'il soit généralement utilisé pour mesurer une viabilité cellulaire après un temps d'exposition à un traitement, l'application du test MTT dans le cadre de la survie de cellules irradiées a été étudiée au cours de cette thèse. Elle sera discutée dans la section 7.4.2.

Protocole : juste après irradiation, un même nombre de cellules est ensemencé dans les puits d'une plaque 96 puits (500 cellules par puits), en remplissant ainsi une plaque par condition testée. Jour après jour, 6 puits de la plaque sont soumis au test MTT (Fig. 7.5). La mesure de l'absorbance des puits est réalisée à l'aide du lecteur de plaques Victor X4 (PerkinElmer) à 560 nm pendant 1 s. Chaque point de mesure sur les courbes obtenues correspond donc à 6 puits mesurés par MTT. Selon les expériences, chaque condition a été répétée 3 fois ou non : l'existence des réplicats d'irradiation sera donc explicitée avant les résultats. Le protocole du test MTT adapté au suivi sur 10 jours est détaillé en annexe (voir B.3.3).

Une fois les mesures achevées, les courbes MTT sont ajustées avec une sigmoïde sur le logiciel PRISM. L'équation considérée par le logiciel est la suivante :

$$\begin{cases} f(t) = \frac{Top - Bottom}{1 + \exp\left(\log\left(IC50 - t\right) * slope * (Top - Bottom)\right)} + Bottom \\ Top - Bottom = Span \end{cases} \tag{7.7}$$

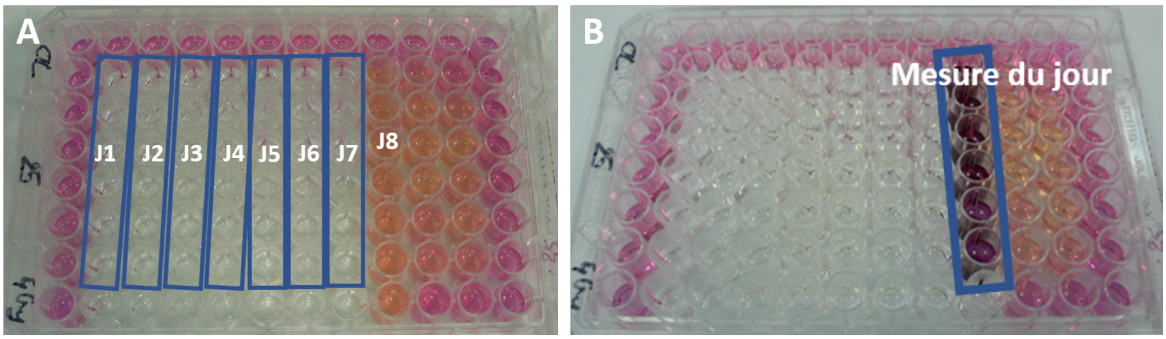


Figure 7.5 – *Illustration du protocole de suivi sur 10 jours par test MTT : (A) plaque avant le point de mesure de J8 ; (B) plaque après dissolution des cristaux de formazan dans le DMSO.*

Les différents paramètres obtenus par le *fit* sont illustrés dans la figure 7.6.

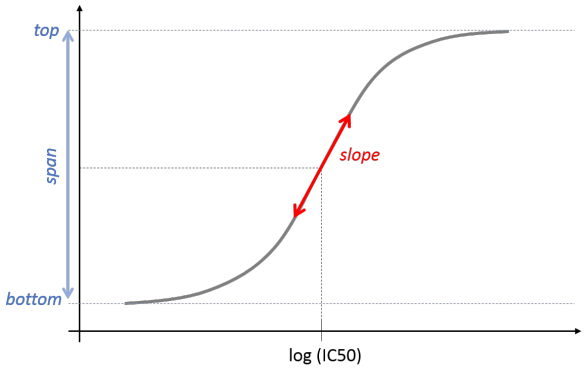


Figure 7.6 – *Exemple de courbe de prolifération obtenue par mesure MTT et ajustée avec une sigmoïde sur le logiciel PRISM. Les différents paramètres issus du fit sont explicités : hillslope, top et bottom, log(IC50).*

La courbe peut être interprétée ainsi : jusqu'au point d'inflexion, la courbe illustre la phase de croissance exponentielle des cellules. Il est donc possible, en ajustant cette section avec une fonction exponentielle, d'obtenir le temps de doublement t_D des cellules.

$$f(t) = N_0.e^{\frac{\ln(2).t}{t_D}} \tag{7.8}$$

Après le point d'inflexion, les cellules arrivent "à confluence", c'est-à-dire qu'elles deviennent trop nombreuses dans le puits et commencent à remplir tout l'espace. La croissance cellulaire diminue puis stoppe lorsque les cellules recouvrent tout le fond du puits.

Il est important de noter que, contrairement au test de clonogénicité, le suivi MTT sur 10 jours ne donne pas de mesure directe de la survie cellulaire. La mort des cellules affecte principalement deux paramètres :

- le nombre "initial" de cellules, qui serait représenté par le paramètre *bottom* si le test était suffisamment sensible, et qui serait indicatif du nombre de cellules mortes juste après l'irradiation (dégâts létaux d'emblée),
- le temps de doublement t_D, qui dépend du temps de doublement des cellules sans traitement, de l'impact du traitement sur l'arrêt du cycle pour réparations, et des cellules pour lesquelles la mort cellulaire est différée.

L'ajustement des courbes par le logiciel PRISM permet ensuite d'analyser les données en utilisant les différents paramètres calculés. Nous avons utilisé, d'une part, les abscisses des points d'inflexion (*log(IC50)*) : nous appellerons "décalage mesuré par MTT" la différence entre les deux abscisses des points d'inflexion des courbes de prolifération des cellules irradiées et non irradiées pour une même condition. Ainsi, la logique de traitement des données MTT est similaire à celle des traitements des données des tests de clonogénicité. D'autre part, nous comparerons la pente au point d'inflexion,*hillslope*, pour les diverses conditions.

Les **barres d'erreur** représentent l'écart type calculé par le logiciel pour chaque paramètre lors de l'ajustement des courbes. Cette incertitude est propagée pour le calcul du décalage des courbes.

7.2 Résultats : potentiel des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose lors d'une irradiation

Les résultats de trois expériences sont présentés séparément : certains paramètres ayant varié d'une expérience à une autre, il était en effet complexe de ne citer qu'une de ces expériences pour représenter la totalité des résultats obtenus. Le protocole mis en place est représenté dans la figure 7.7 et permet de comparer directement les deux méthodes, MTT et test de clonogénicité. Pour chaque tube cryogénique irradié, les cellules étaient à la fois utilisées pour les tests de clonogénicité et ensemencées dans des plaques 96 puits pour suivre la prolifération sur 10 jours *via* le test MTT. Chaque condition expérimentale a systématiquement été répétée 3 fois pour les tests de clonogénicité. Le suivi MTT n'a été fait en triplicats d'irradiation que durant l'expérience 3.

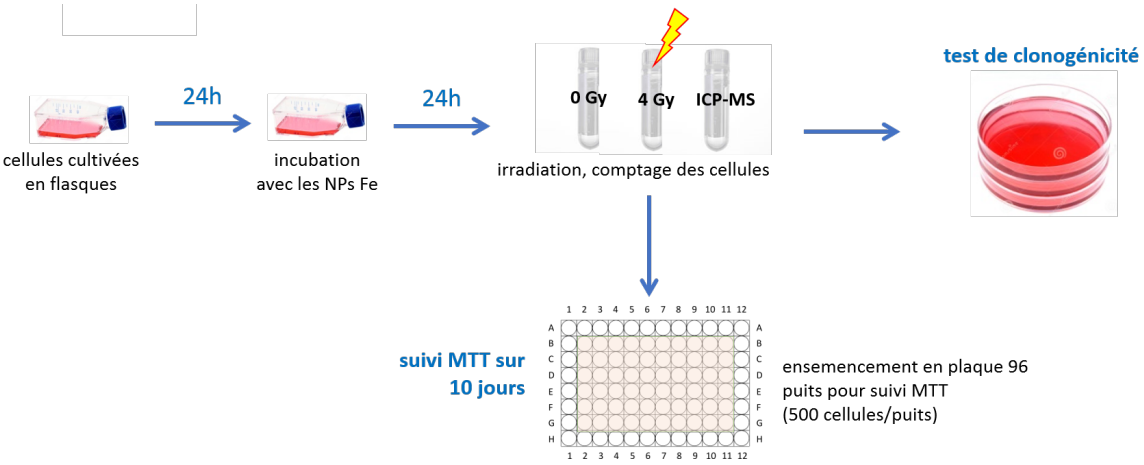


Figure 7.7 – *Schéma illustratif du protocole de mesure de la survie cellulaire suite à une irradiation de rayons X monochromatiques, avec ou sans exposition préalable aux NPs Fe. Les deux protocoles de mesure de la survie MTT et test de clonogénicité sont effectués en parallèle pour caractériser le lien entre les deux méthodes.*

7.2.1 Expérience 1 : test clonogénique et suivi MTT

Au cours de cette première expérience, les conditions suivantes ont été testées :

Protocole d'irradiation	Concentrations mg(Fe)/mL	Energies d'irradiation (keV)	Doses (Gy)	Réplicats d'irradiation
clonogénicité	0.02	30, 51 et 80	0 ou 4	3
	0.06	30, 51 et 80	0 ou 4	3
MTT (tubes)	0.02	30, 51 et 80	0 ou 4	1
	0.06	30, 51 et 80	0 ou 4	1

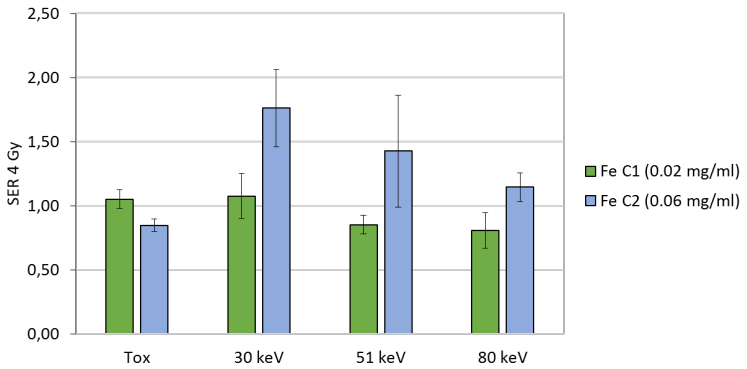


Figure 7.8 – *Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 30, 51 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux concentrations de NPs Fe (C1=0.02 mg/mL et C2=0.06 mg/mL) pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle).*

La figure 7.8 représente les résultats du test de clonogénicité. Nous observons tout d'abord que les NPs Fe ne semblent pas provoquer de toxicité sur les cellules : l'effet induit par la toxicité est de 1.05 ± 0.07 pour une concentration de 0.02 mg(Fe)/mL dans le milieu de culture, et de 0.85 ± 0.05 pour une concentration de 0.06 mg(Fe)/mL. Concernant les cellules irradiées, un effet significatif (ANOVA à deux facteurs, $p<0.0001$) sur la survie de la présence des NPs Fe dans les cellules est observé à 30 keV pour la concentration la plus élevée (0.06 mg/mL) : le SER est alors de 1.76 ± 0.30. Cet effet diminue ensuite quand l'énergie d'irradiation augmente : il est égal à 1.43 ± 0.44 à 51 keV et diminue à 80 keV (1.15 ± 0.11, effet non significatif, ANOVA à deux facteurs, $p=0.9494$). Les cellules exposées à la concentration la moins élevée (0.02 mg/mL) suivent la même tendance de décroissance de l'effet avec l'énergie. Cependant, les SER mesurés sont inférieurs à ceux de la concentration la plus élevée (différence significative pour des énergies d'irradiation de 30 et 51 keV, ANOVA à deux facteurs, $p<0.0001$). A 30 keV, le SER est de 1.08 ± 0.18 et il devient inférieur à 1 pour des énergies d'irradiation de 51 et 80 keV.

La figure 7.9 représente le suivi de la prolifération des cellules sur 10 jours (Fig. 7.10). Ces courbes sont données pour le lecteur à titre d'illustration, mais il est ensuite plus commode d'utiliser les courbes de la figure 7.10 pour comparer les données quantitativement. Tout d'abord, nous pouvons noter que les courbes de prolifération des cellules non irradiées se superposent, suggérant ainsi l'absence de toxicité des NPs Fe sur le long terme. Le décalage calculé est de 8.9h ± 2.1 et -3.0h ± 2.2 pour les concentrations 0.02 et 0.06 mg(Fe)/mL respectivement (Fig. 7.10 (A)).

Les courbes de prolifération des cellules irradiées à 30 keV sont décalées les unes par rapport aux autres : les cellules exposées à la plus forte concentration de NPs Fe mettent plus de temps à atteindre la confluence que les cellules contrôle irradiées, confirmant la présence d'un effet sur la survie cellulaire. Cet effet est maximal pour une irradiation de 30 keV (décalage de 10.9 ± 5.5 h et 36.9 ± 5.1 h pour 0.02 et 0.06 mg/mL respectivement), puis diminue lorsque l'énergie

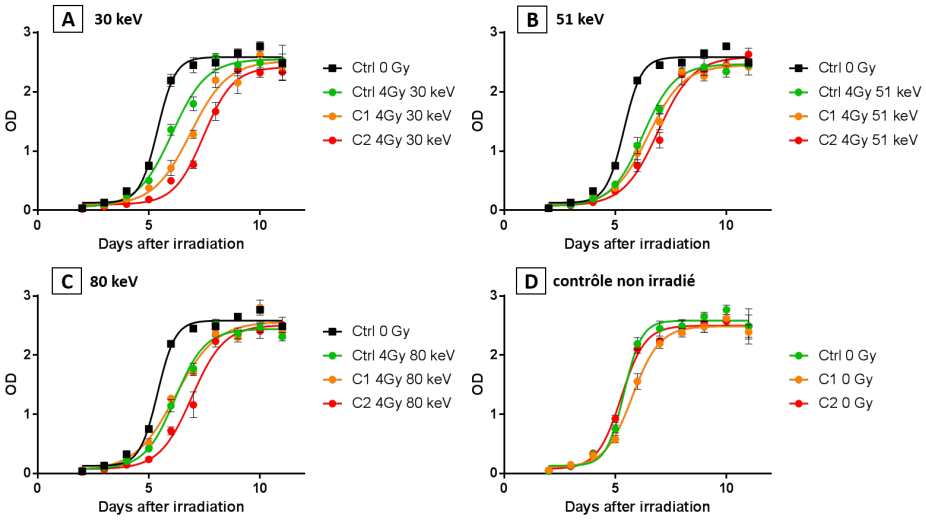


Figure 7.9 – *Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 aux différentes conditions étudiées. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à différentes concentrations (C1 = 0.02 mg/mL et C2 = 0.06 mg/mL) pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy). Les cellules ont été irradiées avec un faisceau monochromatique aux énergies suivantes : (A) 30 keV, (B) 51 keV, (C) 80 keV, (D) cellules non irradiées.*

d'irradiation augmente. Il est d'autant plus élevé que la concentration de fer dans le milieu de culture est importante.

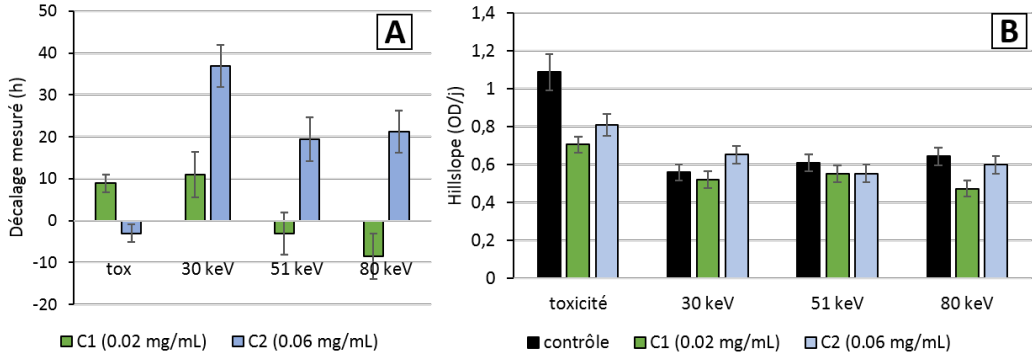


Figure 7.10 – *Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 aux différentes conditions étudiées. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à différentes concentrations (C1 = 0.02 mg/mL et C2 = 0.06 mg/mL) pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy, énergie du faisceau : 30, 51 ou 80 keV). (A) Décalage temporel mesuré entre les cellules traitées aux NPs Fe et les cellules non traitées. La toxicité n'est pas prise en compte dans la mesure du décalage des cellules traitées irradiées. (B) Pente (hillslope) mesurée selon la condition étudiée.*

D'autre part, la figure 7.10 (B) représente l'évolution de la pente au point d'inflexion (*hillslope*) en fonction des conditions d'exposition aux NPs Fe et de l'énergie d'irradiation. L'exposition aux NPs Fe pendant 24h induit une diminution significative de la valeur de la pente (ANOVA à deux facteurs, $p<0.0001$), pour la forte (0.06 mg/mL) et la faible concentration (0.02 mg/mL). Ainsi, alors qu'il est de 1.09 ± 0.10 DO (Densité Optique)/j pour les cellules contrôle non irradiées, le coefficient directeur de la pente baisse à 0.71 ± 0.04 et 0.81 ± 0.06 DO/j pour les cellules non irradiées exposées à 0.02 mg(Fe)/mL et 0.06 mg(Fe)/mL respectivement. Lorsque les cellules sont

irradiées, la différence entre les pentes des cellules non traitées aux NPs Fe et des cellules traitées n'est plus significative (ANOVA à deux facteurs), à l'exception de l'irradiation à 80 keV de cellules exposées à 0.02 mg(Fe)/mL.

7.2.2 Expérience 2 : test clonogénique et suivi MTT

Cette expérience avait pour objectif de se rapprocher des conditions d'incubation utilisées par Paul Gimenez, qui avait exposé les cellules jusqu'à 0.3 mg(Fe)/mL. Elle fait suite à une autre expérience (non montrée) pour laquelle les mêmes conditions ont été étudiées, sans réplicat d'irradiation. Cette fois, les suivis MTT ont été réalisés en triplicats d'irradiation. Les conditions étudiées sont les suivantes :

Protocole d'irradiation	**Concentrations** mg(Fe)/mL **(keV)**	**Energies d'irradiation (Gy)**	**Doses**	**Réplicats d'irradiation**
clonogénicité	0.06	30, 51 et 80	0 ou 4	3
	0.15	30, 51 et 80	0 ou 4	3
MTT (tubes)	0.06	30, 51 et 80	0 ou 4	3
	0.15	30, 51 et 80	0 ou 4	3

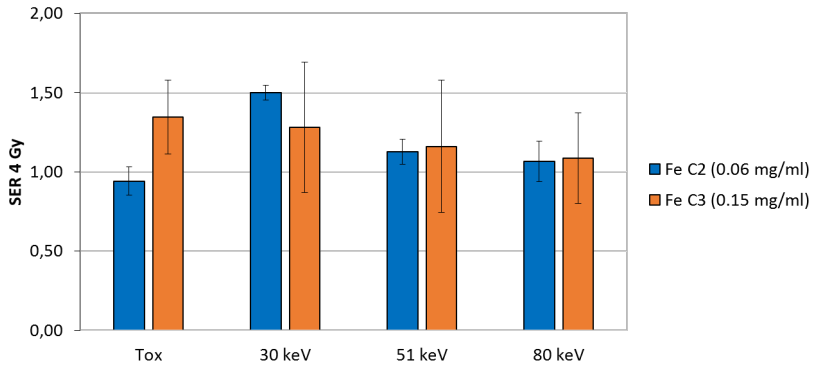


Figure 7.11 – *Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 30, 51 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux concentrations de NPs Fe de l'équipe coréenne (C2=0.06 mg/mL et C3=0.15 mg/mL) pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle).*

La figure 7.11 présente les résultats du test de clonogénicité. L'exposition des cellules à la concentration la plus élevée en NPs Fe (0.15 mg/mL) semble induire une toxicité (valeur de la toxicité : 1.35 ± 0.23), bien que la différence avec les cellules contrôle ne soient pas significative (ANOVA à deux facteurs, p=0.2928). La toxicité induite par la plus faible concentration (0.06 mg/mL) est de 0.94 ± 0.09, suggérant l'absence d'effet des NPs Fe sur la viabilité après 14 jours à cette condition d'exposition. Concernant les cellules irradiées, le SER est maximal à une irradiation de 30 keV, pour les deux conditions d'exposition aux NPs Fe. Il est de 1.50 ± 0.05 et 1.28 ± 0.41 pour les concentrations 0.06 mg/mL et 0.15 mg/mL respectivement. L'effet le plus important est obtenu avec la concentration la plus faible en NPs Fe, et l'effet est significatif pour cette condition (ANOVA à deux facteurs, p=0.017). Le SER décroît ensuite lorsque l'énergie d'irradiation augmente, et aucun

effet n'est observé à 80 keV (SER de 1.07 ± 0.13 et 1.09 ± 0.29 pour 0.06 mg/mL et 0.15 mg/mL respectivement).

La même tendance en fonction de l'énergie d'irradiation se retrouve dans les décalages mesurés en suivi MTT (Fig. 7.12 (A)). L'effet maximal est obtenu pour une irradiation à 30 keV. Cet effet est plus élevé pour la plus grande concentration d'exposition : le décalage est alors de 26.5 ± 4.0 h. Il décroît ensuite lorsque l'énergie d'irradiation augmente. A 80 keV, le décalage est de -6.2 ± 3.7 h et 4.0 ± 3.6 h pour une exposition à 0.06 mg(Fe)/mL et 0.15 mg(Fe)/mL respectivement. L'exposition des cellules aux NPs Fe induit une toxicité pour les deux conditions étudiées (6.8 ± 1.8 et 11.6 ± 1.6 h pour une exposition à 0.06 mg(Fe)/mL et 0.15 mg(Fe)/mL respectivement). La différence avec les cellules non traitées est significative pour les deux conditions (ANOVA à deux facteurs, $p < 0.0001$).

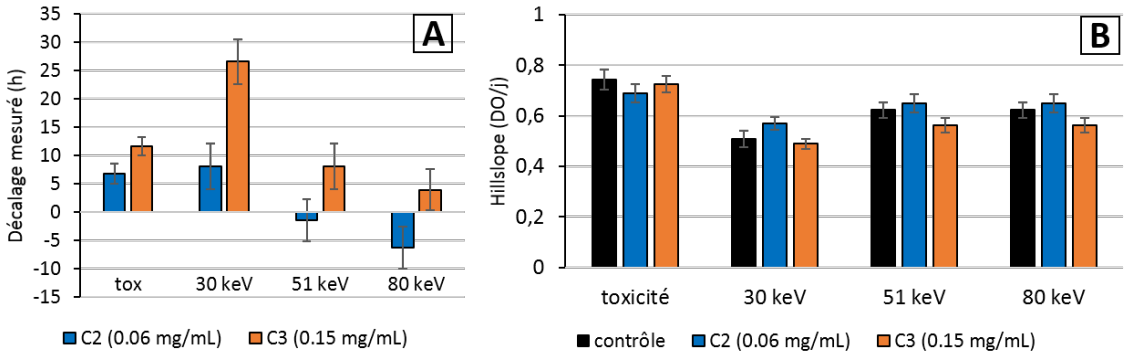


Figure 7.12 – *Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 aux différentes conditions étudiées. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à différentes concentrations (C2=0.06 mg/mL et C3=0.15 mg/mL) pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy, énergie du faisceau : 30, 51 ou 80 keV). (A) Décalage temporel mesuré entre les cellules traitées aux NPs Fe et les cellules non traitées. La toxicité n'est pas prise en compte dans la mesure du décalage des cellules traitées irradiées. (B) Pente (hillslope) mesurée selon la condition étudiée.*

D'autre part, l'exposition des cellules aux NPs Fe n'induit pas de variation dans le coefficient directeur de la tangente au point d'inflexion (Fig. 7.12 (B)), que les cellules soient irradiées ou non. La différence entre les pentes des cellules traitées aux NPs Fe et des cellules non traitées n'est pas significative (ANOVA à deux facteurs), pour chaque condition d'irradiation (0 Gy ou 4 Gy 30 keV, 51 keV ou 80 keV).

7.3 Discussion

7.3.1 Dépendance du SER mesuré à l'énergie d'irradiation

Les énergies utilisées dans ces expériences ont été choisies pour diverses raisons : l'énergie d'irradiation de 30 keV est proche de l'énergie d'irradiation optimale selon les simulations (voir 4.2.2). L'énergie d'irradiation de 80 keV, pour laquelle les photons sont plus pénétrants, est plus proche des énergies utilisables dans une potentielle phase clinique par irradiation externe. Enfin, l'énergie d'irradiation de 50 keV est une énergie intermédiaire entre les deux : elle est intéressante car Paul Gimenez avait observé dans ses travaux de thèse un comportement inattendu du SER à l'énergie d'irradiation, pour des cellules exposées préalablement aux NPs Fe (voir Fig. 7.13). En effet, le SER était maximal à 30 et 80 keV, avec des valeurs respectives de 2.96 et 2.95 pour

une concentration d'exposition de 0.06 mg(Fe)/mL. D'une part, l'effet obtenu était conséquent par rapport aux autres SER de la littérature, toutes NPs confondues. D'autre part, la dépendance du SER ne suivait pas la tendance prévue par la simulation des effets physiques seuls. Un SER proche de 3 à une énergie d'irradiation de 80 keV était particulièrement intéressant d'un point de vue clinique.

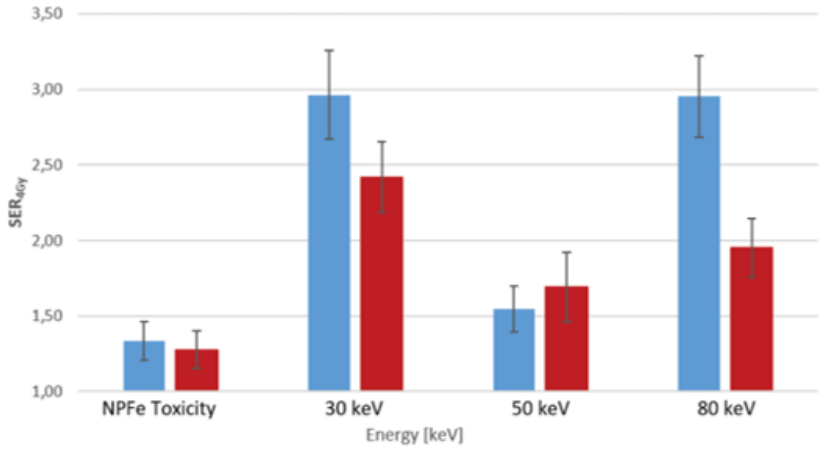


Figure 7.13 – *Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 30, 50 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux concentrations de NPs Fe de l'équipe coréenne (0.06 mg/mL [bleu] et 0.03 mg/mL [rouge]) pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle) [Gime 15].*

Les résultats des expériences menées pendant ces travaux de thèse (expérience 1 (7.2.1), expérience 2 (7.2.2), ainsi que d'autres expériences non présentées ici) montrent tous que l'effet induit par les NPs est dépendant de l'énergie. Les SER suivent une tendance similaire en fonction de l'énergie d'irradiation et ce, peu importe le moyen de mesure de la survie des cellules. Le SER est maximal à 30 keV et décroît ensuite jusqu'à 80 keV, énergie pour laquelle l'effet devient non significatif (ANOVA à deux facteurs). Ce résultat, cohérent avec les simulations, semble indiquer que l'effet photoélectrique est bien l'un des acteurs contribuant à la diminution de la survie des cellules exposées aux NPs Fe puis irradiées. Par contre, l'effet important à 80 keV qui avait été observé par Paul Gimenez n'a pas pu être reproduit au cours des expériences de ces travaux de thèse [Gime 15]. Un effet bénéfique mesuré à 80 keV pourrait plus aisément être transmis en phase clinique qu'un effet bénéfique seulement obtenu pour une irradiation de 30 keV. En effet, un faisceau de rayons X à 30 keV est plus rapidement atténué par les tissus et les os et ne serait pas capable d'atteindre une tumeur profonde (longueur d'atténuation pour un faisceau de 30 keV dans l'eau : 2.6 cm, contre 5.4 cm pour un faisceau de 80 keV ; d'après les données du NIST).

L'équipe coréenne avec laquelle nous collaborons utilise les mêmes NPs Fe dans leurs études de renforcement du dépôt de dose. J.K. Kim *et al.* favorisent dans leurs travaux une irradiation des tumeurs des animaux juste au-dessus du K-edge du fer, à 7.1 keV [Choi 12a]. Cette énergie correspond à un pic de probabilité d'interaction photoélectrique pour les photons incidents. Leur stratégie d'irradiation permet donc d'obtenir un dépôt de dose conséquent par les électrons Auger, dont le rayon d'action est limité à quelques centaines de nm au maximum (voir 4.4.2). Utiliser des énergies d'irradiation supérieures à 7.1 keV diminue les probabilités d'interaction photoélectrique mais permet de se rapprocher de l'énergie d'irradiation théoriquement optimale vers 30 keV. En effet, bien que l'énergie d'irradiation à 7.1 keV corresponde à un pic de probabilité de l'interaction

photoélectrique, ce n'est pas à 7.1 keV que le DEF attendu est le plus élevé. Le DEF est obtenu en comparant la dose déposée dans l'eau et la dose déposée dans un milieu contenant du fer. La différence d'absorption entre ces deux milieux est maximale vers 30 keV, où l'eau absorbe peu les rayons X comparé au milieu contenant du fer. Si l'effet photoélectrique entraîne un pic d'absorption des rayons X à 7.1 keV pour le fer, l'absorption de l'eau à cette énergie reste élevée et le gain obtenu par le fer est plus faible qu'à 30 keV. Il y a donc, en quelque sorte, deux stratégies différentes :

- soit l'impact de la présence des NPs Fe sur la survie des cellules est uniquement attribué aux cascades locales d'électrons Auger, auquel cas l'irradiation à 7.1 keV est à privilégier,
- soit l'impact de la présence des NPs Fe sur la survie des cellules est attribué à l'ensemble des interactions physiques ayant lieu préférentiellement dans le milieu contenant du fer, et dans ce cas une irradiation à 30 keV serait plus optimale car c'est à cette énergie que la différence d'absorption entre le fer et l'eau est la plus importante.

Le choix de l'énergie d'irradiation peut notamment dépendre de la localisation des NPs par rapport aux cibles cellulaires.

7.3.2 Dépendance du SER mesuré à la concentration en NPs Fe dans le milieu de culture

7.3.2.1 Augmentation du SER mesuré avec la concentration ?

En étudiant séparément les deux expériences décrites -ainsi que les autres expériences non présentées ici-, nous remarquons que l'incubation préalable des cellules avec les NPs Fe diminue la survie de ces cellules après irradiation. Cet effet est d'autant plus visible à 30 keV, et, dans la plupart des cas, pour la concentration en NPs Fe dans le milieu de culture la plus élevée. Ce phénomène est cohérent avec les simulations du chapitre 4 : le DEF augmente avec la concentration en fer dans le volume cible, et l'accumulation de fer dans les cellules augmente avec la concentration de NPs Fe dans le milieu de culture.

Si nous comparons maintenant les deux expériences entre elles, cette observation n'est plus aussi évidente. Dans la première et la deuxième expérience, la même lignée de cellules F98 a été irradiée aux mêmes énergies. Les deux concentrations d'incubation étudiées étaient 0.02 mg/mL et 0.06 mg/mL pour la première, et 0.06 mg/mL et 0.15 mg/mL pour la deuxième. Le décalage mesuré par MTT à 30 keV diffère d'une expérience à une autre pour une même concentration de fer dans le milieu de culture des cellules (0.06 mg/mL) : le décalage est de 36.9 $\pm$ 5.2 h pour la première expérience, et de 8.1 $\pm$ 4.1 h pour la deuxième. Les SER calculés suite à l'exposition des cellules à une concentration de NPs Fe de 0.06(Fe)/mL sont 1.76 $\pm$ 0.30 et 1.50 $\pm$ 0.05 pour la première et la deuxième expérience respectivement. La concentration d'incubation n'est pas le seul paramètre à prendre en compte : la grandeur pertinente pour comparer ces résultats serait plutôt la masse de fer internalisée par les cellules, qui serait susceptible de varier d'une expérience à une autre pour une même concentration de NPs Fe dans le milieu. En effet, la taille des NPs Fe semble être un des paramètres clef affectant leur internalisation par les cellules. La caractérisation des NPs Fe dans le chapitre 5 a montré que la sonication ne permettait pas d'obtenir une solution reproductible, ce qui pourrait expliquer la variation de la masse de fer internalisée entre deux expériences.

7.3.2.2 Comparaison avec une autre NP Fe : irradiation de cellules exposées au FerInject

Des expériences similaires ont été réalisées en exposant des gliomes F98 et 9L à des NPs Fe FerInject pendant 24h. Les cellules ont ensuite été rincées et irradiées à 30, 50 et 80 keV (dose déposée : 4 Gy, concentrations d'incubation 2.4 mg(Fe)/mL). Aucun effet de l'exposition préalable au FerInject sur la survie des cellules avec ou sans irradiation n'a pu être observé. Cependant, comme vu précédemment (6.3.1.5), les cellules de gliomes accumulent moins de fer lorsqu'elles sont exposées au FerInject par rapport aux NPs Fe coréennes (0.36 ± 0.03 pg(Fe)/cellule pour une exposition à 2.4 mg(Fe)/mL de FerInject contre 30 ± 2 pg(Fe)/cellule pour une exposition à 0.06 mg(Fe)/mL de NPs coréennes soniquées). La masse de fer par cellule accumulée avec le FerInject serait donc insuffisante pour provoquer une augmentation du dépôt de dose significative lors de l'irradiation. L'absence d'impact sur la survie cellulaire montre aussi que le FerInject n'apporte aucun "effet biologique" inconnu en plus des effets physiques insuffisants pour augmenter la dose. Ceci peut être relié au fait que le FerInject bénéficie d'une AMM, et ne cause donc *a priori* que peu de changements dans le métabolisme des cellules à ces concentrations.

7.3.3 Conséquences de l'internalisation des NPs Fe par les cellules : quel impact sur la survie cellulaire après irradiation ?

Un effet thérapeutique observé à 30 keV

L'étude par test de clonogénicité et suivi MTT du comportement des cellules non irradiées et exposées aux plus faibles concentrations (0.02 mg/mL et 0.06 mg/mL) montre que la toxicité engendrée par les NPs Fe reste limitée. De plus, la valeur du SER mesurée à 30 keV montre l'efficacité du traitement consistant à exposer les cellules aux NPs Fe avant l'irradiation, en particulier à la concentration de 0.06 mg(Fe)/mL dans le milieu de culture (SER de l'ordre de $\simeq$1.5 pour les deux expériences). L'accumulation des NPs Fe dans les cellules augmente la concentration intracellulaire de fer et donc, selon les simulations, le dépôt de dose lors de l'irradiation. De plus, l'internalisation des NPs Fe rapproche les NPs des cibles cellulaires et augmente ainsi la probabilité que les électrons secondaires endommagent ces cibles. Nous pourrions donc être tentés de développer des protocoles permettant d'augmenter encore la concentration intracellulaire de NPs Fe de façon à obtenir un effet thérapeutique maximal.

Toxicité des NPs Fe à plus fortes concentrations

Pour des concentrations un peu plus élevées (à partir de 0.06 mg/mL), l'étude du comportement des cellules non irradiées montre que l'exposition des cellules F98 aux NPs Fe cause un ralentissement de la prolifération cellulaire. Les cellules exposées aux NPs pendant 24h à une concentration de 0.06 mg/mL sont 2 fois moins nombreuses que les cellules contrôle (voir 6). Cependant, une fois rincées et réensemencées dans les boîtes de Pétri ou les plaques 96 puits en nombre identique, les cellules ayant internalisé des NPs Fe prolifèrent presque aussi rapidement que les cellules contrôle, et la toxicité mesurée par test de clonogénicité confirme l'absence de modification majeure du métabolisme cellulaire (toxicités mesurées pour l'expérience 1 : 1.05 ± 0.07 et 0.85 ± 0.05 pour les concentrations d'exposition respectives 0.02 mg(Fe)/mL et 0.06 mg(Fe)/mL ; différence avec les cellules contrôle non significative, ANOVA à deux facteurs). Les courbes de suivi MTT des cellules non irradiées (voir Fig. 7.9 (B)) se superposent, que les cellules soient traitées ou non, ce qui est cohérent avec les mesures du test de clonogénicité et suggère que l'exposition des cellules aux NPs Fe pendant 24h à cette concentration n'a pas d'impact à long terme sur la viabilité des cellules une

fois réensemencées .

Ce phénomène peut être relié à diverses observations similaires de la littérature :

1. Geppert *et al.* ont exposé des astrocytes à des NPs Fe. Ils observent, après 4h, une augmentation de la production de ROS dans le cas des cellules exposées aux NPs Fe. Après rinçage des cellules et remise en culture, cette production de ROS augmente encore pour se stabiliser puis décroître 3 jours après. 7 jours après, plus aucune différence de production de ROS n'est observée avec les cellules contrôle [Gepp 12]. Geppert attribue cette observation à la **régulation positive de la ferritine**. Cette hypothèse pourrait également expliquer certaines de nos observations : les ions fer libérés ou la surface non *coatée* des NPs Fe internalisées pourraient catalyser la réaction de Haber-Weiss, induisant un stress cellulaire. Suite à l'apparition d'ions fer libres, la cellule pourrait synthétiser de la ferritine de façon à neutraliser ces ions très réactifs. Si cette production n'est pas assez rapide, les ions fer s'accumuleraient et engendreraient une toxicité. Cependant, après rinçage des cellules, l'accumulation de fer dans le cytoplasme se stabiliserait et la cellule pourrait synthétiser suffisamment de ferritine pour bloquer le fer libre. La toxicité engendrée disparaitrait alors.
2. Une autre possibilité est énoncée par Mahmoudi *et al.* : ses études prouvent que la présence de NPs Fe dans le milieu de culture des cellules peut **affecter la composition du milieu** (par exemple, dénaturer certaines protéines), pouvant entraîner une toxicité cellulaire [Mahm 10]. Cette toxicité est alors grandement diminuée lorsque les NPs sont préalablement introduites dans du milieu de culture sans cellules pendant 24h, durée pendant laquelle elles adsorbent des protéines. Ces NPs Fe dont la surface est alors saturée de protéines du milieu sont ensuite exposées aux cellules.

Fortes concentrations intracellulaires en fer : où l'optimum se situe-t-il ?

L'exposition préalable des cellules à de fortes concentrations de NPs Fe dans le milieu de culture ne semble pas être bénéfique du point de vue thérapeutique : le SER mesuré pendant l'expérience 2 pour la plus grande concentration d'exposition (0.15 mg(Fe)/mL ; SER mesuré : 1.28 $\pm$ 0.41) est inférieur à celui obtenu pour une concentration plus faible de NPs Fe (0.06 mg(Fe)/mL ; SER mesuré : 1.50 $\pm$ 0.05). Pourtant, les mesures ICP-MS réalisées avec des cellules provenant des mêmes flasques de culture révèlent que les F98 ont internalisé plus de fer lorsqu'elles ont été exposées à la concentration de 0.15 mg/mL (144 $\pm$ 23 pg/cellule pour une exposition à 0.06 mg/mL contre 398 $\pm$ 26 pg/cellule pour une exposition à 0.15 mg/mL). **En d'autres termes, augmenter la concentration intracellulaire de fer ne permet pas, à ces concentrations d'exposition, d'augmenter l'effet thérapeutique (représenté par la valeur du SER)**, ce qui est en désaccord avec les simulations macroscopiques. Ce phénomène a aussi été observé par Paul Gimenez : dans ses expériences, l'effet mesuré pour la plus grande concentration d'exposition de NPs Fe était plus faible que celui mesuré pour la plus petite concentration d'exposition (SER de 2.96 pour 0.06 mg(Fe)/mL contre 2.42 pour 0.3 mg(Fe)/mL). Nous rappelons toutefois que le calcul du SER est réalisé à partir des survies normalisées : la toxicité des NPs Fe sans irradiation n'est ainsi pas inclue dans la valeur du SER.

Nous pouvons relier ces résultats au **blocage en phase S** induit par les NPs Fe (voir 6.3.3.2) : la phase S est la phase la plus radiorésistante du cycle cellulaire. Les cellules bloquées en phase S seraient donc moins sensibles à l'irradiation. Ce phénomène de "radiorésistance" induite par l'exposition aux NPs Fe serait plus particulièrement visible aux énergies d'irradiation les plus élevées (51 et 80 keV), pour lesquelles l'augmentation du dépôt de dose due au fer est moins importante.

D'autre part, l'exposition des cellules aux NPs Fe pendant 24h à des concentrations élevées (0.15 mg(Fe)/mL) provoque une induction de l'apoptose en plus de l'arrêt du cycle : ce procédé génère

donc, par un moyen ou par un autre, un stress cellulaire. Les cellules d'une même culture cellulaire ne sont pas identiques : certaines sont plus résistantes que d'autres à un même stress cellulaire. Les cellules irradiées dans nos expériences sont les cellules encore vivantes après les 24h d'exposition aux NPs Fe (les cellules mortes sont éliminées par rinçage au PBS). Ces cellules encore vivante sont donc probablement les cellules les plus résistantes au stress induit par l'exposition aux NPs. Au contraire, les cellules contrôle irradiées forment encore une population hétérogène de cellules plus ou moins résistantes, car celles-ci n'ont pas été exposées à un stress similaire. Il est donc possible que nous **"sélectionnions" involontairement les cellules les plus résistantes** aux dommages lors de l'incubation de 24h avec les NPs Fe : l'étude de la survie s'en trouverait donc biaisée.

De plus, l'efficacité de la réparation des lésions générées par l'irradiation dépend en grande partie de la DDR (*DNA Damage Response*, voir 2.1.5). Or, la DDR pour être modulée positivement ou négativement par un autre stress. Par exemple, il a été montré qu'une pré-irradiation des cellules à une dose sub-létale permettait d'augmenter la résistance de ces cellules à une irradiation à des doses induisant la mort cellulaire [Djan 14]. Nous pouvons donc supposer que l'exposition des cellules aux NPs Fe pendant 24h génère un **stress modulant positivement la DDR** : les cellules seraient donc plus résistantes au nouveau stress induit par irradiation.

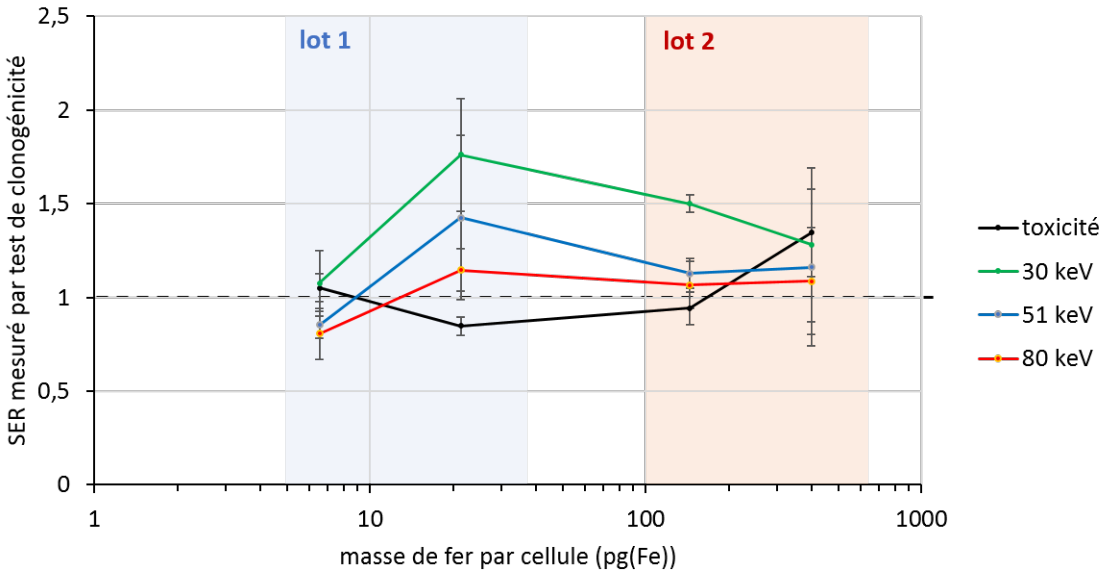


Figure 7.14 – *Evolution du SER mesuré par clonogénicité selon la masse de fer internalisée par les cellules (mesures ICP-MS sur un échantillon de cellules provenant de l'expérience). Le lot 1 de NPs correspond aux NPs utilisées dans l'expérience 1 et le lot 2 aux NPs utilisées dans l'expérience 2. Les deux lots sont des lots de NPs Fe de l'équipe coréenne, fournis moins de trois mois avant chaque expérience. Les NPs ont été préablement soniquées avant expositions aux cellules.*

Influence de la taille des nanoparticules

La figure 7.14 représente l'évolution du SER en fonction de la masse de fer internalisée par les cellules, pour plusieurs conditions d'irradiation (0 Gy et 4 Gy à 30, 51 et 80 keV). Ces données proviennent des deux expériences ayant utilisé deux lots différents de NPs Fe coréennes (les lots 1 et 2, relatifs aux expériences 1 et 2 présentées dans la section Résultats). Tout d'abord, nous retrouvons la dépendance du SER à l'énergie d'irradiation précédemment discutée : l'effet maximal est obtenu pour une irradiation de 30 keV, puis décroît lorsque l'énergie d'irradiation augmente. D'autre

part, l'évolution du SER en fonction de la masse de fer internalisée (et donc à la concentration intracellulaire en fer, voir 7.3.5.1) est différente de celle du DEF calculé avec les simulations : le modèle physique indique que l'effet d'augmentation de dose sera d'autant plus important que la concentration de fer intracellulaire est élevée. Or, sur ces courbes, le SER décroît à partir d'une certaine masse de fer internalisée par cellule. Les deux lots de NPs étant différents, il est très probable que la taille de ces NPs ait changé d'une expérience à l'autre. La taille des NPs jouerait donc probablement un rôle, en plus des phénomènes biologiques décrits plus haut (blocage en phase S, sélection des cellules résistantes lors de l'incubation de 24h avec les NPs Fe, activation de la DDR).

Nous avons précédemment remarqué qu'une grande taille de NPs semblait favoriser leur internalisation par les cellules. Les NPs Fe du lot 2 ont été internalisées en plus grandes quantités que celles du lot 1 pour la concentration d'exposition de 0.06 mg/mL. Il est donc probable que les NPs Fe du lot 2 aient un diamètre plus élevé que les NPs du lot 1. Or, une "NP" de plusieurs centaines de µm ne peut plus réellement être considérée comme une NP. En particulier, le ratio volume/surface de la NP change. Ce changement est probablement peu favorable à l'augmentation de dose car les électrons Auger émis par les atomes de fer situés au coeur de la NP seraient moins aptes à rejoindre la surface de la NP et être transportés dans la cellule. Lechtman *et al.* ont par ailleurs montré que la part des particules (photons et électrons) émises puis auto-absorbées dans une NP d'or varie selon la taille de la NP : elle est de 10.21% pour une NP de 30 nm irradiée avec un faisceau provenant de la désintégration d'atomes d'^{1}25I (émetteur γ, raie principale : 35.5 keV, et X, raie principale : 27.4 keV), et augmente à 17.5% pour une NP de 100 nm de diamètre. Les particules les plus touchées par ce phénomène sont les électrons Auger : les électrons Auger sortant de la NP représentent 19.83% des particules secondaires pour une NP de 30 nm, et 14.72% pour une NP de 100 nm) [Lech 11]. De plus, la surface d'échange générée par 10 pg de petites NPs est plus importante que celle générée par 10 pg de NPs de plus grand diamètre.

7.3.4 Influence du protocole d'irradiation : irradiation en plaques

Lors de l'expérience 1, un autre protocole d'irradiation a été expérimenté : les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits, exposées (ou non) aux NPs Fe pendant 24h (concentration : 0.06 mg/mL), puis rincées deux fois au PBS. Les puits sont finalement remplis avec du milieu complet neuf et les plaques sont irradiées à 30 keV (dose : 4 Gy), puis stockées à l'incubateur après irradiation pour suivi sur 10 jours au test MTT. Le protocole est schématisé dans la figure 7.15.

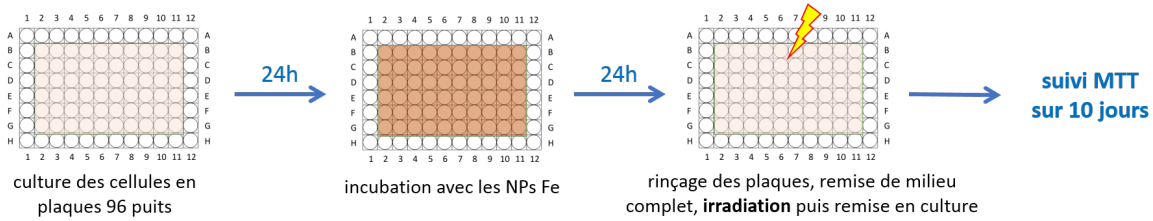


Figure 7.15 – *Schéma illustratif du protocole de mesure de la prolifération cellulaire par suivi MTT avec irradiation des cellules F98 en plaques. Les cellules ont préalablement été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne (0.06 mg/mL) pendant 24h.*

Les courbes de prolifération des cellules traitées ou non sont représentées sur la figure 7.16.

Protocole d'irradiation	Concentrations mg(Fe)/mL	Energies d'irradiation (keV)	Doses (Gy)	Réplicats d'irradiation
MTT (plaques)	0.06	30, 51 et 80	0 ou 4	1

L'exposition des cellules F98 aux NPs Fe avant l'irradiation induit un retard significatif (ANOVA à deux facteurs, $p<0.05$) dans la prolifération par rapport aux cellules non exposées aux NPs et irradiées (abscisse du point d'inflexion : 6.33 ± 0.07 j pour les cellules non exposées aux NPs Fe contre 8.50 ± 0.21 j pour les cellules exposées aux NPs Fe). Cependant, l'internalisation des NPs Fe par les cellules provoque aussi un effet sans irradiation : selon ces courbes, l'impact de l'internalisation des NPs Fe sur la viabilité des cellules serait similaire à celui provoqué par une irradiation à 4 Gy pour les cellules contrôle. Le décalage induit par l'exposition seule aux NPs est en effet de 1.2 ± 0.1 j (contre 1.6 ± 0.2 j pour le décalage provoqué par l'irradiation pour les cellules contrôle). De plus, la pente mesurée au point d'inflexion pour les cellules irradiées et exposées aux NPs est significativement inférieure à celle des cellules non irradiées, qu'elles aient été exposées ou non aux NPs (ANOVA à deux facteurs, $p<0.0001$). Une diminution de la pente au point d'inflexion peut être indicatif d'un arrêt du cycle (temps de doublement plus long) et/ou de morts cellulaires différées plus nombreuses.

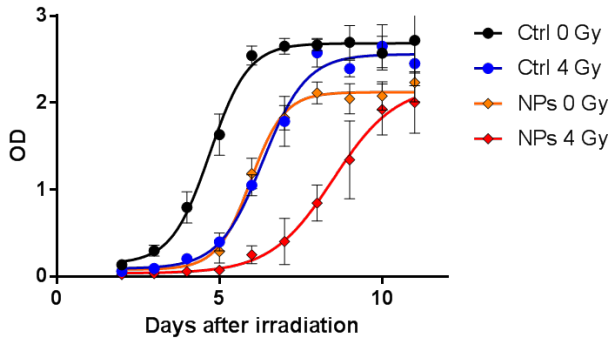


Figure 7.16 – *Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 avec le protocole d'irradiation des cellules en plaques. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à une concentration de 0.06 mg/mL pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy ; énergie du faisceau : 30 keV).*

La principale différence entre le protocole d'irradiation en plaques et le protocole d'irradiation en tubes réside dans le rinçage des NPs Fe. Lors de l'irradiation en tubes, les NPs sont bien rincées, et le résidu non rincé est dilué lors de l'ensemencement des petits volumes en clonogénicité ou en plaques pour MTT. Lors de l'irradiation en plaques, il est difficile de détacher les NPs du fond de la plaque. Les cellules sont donc exposées aux NPs pendant tout le suivi.

Cependant, le protocole d'irradiation en plaques reste intéressant : ne connaissant pas la dynamique d'élimination des NPs Fe dans la tumeur, il n'est pas possible de déterminer quel protocole est le plus "représentatif" de la situation *in vivo*.

7.3.5 Comparaison avec les simulations : du DEF au SER

7.3.5.1 Augmentation de la dose attendue selon la masse de Fe accumulée dans les cellules

A chaque expérience de survie cellulaire, un échantillon de cellules exposées aux NPs Fe a été analysé par ICP-MS, de manière à connaître la masse de fer internalisée par les cellules. Il est possible de "convertir" cette masse de fer mesurée par cellule en concentration de fer intracellulaire, si l'on considère qu'une cellule est un objet cubique de 10 µm de côté. Dans ce cas, une masse de fer de 1 pg(Fe)/cellule revient à une concentration intracellulaire de fer de 1 mg(Fe)/mL. De là, nous pouvons réaliser une simulation Monte-Carlo macroscopique correspondant à la concentration intracellulaire mesurée, par le procédé présenté dans la section 4.1.3.1.

Par exemple, pour l'expérience nommée "Expérience 1", le DEF macroscopique simulé par méthode Monte-Carlo est représenté dans la figure 7.17. A ces concentrations, les DEF obtenus sont de 1.88 et 1.29 à 30 keV pour les concentrations d'exposition 0.06 et 0.02 mg(Fe)/mL respectivement. Nous pouvons noter que l'influence de l'énergie et de la concentration d'exposition sur l'effet obtenu est cohérent avec les résultats obtenus, que ce soit en test de clonogénicité ou en suivi MTT. Les mécanismes physiques d'interaction régissent donc *a priori* la tendance générale de l'effet d'augmentation de la mort cellulaire en présence de NPs Fe à ces concentrations.

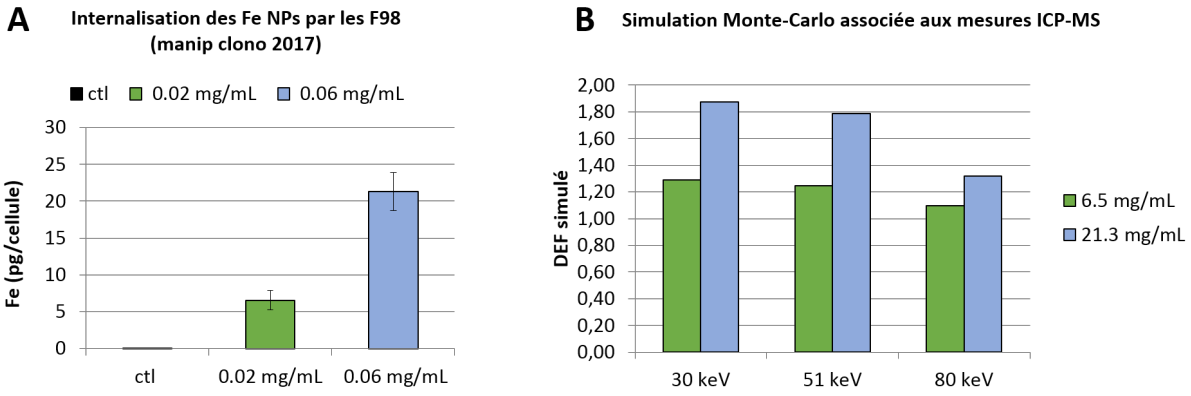


Figure 7.17 – *(A) Masse de fer internalisée par cellule lors de l'expérience 1 (mesures ICP-MS). Les cellules ont été exposées à deux concentrations de NPs Fe de l'équipe coréenne (0.02 ou 0.06 mg/mL) pendant 24 h. (B) DEF macroscopique correspondant simulé par méthode Monte Carlo, selon le protocole décrit dans la section 4.1.3.1. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}.*

7.3.5.2 Du DEF physique simulé au SER biologique mesuré

Il n'est pas exact de comparer directement le DEF physique simulé au SER biologique mesuré dans les courbes de clonogénicité. En effet, le SER tel que nous le calculons est un rapport de survies cellulaires, tandis que le DEF simulé est un rapport de dose.

Comparaison entre le DEF et le SER

La figure 7.18 tente d'illustrer ces propos. Pour un même DEF simulé, ici, un DEF de 2, le SER mesuré n'est pas le même selon la dose initialement appliquée aux cellules lors de l'expérience. En effet, pour une dose initialement fixée à 2 Gy, la dose effective reçue par les cellules sera de

$2 \times 2 = 4$ Gy. Pour une dose initialement fixée à 4 Gy, la dose effective reçue par les cellules sera de $2 \times 4 = 8$ Gy. La réponse cellulaire en fonction de la dose n'étant pas linéaire, un même facteur d'augmentation de la dose n'aura pas le même impact sur la survie selon les paramètres initiaux de l'irradiation.

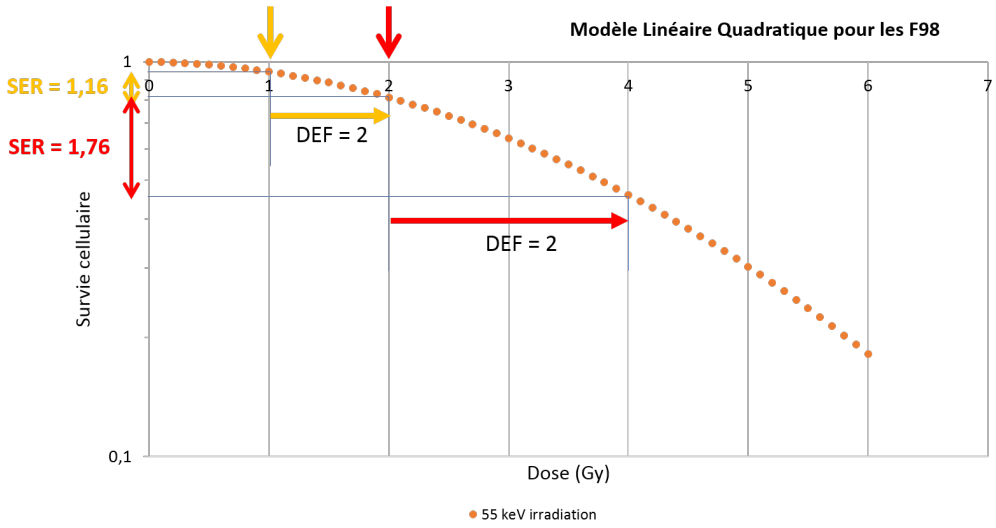


Figure 7.18 – *Schéma illustrant la différence entre le SER mesuré et le DEF physique simulé.*

Dans un récent article, Delorme *et al.* construisent un modèle permettant de calculer un DEF "expérimental" à partir des SER_{4Gy} [Delo 17], en supposant que seuls les mécanismes physiques d'augmentation de dose sont responsables de l'effet mesuré. En effet, si nous considérons seulement les mécanismes physiques lors de l'expérience, les cellules chargées en fer ne reçoivent pas la dose D délivrée par l'irradiation seule mais une dose $D \cdot DEF_{exp}$ avec DEF_{exp} le renforcement de la dose par le fer. En utilisant le modèle linéaire quadratique de l'équation 7.2, la survie peut donc s'écrire de la manière suivante :

$$S = \exp -\alpha.(D \cdot DEF_{exp}) - \beta.(D \cdot DEF_{exp})^2 \tag{7.9}$$

Le SER étant le ratio de la survie des cellules non exposées aux NPs et des cellules exposées aux NPs Fe, celui-ci peut donc s'écrire :

$$SER = \frac{S_{ctl}}{S_{NPs}} = \exp \alpha D(DEF_{exp} - 1) - \beta D^2(DEF_{exp}^2 - 1) \tag{7.10}$$

Comme le SER est mesuré lors des expériences de clonogénicité et que la dose D correspondante est connue ($D = 4$ Gy), il est possible de résoudre l'équation et d'en déduire le DEF expérimental DEF_{exp}.

$$DEF_{exp} = \frac{-\alpha D + \sqrt{(\alpha D)^2 + 4\beta D^2 \cdot (\alpha D + \beta D^2 + \ln SER)}}{2\beta D^2} \tag{7.11}$$

Dans l'article, les auteurs exposent des cellules F98 à des agents de contraste au Gd ou des NPs Gd. Ils montrent que l'exposition préalable des cellules aux agents de contraste au Gd n'a aucun impact sur la survie des cellules lors d'une irradiation à 1.25 MeV. Cependant, l'irradiation à 1.25 MeV de cellules exposées aux NPs Gd induit un effet représenté par l'existence d'un DEF_{exp}

supérieur à 1 à cette énergie d'irradiation. Cependant, le DEF théorique ne prévoit aucun effet physique à ces concentrations lors d'une irradiation à 1.25 MeV. Le DEF_{exp} évolue en fonction de l'énergie d'irradiation suivant la même tendance que le DEF théorique simulé, mais reste toujours supérieur à ce DEF théorique simulé, suggérant l'existence d'un autre mécanisme d'action des NPs Gd.

L'application de cette formule à nos résultats expérimentaux est présentée dans la figure 7.19 (B). Ces résultats sont comparés aux simulations Monte-Carlo macroscopiques relatives aux masses de fer internalisées mesurées par ICP-MS (Fig. 7.19 (A)). Les paramètres α et β pour les F98 aux énergies étudiées ont été tirés de l'article [Delo 17]. Tout d'abord, nous pouvons remarquer que les DEF expérimentaux suivent la même tendance en fonction de l'énergie que les DEF théoriques. A 30 keV, le DEF simulé pour une concentration d'exposition de 0.02 mg/mL est de 1.29 tandis que le DEF expérimental est de 1.05. Le DEF simulé pour une concentration d'exposition de 0.06 mg/mL (expérience 1) est de 1.87 tandis que le DEF expérimental est de 1.34. La dépendance du DEF expérimental à la concentration d'incubation des NPs Fe n'est pas cohérente avec les simulations macroscopiques. Cette observation a précédemment été discutée dans la section 7.3.3.

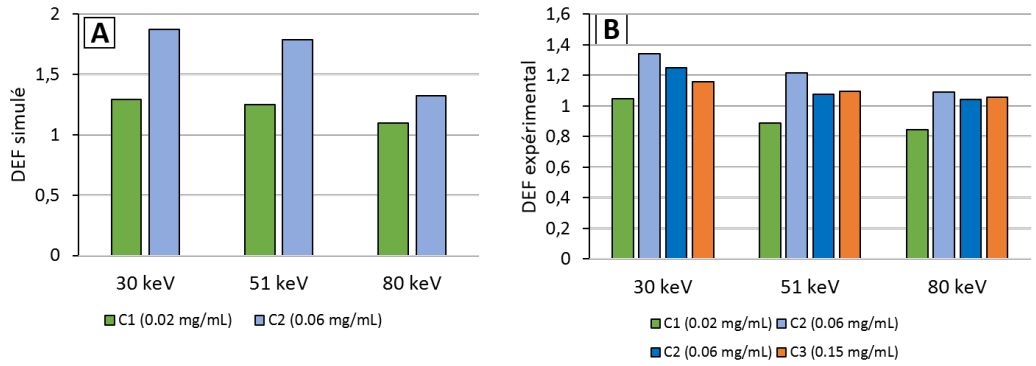


Figure 7.19 – *Comparaison entre le DEF macroscopique simulé lié à la masse de fer internalisée par cellule (A) et le DEF expérimental obtenu par ajustement du SER mesuré avec le modèle LQ (méthode tirée de [Delo 17]) (B). Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}.*

.

De plus, contrairement aux observations décrites dans cette publication pour les NPs Gd, le DEF théorique simulé en présence de fer est supérieur au DEF expérimental calculé d'après les SER. Les simulations sur-estimeraient donc l'efficacité des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose. Ces résultats sont cependant à prendre avec prudence. Tout d'abord, les DEF simulés dans la publication de Delorme ne sont pas des DEF macroscopiques : les auteurs ont pris en compte la répartition des NPs Gd dans la cellule. Cette géométrie a un impact sur le DEF et cet impact n'est pas pris en compte dans ces travaux de thèse.

D'autre part, il est intéressant de remarquer que la dose délivrée aux cellules lors des expériences est de 4 Gy. Une concentration de fer intracellulaire entrainant un DEF de 2 permettra alors d'augmenter la dose intracellulaire à 8 Gy. Une concentration de fer intracellulaire entraînant un DEF de 3 permettra d'augmenter la dose intracellulaire à 12 Gy. Or, à partir de 8 Gy, l'effet de l'irradiation seule suffit à détruire les cellules. Le gain apporté par le traitement engendrant un DEF de 3 par rapport à celui engendrant un DEF de 2 sera donc "masqué" par une mort cellulaire déjà conséquente au-delà d'une dose effective de 8 Gy. Ainsi, les mesures du SER aux fortes concentrations d'exposition (0.15 mg/mL) peuvent donc être biaisées par ce phénomène. Il

pourrait alors être bénéfique de délivrer seulement 2 Gy aux cellules lors des études *in vitro* de l'augmentation de dose par les NPs Fe.

Enfin, nous pouvons aussi nous demander si le modèle linéaire-quadratique est encore valide lors de l'exposition préalable des cellules aux NPs Fe. Même si ce modèle est largement utilisé dans les études, il reste aussi très controversé. Par exemple, Retif *et al.* soulignent le fait qu'aucun travail n'a prouvé que le modèle LQ pouvait décrire les relations dose-effet en présence de NPs [Reti 15]. Ce modèle est donc à utiliser avec précaution.

7.3.6 Irradiation de cellules exposées aux agents de contraste au Gd : augmentation de dose ou radiosensibilisation ?

Nous avons par ailleurs étudié le potentiel des agents de contraste au Gd pour augmenter la dose déposée dans les cellules tumorales. Certains aspects de cette étude sont résumés dans cette section à titre comparatif avec les NPs Fe. Les cellules ont été exposées pendant 24h à 5 mg(Gd)/mL de Dotarem ou de Magnevist. Dans un premier cas, les cellules ont été rincées avant l'irradiation, de manière à n'étudier que l'impact du Gd accumulé dans les cellules sur la survie (condition "cellules rincées"). Dans un second cas, les cellules ont été trypsinées puis resuspendues dans du milieu de culture contenant 5 mg(Gd)/mL avant irradiation (condition "cellules non rincées"). Les cellules ont ensuite été irradiées à trois énergies (dose délivrée : 4 Gy), juste en-dessous et juste au-dessus du K-edge du Gd (50 et 51 keV) et à 80 keV.

Composé	**Protocole d'irradiation**	**Concentrations mg(Gd)/mL**	**Energies d'irradiation (keV)**	**Doses (Gy)**	**Réplicats d'irradiation**
Dotarem	non rincé	5	50, 51 et 80	0 ou 4	3
	rincé	5	50, 51 et 80	0 ou 4	3
Magnevist	non rincé	5	50, 51 et 80	0 ou 4	3
	rincé	5	50, 51 et 80	0 ou 4	3

Les résultats des tests de clonogénicité sont présentés dans la figure 7.20. Tout d'abord, nous pouvons remarquer que le Magnevist induit une toxicité sans irradiation : l'effet mesuré est de 1.23 $\pm$ 0.03 pour les cellules rincées et 1.57 $\pm$ 0.18 pour les cellules non rincées. Le Dotarem n'a pas d'impact sur la viabilité des cellules à ces concentrations (toxicité : 1.03 $\pm$ 0.09 et 0.91 $\pm$ 0.14 pour les cellules rincées et non rincées respectivement).

L'exposition des cellules au Magnevist induit un effet sur la survie des cellules après irradiation, que les cellules aient ou non été rincées. Cet effet est plus important au-dessus du K-edge du Gd (effet significatif, ANOVA à deux facteurs, $p<0.0001$) : le SER à 51 keV est de 1.50 $\pm$ 0.01 pour les cellules rincées et 1.48 $\pm$ 0.11 pour les cellules non rincées. Il est intéressant de remarquer que l'effet est encore significatif à 80 keV (ANOVA à deux facteurs, $p<0.0001$ et $p=0.0002$ pour les cellules rincées et non rincées respectivement) : le SER à 80 keV est de 1.62 $\pm$ 0.12 pour les cellules rincées et 1.27 $\pm$ 0.12 pour les cellules non rincées.

L'exposition des cellules au Dotarem n'induit pas d'effet sur la survie des cellules après irradiation pour la condition rincée : le SER mesuré est proche de 1 pour chacune des trois énergies (0.87 $\pm$ 0.14, 0.88 $\pm$ 0.10 et 0.83 $\pm$ 0.05 pour des énergies d'irradiation respectives de 50, 51 et 80 keV). Par contre, un effet significatif (ANOVA à deux facteurs, $p<0.0001$ pour une irradiation à 51 et 80 keV) est obtenu pour la condition "cellules non rincées" aux énergies d'irradiation de 51 et 80 keV

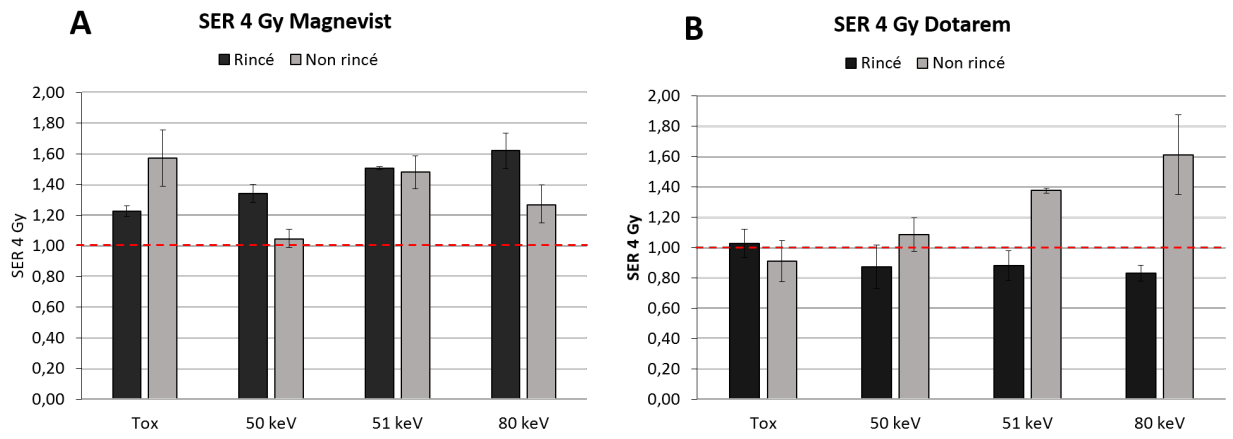


Figure 7.20 – *Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 50, 51 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux agents de contraste au Gd ((A) Magevist ou (B) Dotarem) à la concentration de 5 mg(Gd)/mL pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle). Les cellules ont été irradiées après avoir été rincées ou dans du milieu contenant 5 mg(Gd)/mL (condition "cellules non rincées").*

(SER de 1.38 ± 0.02 et 1.61 ± 0.26 respectivement).

Comparaison avec les simulations macroscopiques Monte-Carlo :

L'accumulation de Gd dans les cellules lors de cette expérience a été mesurée par ICP-MS. L'exposition des F98 à une concentration de 5 mg/mL d'agent de contraste mène à l'accumulation de 0.22 ± 0.04 pg/cellule pour le Dotarem et 0.52 ± 0.06 pg/cellule pour le Magnevist (données non montrées). Ces données ont été utilisées pour obtenir le DEF macroscopique intracellulaire par simulation Monte-Carlo (protocole : 4.1.3.1). Les résultats de ces simulations sont présentés dans la figure 7.21 (A). D'autre part, le DEF macroscopique obtenu pour la condition "cellules non rincées" (exposition des cellules à 5 mg(Gd)/mL) a aussi été simulé de la même manière (Fig. 7.21 (B)).

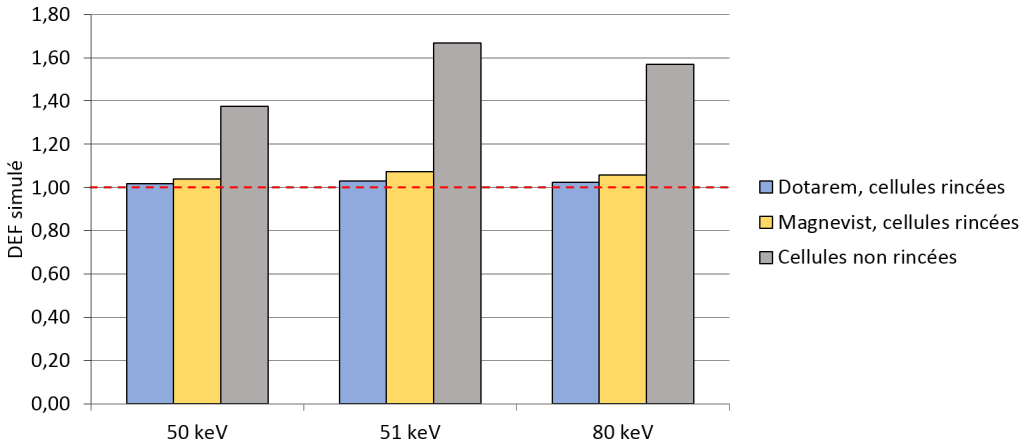


Figure 7.21 – *DEF macroscopique correspondant à la concentration intracellulaire de Gd dans les cellules rincées après avoir été exposées à 5 mg/mL d'agent de contraste au Gd (Magnevist ou Dotarem) pendant 24 h ou à la concentration (5 mg/mL) de Gd externe aux cellules pour la condition "cellules non rincées". Le DEF a été calculé par simulations Monte-Carlo selon le protocole décrit dans la section 4.1.3.1. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}.*

D'après les simulations, l'augmentation de dose lors de l'irradiation des cellules rincées est très modérée : le DEF le plus grand est obtenu à 51 keV pour le Magnevist et sa valeur est alors de 1.07. Les SER obtenus pour cette condition avec le Dotarem sont cohérents avec les DEF théoriques (bien que nous ne puissions pas comparer directement ces deux valeurs) : aucun effet n'est observé pour la condition rincée, quelque soit l'énergie d'irradiation. Cependant, les SER obtenus pour la condition "cellules rincées" avec le Magnevist sont élevés (1.34 ± 0.06, 1.50 ± 0.01 et 1.62 ± 0.12 pour des irradiations respectives à 50, 51 et 80 keV). Ces résultats suggèrent l'existence d'un effet additionnel à l'augmentation de dose physique dans le cas du Magnevist. L'étude de la survie des cellules après exposition aux AC Gd pendant 24h montre que le Magnevist est plus toxique que le Dotarem (53 ± 3 % de survie à 5 mg/mL pour le Magnevist contre 72 ± 1% pour le Dotarem) pour une même concentration dans le milieu de culture (mesures MTT, voir figure 7.22). En plus de l'augmentation de dose, le Magnevist aurait peut-être un effet radiosensibilisant sur les cellules pouvant provenir de sa moins bonne efficacité à complexer le Gd, ce qui peut conduire à une libération de Gd libre dans les cellules, expliquant la toxicité. Le Dotarem, plus stable, engendrerait moins de toxicité et l'effet radiosensibilisant n'apparaîtrait donc pas pour la concentration étudiée.

Les simulations Monte-Carlo suggèrent que le DEF macroscopique obtenu pour la condition "cellules non rincées" dépend de l'énergie d'irradiation. Le DEF est de 1.38 à 50 keV, atteint un maximum de 1.67 à 51 keV puis décroît après le K-edge du Gd pour atteindre la valeur de 1.57 à 80 keV. Les SER expérimentaux montrent que l'exposition préalable des cellules aux AC Gd à 5 mg(Gd)/mL induit un effet significatif sur la survie de cellules (voir tests statistiques présentés dans le paragraphe précédent) après irradiation. Les SER suivent la même tendance de dépendance à l'énergie d'irradiation que le DEF simulé, à l'exception du Dotarem à 80 keV pour lequel le SER est plus élevé qu'à 51 keV. Ces résultats suggèrent qu'il serait possible d'obtenir un effet thérapeutique grâce aux agents de contraste au Gd, à des concentrations suffisamment élevées dans la tumeur. Cet effet est encore significatif à 80 keV (Magnevist, conditions "cellules rincées et non rincées" ; Dotarem, condition "cellules non rincées"), ce qui est encourageant car l'utilisation d'un faisceau de 80 keV pour traiter les gliomes reste pertinente.

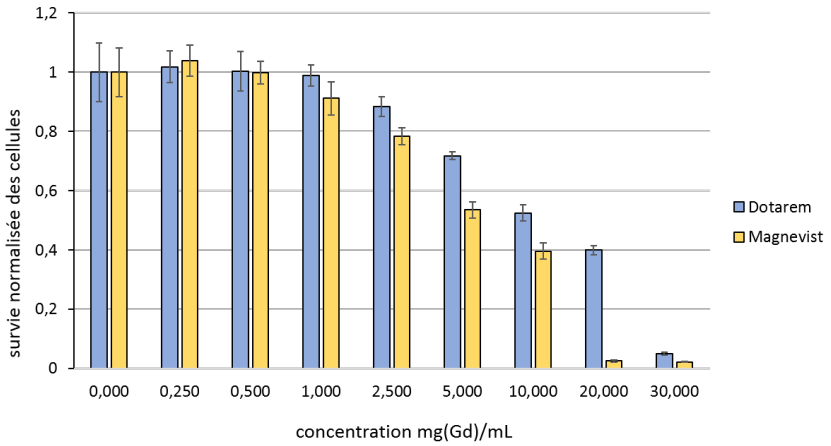


Figure 7.22 – *Survie normalisée des cellules F98 après exposition à deux agents de contraste au Gd (Dotarem et Magnevist) pendant 24 h, mesurée par test MTT.*

7.4 Importance de l'outil de mesure de la survie cellulaire

7.4.1 Test ATP-lite et suivi IncuCyte

Le même type d'expériences de survie cellulaire après exposition pendant 24h aux NPs Fe de l'équipe coréenne a été réalisé en mesurant la survie à l'aide du test ATP-lite (protocole : voir B.3.2). Les plaques 96 puits ont été analysées 2 ou 7 jours après irradiation des cellules. Cette méthode n'a pas permis de montrer une influence de NPs Fe sur la survie des cellules, que ce soit avec ou sans irradiation.

D'autre part, lors d'une expérience additionnelle non présentée dans ce manuscrit, les cellules irradiées ont été ensemencées dans des plaques 96 puits pour suivi pendant plusieurs jours à l'IncuCyte (collaboration : Emmanuelle Soleilhac, CEA, Grenoble) ou suivi par test MTT. Les courbes de prolifération ne permettent pas de mesurer un impact de l'exposition des cellules aux NPs Fe préalablement à l'irradiation sur la prolifération cellulaire après irradiation, bien que cet effet soit par la suite visible sur le suivi MTT.

Ces résultats montrent tout d'abord l'importance de la mise au point de la méthode de mesure de la survie cellulaire. L'absence d'effet significatif peut, par exemple, être du à un protocole de mesure de la survie non adapté à la lignée cellulaire. D'autre part, ces résultats soulignent aussi l'importance du type de test utilisé. Cette réflexion représente l'un des axes majeurs de ce chapitre de mesure de la survie cellulaire après irradiation.

7.4.2 Comparaison test clonogénique et MTT

Le test habituellement utilisé pour mesurer la survie cellulaire après irradiation est le test de clonogénicité. Cependant, ce test demande beaucoup de matériel et de temps et ne permet pas de tester de nombreuses conditions en une seule expérience. Un autre test a été développé durant ces travaux : le suivi sur 10 jours de la prolifération des cellules par test MT. Ce protocole permet de mesurer un décalage temporel dans la prolifération des cellules et ne donne pas directement de mesure de SER. Nous avons donc cherché à relier les paramètres obtenus par ajustement des courbes expérimentales du suivi MTT (décalage temporel, pente au point d'inflexion) au SER calculé à partir des résultats du test de clonogénicité.

Les premières tentatives de construction d'une relation entre les décalages temporels mesurés par MTT et les SER calculés par clonogénicité ont été infructueuses. Parmi elles, nous pouvons citer diverses stratégies visant à obtenir le nombre de cellules mortes juste après irradiation, puis le nombre de cellules subissant une mort différée, par des ajustements des courbes pendant la phase de croissance exponentielle, ou encore l'application de la théorie de Verhulst adaptée à notre contexte. Il peut aussi être envisageable de fonctionner avec une méthode empirique, en réalisant des expériences pilote permettant de trouver une relation expérimentale entre les SER mesurés par test de clonogénicité et les délais mesurés par MTT. Cependant, cette méthode ne prendrait pas en compte la composante de mort cellulaire différée inclue dans la mesure de la pente au point d'inflexion.

D'autres auteurs de la littérature cherchent à obtenir un SER grâce au suivi MTT de cellules irradiées. A notre connaissance, deux méthodes sont employées : soit le SER est calculé par le ratio des absorbances mesurées à un temps donné (nous reviendrons par la suite sur cette méthode), soit le SER est calculé à partir du délai temporel mesuré entre les courbes de croissance des cellules contrôle et irradiées.

7.4.2.1 Méthode de Buch

La méthode de Buch *et al.* permet d'obtenir un SER à partir du délai temporel entre les courbes de prolifération des cellules contrôle et irradiées obtenues par test MTT multiple [Buch 12]. Pour cela, les temps auxquels chaque courbe atteint une absorbance donnée sont relevés. Le délai entre ces temps, t_{delay}, est ensuite introduit dans l'équation suivante, permettant ainsi d'obtenir la survie pour une condition d'irradiation :

$$S = 2^{-t_{delay}/t_D} \tag{7.12}$$

avec t_D le temps de doublement des cellules. La publication ne précise pas quel temps de doublement est utilisé. Les auteurs n'indiquent pas non plus l'origine de cette équation.

Nous pouvons retrouver une équation identique en faisant le raisonnement suivant, illustré par la figure 7.23.

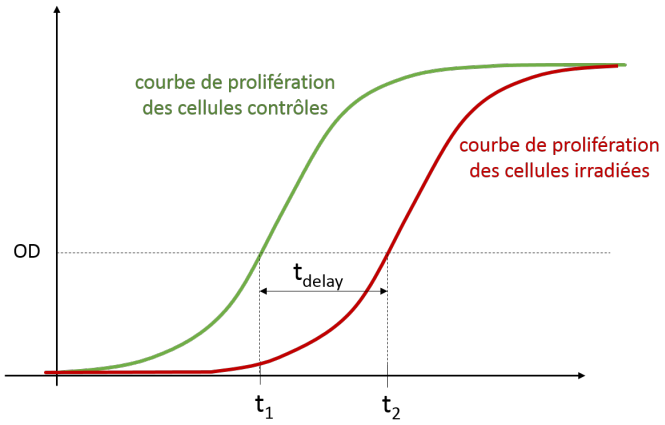


Figure 7.23 – *Schéma illustrant l'utilisation des données obtenues par suivi MTT pour calculer la survie cellulaire.*

La survie des cellules s'écrit sous la forme :

$$S = \frac{\text{nombre de cellules survivantes}}{\text{nombre de cellules ensemencées}} \tag{7.13}$$

La survie normalisée des cellules irradiées à 4 Gy est la survie des cellules irradiées à 4 Gy normalisée par la survie des cellules contrôle :

$$S_4 = \frac{\text{nombre de cellules irradiées survivantes}}{\text{nombre de cellules contrôle survivantes}} \tag{7.14}$$

A l'instant t_1, le nombre de cellules contrôle peut s'écrire de la forme $N_0 \cdot 2^{t_1/t_{D0}}$ (fig. 7.23), avec N_0 le nombre de cellules contrôle vivantes lors de l'ensemencement et t_{D0} le temps de division de ces cellules.

A l'instant t_2, le nombre de cellules irradiées à 4 Gy peut s'écrire de la forme $N_4 \cdot 2^{t_2/t_{D4}}$, avec N_4 le nombre de cellules irradiées vivantes lors de l'ensemencement et t_{D4} le temps de division des cellules irradiées.

En réalité, les temps de doublement mesurés ainsi ne sont pas de vrais temps de doublement, en particulier dans le cas des cellules irradiées. En effet, le "temps de doublement" mesuré ici indique

la vitesse de prolifération des cellules et rend compte de plusieurs composantes : le vrai temps de doublement des cellules, mais aussi le blocage des cellules dans leur cycle et la mort différée des cellules tout au long du suivi, qui vont ralentir la prolifération générale des cellules.

Dans ce cas, fixons t_{D0}, le vrai temps de doublement des cellules. Tous les autres composantes se répercutent ainsi dans le nombre N_4, qui devient le nombre de cellules irradiées vivantes lors de l'ensemencement en considérant que tous les dommages (mort cellulaire d'emblée et mort cellulaire différée) ont eu lieu avant l'ensemencement.

Nous pouvons donc écrire qu'à l'instant t_2, le nombre de cellules irradiées présentes dans le puits est de $N_4 \cdot 2^{t_2/t_{D0}}$. Comme nous avons choisi les instants t_1 et t_2 de manière à avoir la même densité optique pour les cellules irradiées et contrôle, le nombre de cellules à ces instants est identique. Il est donc possible d'écrire l'égalité suivante :

$$N_4 \cdot 2^{t_2/t_{D0}} = N_0 \cdot 2^{t_1/t_{D0}} \tag{7.15}$$

La survie des cellules irradiées est donc égale à :

$$S_4 = \frac{\text{nombre de cellules irradiées survivantes}}{\text{nombre de cellules contrôle survivantes}} = \frac{N_4}{N_0} = \frac{2^{t_1/t_{D0}}}{2^{t_2/t_{D0}}} \tag{7.16}$$

d'où

$$S_4 = 2^{(t_1-t_2)/t_{D0}} = 2^{-t_{delay}/t_{D0}} \tag{7.17}$$

Ce raisonnement est simplement une hypothèse et n'est pas explicité par les auteurs de l'article. Cependant, il permet de conforter le fait que le temps de doublement à considérer dans la formule est bien le **temps de doublement des cellules contrôle**.

Protocole de traitement des données MTT :

Le temps de doublement des cellules non irradiées est calculé en ajustant la phase exponentielle des courbes de suivi MTT avec une fonction exponentielle croissante. D'autre part, les délais entre les courbes des cellules contrôle et des cellules irradiées est calculé grâce à l'ajustement des courbes de prolifération avec une fonction sigmoïde, qui donne le paramètre $IC(50)$ (voir 7.23). A 0 Gy, les délais sont calculés entre la courbe des cellules exposées aux NPs Fe et celle des cellules contrôle. A 4 Gy, les délais sont calculés entre la courbe des cellules irradiées et non irradiées pour chaque condition. Cela permet de s'affranchir de la toxicité, de manière à obtenir des résultats comparables avec les mesures de clonogénicité. Le temps de doublement et les délais permettent de calculer les survies, et donc les SER.

Les résultats sont présentés dans la figure 7.24 (B) et comparés aux SER obtenus par test de clonogénicité (Fig. 7.24 (A)) :

Nous pouvons observer que les SER mesurés par MTT suivent la même tendance que les SER mesurés par clonogénicité, que ce soit par rapport à l'énergie d'irradiation ou la concentration. Les valeurs des SER diffèrent pour une même condition étudiée, particulièrement dans les cas où le SER devient élevé. Par exemple, pour une énergie d'irradiation de 30 keV, le SER mesuré par clonogénicité pour la concentration de 0.06 mg/mL (expérience 1) est de 1.76 ± 0.30, tandis qu'il est de 5.3 pour les calculs provenant du suivi MTT. Le fait que les deux méthodes ne donnent pas la même valeur de SER n'est pas surprenant car ces deux méthodes ne sont pas fondées sur la mesure des mêmes propriétés cellulaires. Toutefois, ces deux valeurs de SER semblent liées par une

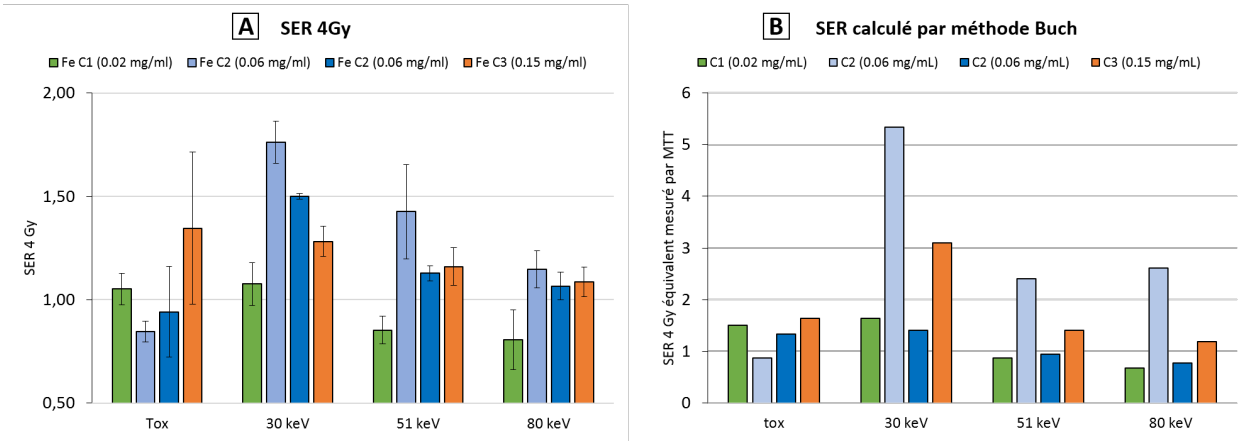


Figure 7.24 – *Comparaison des SER obtenus lors des deux expériences présentées dans ce chapitre par tests de clonogénicité (A) ou par suivi MTT (méthode de Buch [Buch 12]) (B).*

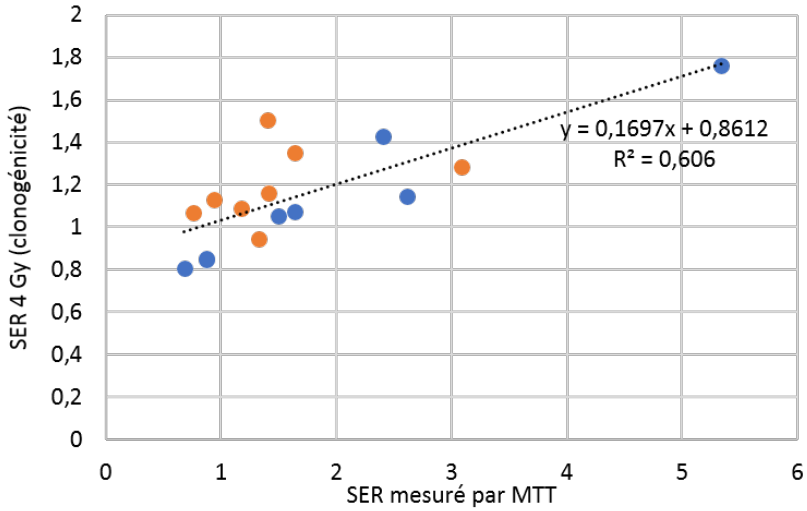


Figure 7.25 – *Relation entre les SER mesurés par clonogénicité et les SER mesurés par MTT ([bleu] : expérience 1 ; [orange] : expérience 2).*

relation linéaire, comme l'illustre la figure 7.25 (le R^2 de 0.606 suggère cependant que les valeurs restent assez dispersées).

Aucun article à notre connaissance ne présente des courbes similaires aux nôtres. L'étude de la sigmoïde entière permet de fixer "automatiquement" le calcul du délai. Nous ne calculons donc pas le délai à partir d'une DO (Densité Optique) fixée mais à partir du point d'inflexion de la courbe. Ce choix est bien sûr discutable et il serait intéressant de savoir s'il est préférable ou non de fonctionner de la sorte.

7.4.2.2 Discussion : SER mesuré par MTT ou par test de clonogénicité

Les fonctionnements de ces deux méthodes de mesure sont différents : il semble donc normal que les deux méthodes donnent des valeurs de SER différentes pour une même condition expérimentale. Il est intéressant de remarquer que ces deux valeurs de SER semblent néanmoins corrélées par une

relation linéaire selon la courbe 7.25. Cette relation permettrait donc d'estimer la valeur du SER qui aurait été obtenue par test de clonogénicité à partir de la mesure du "SER" obtenue par suivi MTT.

D'une part, **le test de clonogénicité** a l'avantage d'être stable et robuste. Il est considéré comme le *gold standard* dans le domaine. Ce test permet d'obtenir directement une survie cellulaire à partir du comptage des colonies. Cependant, il est coûteux en matériel et en temps et n'est pas applicable pour les cellules qui ne peuvent pas former de colonies.

D'autre part, **le suivi MTT** reste moins coûteux en matériel, mais n'est pas vraiment moins coûteux en temps si l'on réalise le suivi sur 10 jours avec trois réplicats d'irradiation. La mesure du délai entre deux courbes est calculée grâce à dix points de mesure, et chaque point est le résultat de 6 mesures. Une mesure erratique impacte donc peu le résultat final. Cependant, le résultat donné par ce suivi MTT n'est pas directement comparable à celui obtenu par le test de clonogénicité. Ce dernier étant reconnu comme le test de référence, il est tentant de pouvoir corréler les deux mesures pour donner du poids à nos résultats.

Le test de clonogénicité repose sur le principe qu'une cellule est considérée comme "morte" lorsqu'elle ne parvient pas à former une colonie de plus de 50 cellules (c'est-à-dire, en pratique, visible à l'oeil nu) après une dizaine de jours. Le résultat du test permet donc de dire combien de cellules ont pu former une colonie, mais il n'indique pas à quel point chacune de ces cellules est "active". Par exemple, les colonies formées par les cellules irradiées sont en général plus petites que les colonies des cellules contrôle. La **taille de la colonie** peut donc être un paramètre intéressant à prendre en compte. Cependant, rares sont les études ayant réussi à extraire des données exploitables de ce type de mesure. L'essai a aussi été fait pendant ces travaux, et les colonies ont été classées dans trois catégories selon leur taille. Cette tentative n'a pas permis de tirer de conclusion (données non montrées). Au contraire, le suivi MTT sur 10 jours permet de rendre compte de l'existence de cellules "en pause", puis de la reprise de leur prolifération. Une cellule peu active synthétisera moins de cristaux de formazan. Le suivi MTT, bien qu'il ne donne pas les mêmes informations que le test de clonogénicité, apporte donc d'autres données intéressantes.

Ces études ne permettent pas de trancher sur l'utilisation de l'un ou l'autre des deux tests. Chacun a ses avantages et ses inconvénients, et il semble même intéressant de coupler les deux. Le suivi MTT, effectué en triplicats d'irradiation, ne permet un gain de temps lors de l'expérience que le jour de l'irradiation, si les cellules sont ensemencées et irradiées en plaque (car cela évite les comptages en parallèle de l'irradiation). Cependant, cette stratégie d'irradiation en plaques est difficilement applicable aux NPs Fe que nous ne parvenons pas à bien rincer. Elle serait par contre intéressante pour étudier de l'effet des AC Gd lors de l'irradiation.

Le test MTT a l'intérêt d'être simple et rapide lorsqu'il n'est pas effectué sur un suivi de 10 jours. Il pourrait donc être utilisé pour "dégrossir" les paramètres expérimentaux à tester. Il s'agirait donc de mesurer la viabilité des cellules seulement à un temps après irradiation. Le choix de ce temps est alors crucial car si la mesure est faite pendant la phase de latence après irradiation (donc trop tôt) ou dans la phase de confluence (donc trop tard), la valeur mesurée sera biaisée [Pric 90, Nikz 13]. Dans plusieurs études, ce temps est fixé à 7 jours [Kim 93, Irwi 14] voire 14 jours [Bana 99]. En effet, en réalisant la mesure juste après l'irradiation, la mort différée des cellules n'est pas prise en compte et les valeurs s'éloignent des résultats de clonogénicité [Chun 15]. Carmichael conseille d'attendre au moins 6 temps de doublement des cellules [Carm 87].

7.4.3 Quels outils pour les NPs ?

Les NPs offrent de nouvelles opportunités pour le traitement du cancer, que ce soit dans le domaine du diagnostic ou de la thérapie. Cet outil est très prometteur et fait l'objet d'un nombre croissant d'études dans des domaines scientifiques variés. Toutefois, les propriétés des NPs sont encore peu connues et, malgré un nombre conséquent de publications et d'études *in vitro* et *in vivo*, très peu de ces composés parviennent aux phases d'étude clinique. Ce fait peut s'expliquer en partie par l'absence de standardisation des protocoles précliniques, qui visent la plupart du temps à prouver un effet thérapeutique et non à l'optimisation de la nanoparticule. Plusieurs auteurs regrettent d'ailleurs le manque de méthodologie pour l'étude des NPs, ce qui constitue finalement un frein pour l'évolution de ce type de traitement [Dawi 15, Reti 15, Subi 16]. Ils recommandent donc des méthodologies ou des lignes de conduite à adopter pour pouvoir évaluer l'efficacité des NPs, que ce soit *in vitro* ou en études précliniques.

Cette problématique est renforcée par le fait que les outils disponibles pour caractériser les cellules cancéreuses et leurs réponses aux traitements ne sont pas tous compatibles avec l'usage des NPs. En effet, intégrer des NPs dans les tests habituels demande souvent une adaptation spécifique. Par exemple, l'utilisation des tests MTT ou ATP-lite a été tout d'abord expérimentée au cours d'études préliminaires pour vérifier que les NPs ne perturbaient pas la mesure. Les suivis par IncuCyte *via* l'utilisation de marqueurs fluorescents de l'apoptose se sont révélés impossibles car les NPs opaques empêchent le bon fonctionnement du traitement d'images intégré dans le logiciel.

Il semble donc important de développer des méthodes systématiques et fiables, reconnues et utilisées par la communauté scientifique, de façon à homogénéiser les résultats et les notations. Cela permettra probablement d'aider à l'optimisation des NPs et à l'améliorations des connaissances les concernant, pour rendre possible le passage au stade clinique de tous ces résultats prometteurs.

7.5 Le Chapitre 7 en quelques mots

L'étude présentée dans ce chapitre avait pour objectif de confirmer le potentiel des NPs Fe pour renforcer la dose *in vitro*. L'effet thérapeutique est quantifié par le **SER**, c'est-à-dire le ratio entre la survie des cellules irradiées non exposées aux NPs et la survie des cellules irradiées exposées aux NPs. Le SER ne prend pas en compte la toxicité induite sans irradiation. Un SER de 2 indique donc que l'exposition préalable des cellules aux NPs augmente la mort cellulaire par 2 lors de l'irradiation par rapport aux cellules traitées non irradiées. Dans le cas d'une éventuelle toxicité additionnelle des NPs mesurée pour les cellules non irradiées, la valeur du SER ne changera pas mais le ratio brut des survies donnera un résultat supérieur à 2 (ajout de la composante de toxicité sans irradiation).

Les résultats obtenus sont plutôt cohérents avec les simulations de dépôt de dose macroscopique :

- Le SER dépend de l'énergie d'irradiation. Par exemple, l'exposition préalable des F98 aux NPs Fe de l'équipe coréenne concentrées à 0.06 mg(Fe)/mL induit un SER de 1.76 ± 0.30 pour une énergie d'irradiation de 30 keV. Le SER diminue ensuite lorsque l'énergie d'irradiation augmente : il est de 1.15 ± 0.11 pour une irradiation à 80 keV. Cette dépendance à l'énergie suggère le rôle de l'effet photoélectrique dans l'augmentation de la mort cellulaire engendrée.
- Le SER dépend de la concentration d'exposition : le SER mesuré pour les cellules

exposées à 0.02 mg(Fe)/mL est de 1.08 ± 0.17 pour une énergie d'irradiation de 30 keV, contre 1.76 ± 0.30 pour les cellules exposées à 0.06 mg(Fe)/mL.

D'autres phénomènes entrent en jeu et les résultats ne peuvent pas toujours être expliqués par les seuls mécanismes pris en compte dans les simulations. La taille des NPs varie d'une expérience à l'autre. Pour une même concentration d'exposition, la masse de fer internalisée par les cellules peut donc être amenée à changer entre deux expériences (pour une concentration d'exposition de 0.06 mg(Fe)/mL, les cellules accumulent 21 ± 3 pg(Fe)/cellule dans l'expérience 1 contre 144 ± 23 pg(Fe)/cellule dans l'expérience 2). Deux phénomènes pourraient alors intervenir :

- Pour une même taille de NPs, la plus haute concentration d'exposition induit moins de mort cellulaire qu'une concentration intermédiaire (à 30 keV, le SER mesuré pour une exposition préalable des cellules à 0.15 mg(Fe)/mL est de 1.28 ± 0.41 contre 1.50 ± 0.05 pour une exposition à 0.06 mg/mL). Ce phénomène peut être expliqué en partie par l'augmentation de la résistance des cellules suite aux 24h d'incubation avec les NPs (*e.g.* blocage en phase S, activation de la réparation des dommages à l'ADN).
- Pour une même concentration d'exposition mais deux lots différents de NPs, le SER le plus important est obtenu avec les NPs les moins internalisées par les cellules (SER à 30 keV pour une concentration d'exposition de 0.06 mg(Fe)/mL : 1.76 ± 0.30 pour le lot 1 et 1.50 ± 0.05 pour le lot 2), ce qui va à l'encontre des simulations macroscopiques. Ces résultats suggéreraient que les NPs Fe de grand diamètre (plus efficacement internalisées que les NPs de petit diamètre) seraient moins efficaces pour augmenter la dose : les électrons de basse énergie (*i.e.* électrons Auger) pourraient par exemple être auto-absorbés par les NPs.

Chapitre 8

Etude préclinique : augmentation de dose par injection de NPs Fe chez le rat porteur de gliome F98

Cette étude préclinique avait pour objectif de confirmer le potentiel des NPs Fe de l'équipe coréenne pour augmenter la dose lors d'une irradiation aux rayons X. Suite aux encourageants résultats *in silico* et *in vitro* obtenus pour des énergies voisines de 30 keV, nous avons étudié la possibilité d'appliquer cette stratégie *in vivo*. Ce chapitre est consacré aux résultats de cette étude.

8.1 Matériels et Méthodes

40 rats Fischer ont reçu dans le noyau caudé droit 5 000 cellules de gliome de rat F98 (coordonnées stéréotaxiques : 3.5 mm à droite du bregma et 5.5 mm de profondeur par rapport à la surface de l'os, aiguille Hamilton 32G) selon le protocole décrit dans B.6.1 et [Rous 09b].

Six groupes ont été constitués :
- un groupe de rats témoin (N=5),
- un groupe recevant les NPs par voie intraveineuse "iv" (n=5),
- un groupe recevant les NPs par voie intracérébrale "CED" (n=5),
- un groupe recevant l'irradiation seulement (X) (n=5),
- un groupe recevant les NPs par voie intraveineuse et l'irradiation "iv+X" (n=10),
- un groupe recevant les NPs par voie intracérébrale CED et l'irradiation "CED+X" (n=10).

Injection des nanoparticules : après sonication, les nanoparticules ont été injectées aux rats par deux méthodes différentes : soit par injection veineuse, soit par injection intracérébrale.

Injection intraveineuse : huit jours après l'inoculation de la tumeur, 1 mL de NPs fer concentrées à 44 mg (Fe)/mL ont été injectées par une veine caudale du rat.

Injection CED : huit jours après l'inoculation de la tumeur, 20 µL de NPs fer concentrées à 1.78 mg (Fe)/mL ont été injectées aux mêmes cordonnées stéréotaxiques que l'inoculation tumorale, à très faible débit (1 µL/min) par *Convection-Enhanced Delivery* (CED) (seringue Hamilton et aiguille 32 G).

Que ce soit pour l'imagerie ou pour l'irradiation, le rat est anesthésié par un mélange kétamine/ xylazine (64.5/5.4 mg/kg, injection intrapéritonéale) après induction de l'anesthésie par un mélange

air/isoflurane (3%). Une fois anesthésié, le rat est placé sur un cadre stéréotaxique en plexiglas. Ce cadre est ensuite fixé verticalement sur le support de rotation.

Irradiation : neuf jours après inoculation de la tumeur, les rats ont reçu une dose de 20.8 Gy. L'énergie du faisceau monochromatique a été réglée à 35 keV. Après réalisation d'une tomographie 3D de la tête de l'animal, la tumeur est placée au centre de rotation du système ; des lames de tungstène permettent de collimater le faisceau (8 mm de largeur, hauteur 1 mm), centrées sur le centre de la tumeur. L'irradiation est ensuite réalisée en mode tomographique par arcs contigus de 360°, selon le protocole décrit en détail dans [Rous 09b]. La hauteur du faisceau étant limité, le sujet est translaté verticalement (de la hauteur d'une coupe) entre chaque rotation de 360°.

Imagerie tomographique : après traitement, tous les rats ont reçu 1 mL d'Iomeron© 400 mg/mL, suivi de 0.5 mL de sérum physiologique par la veine caudale pour obtenir une image de la tumeur (voir Fig. 8.1).

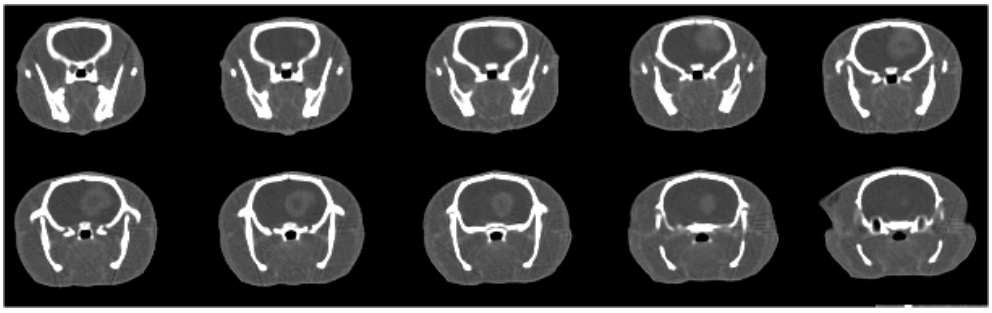


Figure 8.1 – *Exemple d'images tomographiques obtenues avec le détecteur germanium, après injection d'agents de contraste par la veine de la queue.*

Les animaux ont été suivis jusqu'à la fin de la survie.

8.2 Résultats et discussion

Des courbes Kaplan-Meier ont été tracées pour tous les groupes (cf Fig. 8.2). Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel JMP. La figure 8.2 (A) indique la survie des rats témoins et des rats ayant reçu les injections intraveineuse ou CED seulement. La figure 8.2 (B) compare la survie des rats témoins et ceux irradiés seulement. La figure 8.2 (C) compare la survie des animaux ayant reçu uniquement la radiothérapie ou la combinaison injection intraveineuse et radiothérapie. La figure 8.2 (D) compare la survie des animaux ayant reçu uniquement la radiothérapie ou la combinaison injection CED et radiothérapie.

La médiane de survie des animaux selon le traitement et la différence relative d'augmentation de la survie médiane par rapport aux témoins sont indiquées dans le tableau **8.1**.

- La survie des rats témoins ou injectés par voie intraveineuse ou CED ne sont pas significativement différentes (*Log-rank test*, $p > 0.9$).
- Le traitement par rayons X augmente significativement la survie des animaux par rapport aux témoins (*Log-rank test*, $p < 0.05$).
- La différence de survie entre les rats irradiés après l'injection intraveineuse et traités par radiothérapie en comparaison avec les animaux ayant reçu la radiothérapie seule est à la

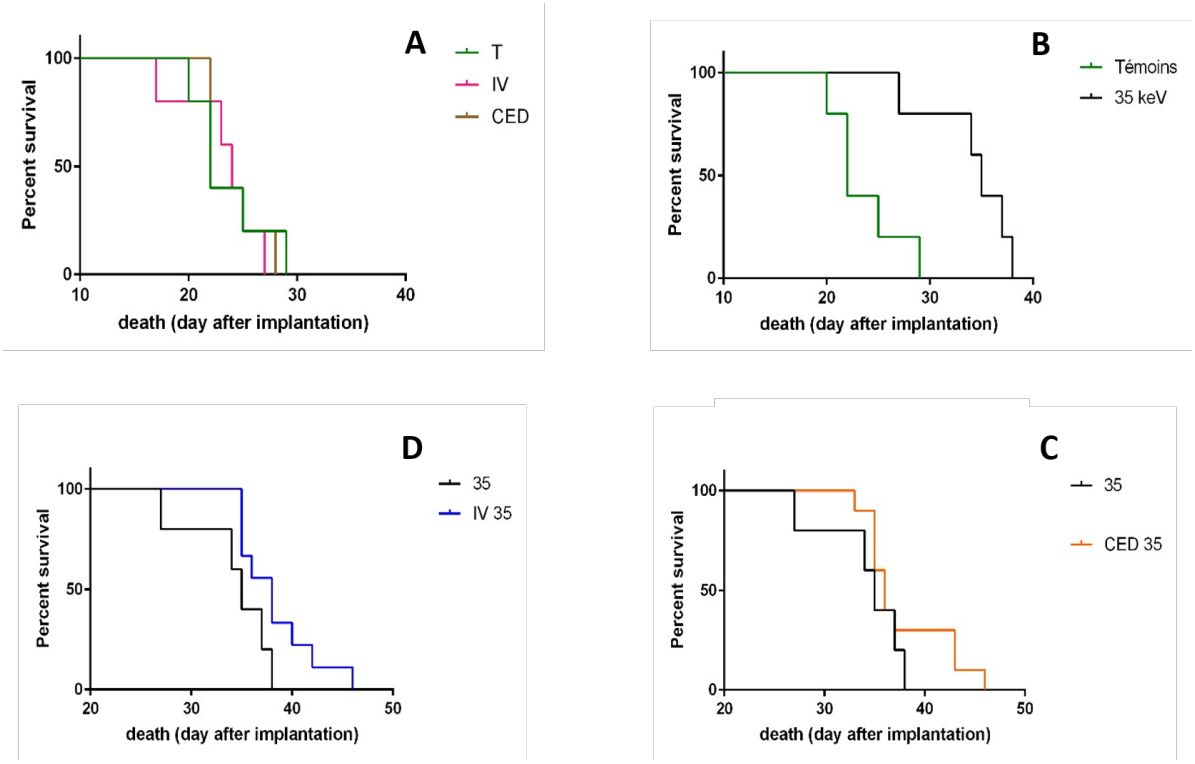


Figure 8.2 – *Courbes Kaplan-Meier de survie des animaux porteurs de tumeur F98 après irradiation, avec ou sans injection préalable de NPs. Les rats ont été répartis dans 6 groupes : trois groupes non irradiés ont reçu soit aucune NP Fe (n=5), soit des NPs Fe par CED (CED, n=5) ou par injection intraveineuse (iv, n=5). Trois autres groupes ont aussi reçu un traitement par radiothérapie, consistant en une fraction de 20.8 Gy délivrée à 35 keV centrés sur la tumeur avec aucune NP Fe (X, n=5), une injection par CED (CED+X, n=10) ou une injection intraveineuse de NPs Fe (IV+X, n=10).*

Groupes	survie médiane	% ILS	*Log-Rank* test
Témoins	22		
iv	24	9	p=0.91 /témoins
CED	24	9	p=0.93 /témoins
X	35	59	p<0.001/témoins
iv+X	38	73	p=0.07 / X seuls
CED+X	36	64	p=0.24 /X seuls

Table 8.1 – *Survie des rats selon les traitements : survie médiane, pourcentage d'augmentation de la survie médiane par rapport aux témoins : ILS % = (Survie – Survie témoins) / Survie témoins et valeur du test Log-Rank par rapport aux témoins et par rapport aux X seuls selon les groupes.*

limite de la significativité (*Log-rank test*, p= 0.07). Les rats ayant reçu la combinaison des traitements vivent quelques jours de plus par rapport au traitement par rayons X seul.

- La différence de survie entre les rats irradiés après l'injection CED et traités par radiothérapie en comparaison avec les animaux ayant reçu la radiothérapie seule n'atteint pas le niveau de significativité bien qu'elle soit très légèrement en faveur du traitement CED+X (*Log-rank test*, p = 0.24).

Après les résultats prometteurs obtenus *in silico* et au cours d'études *in vitro*, nous espérions une différence plus grande des survies après combinaison des traitements CED+X ou iv+X par

rapport aux X seuls. Une analyse histologique des cerveaux est en cours : elle pourra apporter des renseignements sur l'origine de la reprise tumorale.

Cette étude pilote a permis de montrer que les animaux ont tous bien toléré les injections de NPs Fe, qu'elles soient réalisées par voie veineuse ou par voie intracérébrale (différence des survies iv et CED non significatives par rapport au témoin). Tous les animaux ont repris du poids après injection et seule une coloration des urines après injection i.v. a été notée. Pour certains animaux ayant reçu les nanoparticules par i.v. dans la veine de la queue, une coloration violacée de la queue a pu être observée sans autre conséquence. D'autres études seront à envisager pour optimiser le timing entre l'injection des nanoparticules et l'irradiation ainsi que les volumes à injecter et irradier.

Ce résultat est décevant en comparaison avec les résultats de survie obtenus sur les tumeurs sous cutanées pour les mêmes NPs Fe de l'équipe coréenne [Choi 12a]. Cette différence souligne l'obstacle majeur que représente la BHE pour l'application de cette approche thérapeutique aux traitements des gliomes.

Troisième partie

Résultats et discussion : transport et délivrance des NPs

Chapitre 9

Approche Cheval de Troie : résultats *in vitro*

Sommaire

9.1 Matériels et méthodes 203
9.2 Résultats : exposition des Mo/Ma au FerInject 203
9.2.1 Internalisation des NPs Fe par les macrophages de lignées 203
9.2.2 Quantification de la masse de fer internalisée par les monocytes/macrophages 205
9.2.3 Impact de l'internalisation du FerInject sur la viabilité des cellules 206
9.3 Discussion 206
9.3.1 Internalisation des NPs Fe par les macrophages de lignées 206
9.3.2 Impact de l'internalisation du FerInject sur les monocytes-macrophages . . 208
9.4 Le Chapitre 9 en quelques mots 209

Objectif : vérifier *in vitro* le potentiel des Mo/Ma comme vecteurs des NPs Fe

Ce travail de thèse comporte deux problématiques : les NPs Fe ont été étudiées dans la partie précédente comme composé permettant d'augmenter le dépôt de dose dans la tumeur. Cette deuxième partie regroupe les résultats de l'étude de deux stratégies permettant de distribuer les composés dans la tumeur : la méthode "Cheval de Troie", qui concernera les deux premiers chapitres, et l'ouverture de la BHE par ultrasons, qui sera abordée dans le troisième et dernier chapitre, à titre d'ouverture.

L'approche "Cheval de Troie" repose sur l'utilisation de cellules immunitaires, les monocytes/macrophages, pour transporter les NPs jusque dans la tumeur. De par leurs propriétés intrinsèques, les monocytes/macrophages sont capables d'accumuler les composés. D'autre part, ils sont attirés par les zones inflammées et possèdent l'aptitude de traverser la BHE. La stratégie "Cheval de Troie" peut être synthétisée par le schéma suivant (Fig. 9.1) :

- Les monocytes/macrophages (Mo/Ma) sont chargés de NPs de fer *ex vivo*.
- La tumeur est pré-irradiée par MRT pour augmenter son potentiel attracteur pour les Mo/Ma.
- Les Mo/Ma sont injectés par voie intra-veineuse.
- Les Mo/Ma traversent la BHE et migrent dans la tumeur.
- La tumeur est irradiée à basse énergie pour "photoactiver" les NPs de fer.

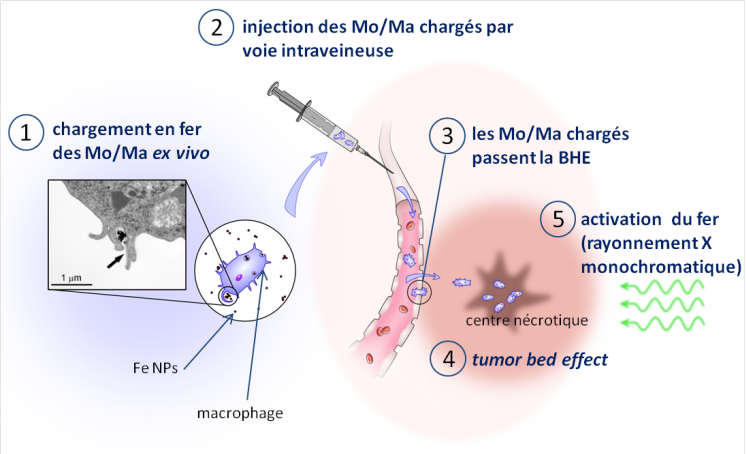


Figure 9.1 – *Schéma illustrant l'approche "Cheval de Troie".*

Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées de façon à tester chaque étape du processus. Ce premier chapitre concerne l'étude *in vitro* des Mo/Ma et de leur capacité à internaliser les NPs Fe. L'accumulation des NPs dans les Mo/Ma a été quantifiée et la distribution des composés dans les cellules a été observée par différents moyens en imagerie. Enfin, nous aborderons la question de l'impact de l'internalisation des NPs Fe sur le métabolisme des macrophages.

9.1 Matériels et méthodes

Plusieurs types cellulaires de Mo/Ma ont été utilisés pour ces expériences *in vitro*. Les premières caractérisations ont été réalisées avec des lignées commerciales ATCC de macrophages, les J774A.1 et les RAW264.7. Ces lignées sont présentées dans la section A.2.2.1 et les protocoles de culture cellulaire sont détaillées dans la section B.2. Toutefois, nous verrons que, par la suite, les lignées ont été abandonnées pour le projet *in vivo* au profit de Mo/Ma primaires. La culture des Mo/Ma primaires est décrite dans la section A.2.2.2.

Dans cette partie, les NPs de fer utilisées sont des NPs usuellement utilisées comme traiter l'anémie, nommées "FerInject" (NPs de 23 nm de diamètre, FeOOH). Ces dernières ont l'intérêt de disposer de l'autorisation de mise sur le marché, ce qui permet de passer éventuellement plus facilement à la phase clinique si les résultats se révélaient convaincants. De plus, l'utilisation de telles NPs assuraient d'une bonne répétabilité des expériences au niveau des différents lots commerciaux, ceux-ci bénéficiant d'un contrôle strict de la taille des NPs et de la composition. Les NPs FerInject sont décrites dans la section A.1.1.

La préparation des échantillons et l'imagerie par TEM sont décrites dans la section B.5.2. La masse de fer par cellule a été mesurée par ICP-MS, selon le protocole détaillé dans la section B.4.

9.2 Résultats : exposition des Mo/Ma au FerInject

9.2.1 Internalisation des NPs Fe par les macrophages de lignées

Des cellules J774A.1 (macrophages de souris) et des RAW 264.7 (Mo/Ma de souris, principalement adhérents) ont été exposées à l'une des deux concentrations de NPs de fer FerInject pendant 24h (0.24 mg/mL ou 2.4 mg/mL), avant d'être rincées et fixées. Les cellules contrôle ont été exposées au milieu de culture classique. A titre de comparaison, les deux types cellulaires ont aussi été exposés à une concentration d'un autre type de NPs de fer, les NPs Fe de l'équipe coréenne (voir A.1.2). Les échantillons ont ensuite été traités dans un laboratoire de Berne (collaboration W. Graber, V. Djonov et J. Laissue) où ils ont été polymérisés dans la résine Epon puis coupés pour observation en TEM.

Comme il peut être vu dans les images Fig. 9.2, les deux lignées de Mo/Ma sont capables d'internaliser des NPs. Le FerInject est accumulé dans de petites vésicules homogènes, qu'il reste complexe à différencier des autres organelles de la cellule. Ces vésicules sont plus nombreuses pour la concentration la plus élevée de FerInject. Les NPs Fe de l'équipe coréenne sont elles aussi internalisées dans des vésicules du cytoplasme. Toutefois, ces vésicules ne sont pas "remplies" de façon homogène de NPs Fe comme dans le cas du FerInject. Ces NPs semblent aussi se fixer à la membrane des cellules. L'exposition des cellules au FerInject n'induirait pas le même comportement cellulaire qu'une exposition aux NPs Fe coréennes, mais les deux lignées J774A.1 et RAW264.7 semblent réagir d'une manière similaire pour chacune des NPs.

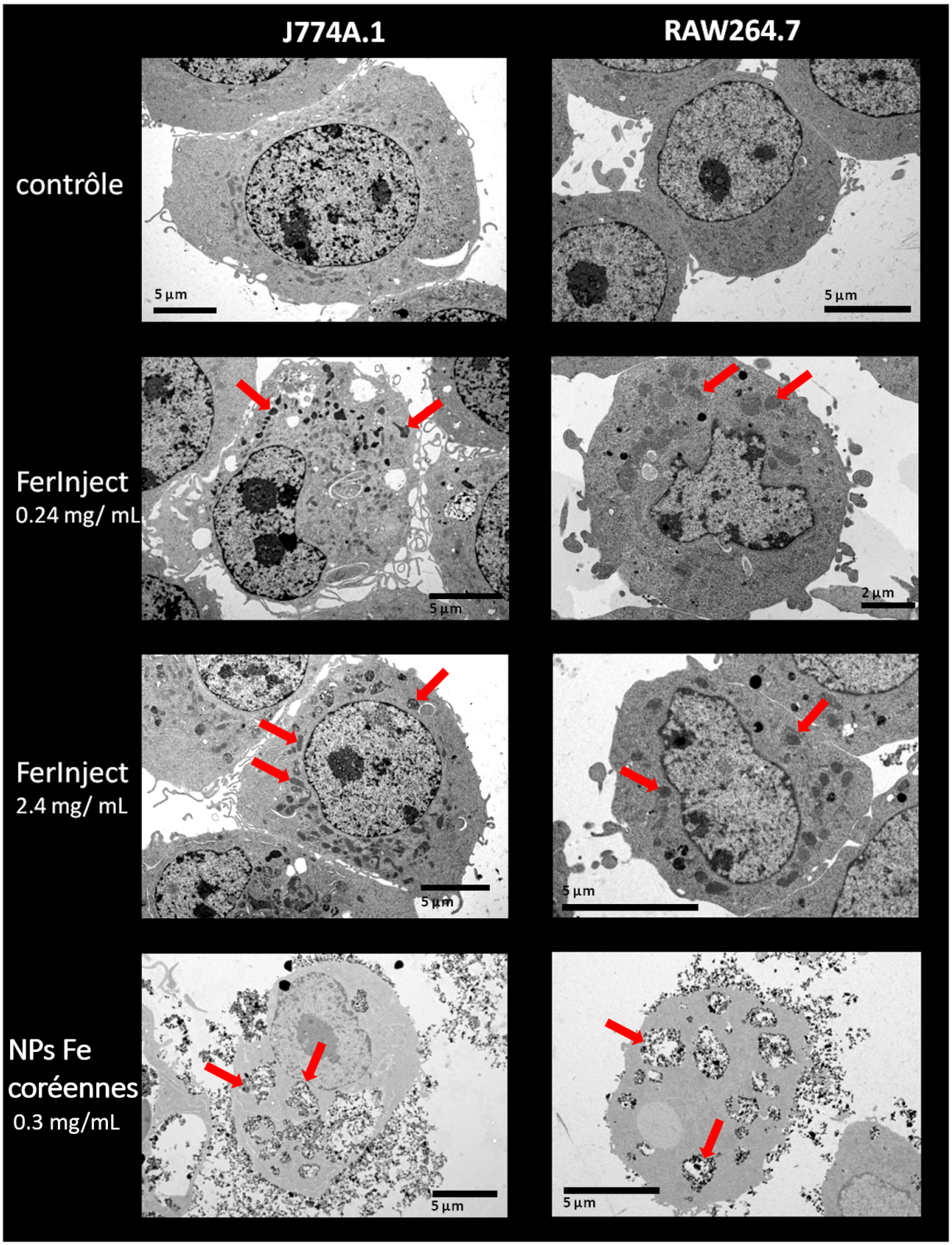


Figure 9.2 – *Observations par TEM des Mo/Ma de lignée J774A.1 (gauche) et RAW264.7 (droite) ayant été exposés pendant 24 h aux NPs FerInject (0.24 ou 2.4 mg(Fe)/mL) ou aux NPs de l'équipe coréenne (0.3 mg(Fe)/mL). Les flèches indiquent les vésicules contenant possiblement des NPs Fe.*

9.2.2 Quantification de la masse de fer internalisée par les monocytes/macrophages

9.2.2.1 Internalisation du fer dans les macrophages de lignée

Après avoir été exposées au FerInject en différentes concentrations pendant 24h, les macrophages J774A.1 ont été détachés, comptés, et le culot de macrophages a ensuite été minéralisé à l'acide nitrique pour mesure ICP-MS (collaboration avec J. Arnaud, CHU Grenoble). Connaissant ensuite la masse de fer et le nombre de cellules par culot, il est aisé de remonter à une masse de fer moyenne par cellule.

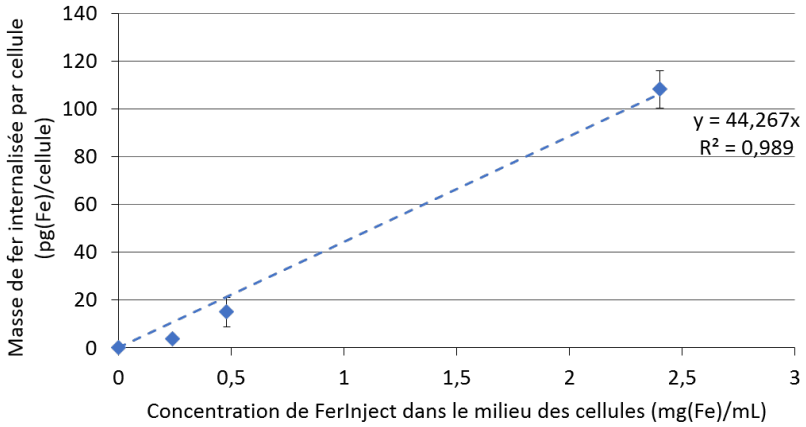


Figure 9.3 – *Internalisation des NPs Fe FerInject par les macrophages J774A.1 en fonction de la concentration de fer dans le milieu de culture (exposition aux NPs Fe pendant 24 h ; mesures ICP-MS en triplicats).*

Les résultats sont présentés dans la figure 9.3. Nous pouvons remarquer que plus la concentration en FerInject dans leur milieu de culture est élevée, plus les J774A.1 internalisent de NPs Fe. L'ordre de grandeur de la masse de fer internalisée par cellule varie de la dizaine de pg par cellule (15 ± 6 pg(Fe) par cellule exposée à 0.48 mg(Fe)/mL) à 108 ± 8 pg(Fe)/cellule pour les macrophages exposés à la plus forte concentration de FerInject dans le milieu de culture (2.4 mg/mL). L'évolution de la masse de fer internalisée en fonction de la concentration de fer dans le milieu de culture des cellules semble linéaire dans cette gamme de concentrations ($R^2 = 0.989$).

9.2.2.2 Internalisation du fer dans les macrophages primaires

La masse de fer internalisée par les macrophages primaires issus de la moëlle osseuse de rats Fischer donneurs a aussi été mesurée par ICP-MS. Les macrophages primaires internalisent 17.2 pg(Fe)/cellule lorsqu'ils sont exposés à 2.4 mg(Fe)/mL de FerInject (les cellules contrôle non exposées au FerInject contiennent 0.1 pg(Fe)/cellule). Cette expérience n'a pas été réalisée en triplicat, d'où l'absence de l'écart type, mais elle permet déjà de donner un ordre de grandeur. D'après ces résultats, la masse de fer internalisée par les Mo/Ma primaires est inférieure d'un ordre de grandeur à celle internalisée par les Mo/Ma de lignée pour une même concentration de fer dans le milieu de culture.

9.2.3 Impact de l'internalisation du FerInject sur la viabilité des cellules

Les conséquences de l'exposition des Mo/Ma de lignées sur le métabolisme de ces cellules n'ont pas été approfondies dans ces travaux. Toutefois, la viabilité des cellules après 24h d'incubation avec les NPs a été mesurée au bleu de Trypan. Les résultats sont représentés dans la figure 9.4. D'après ces mesures, le FerInject ne provoque pas de baisse de survie supérieure à 20% pour les cellules même lorsqu'il est présent à forte concentration dans le milieu (2.4 mg/mL). La viabilité normalisée est supérieure à 80% pour les J774A.1 pour une concentration entre 0 et 2.4 mg/mL et à 94% pour les RAW264.7 dans les mêmes conditions.

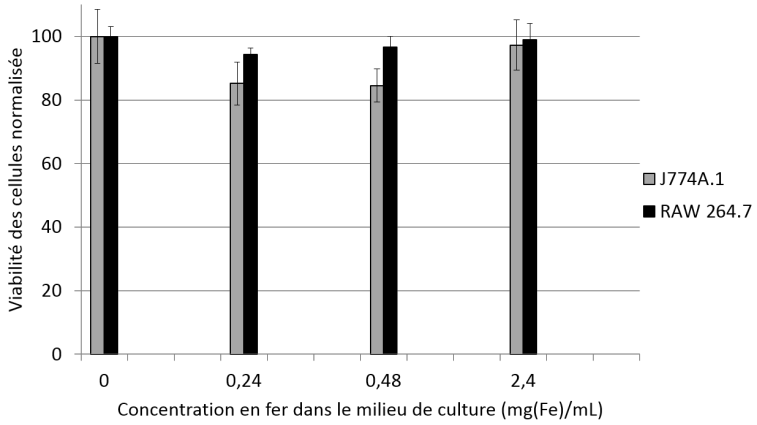


Figure 9.4 – *Viabilité (normalisée par rapport au contrôle) des Mo/Ma de lignée J774A.1 et RAW264.7 après une exposition aux NPs Fe FerInject pendant 24 h à différentes concentrations de fer dans le milieu. Mesures par Bleu de Trypan.*

9.3 Discussion

9.3.1 Internalisation des NPs Fe par les macrophages de lignées

9.3.1.1 Distribution des NPs Fe dans la cellule

Les images TEM présentées dans ce chapitre sont représentatives de la totalité des données obtenues. Il semble que les J774A.1 aient endocyté plus de FerInject que les RAW264.7. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la lignée J774A.1 est une lignée de macrophages bien différenciés, donc composée de cellules phagocytaires professionnelles, tandis que les RAW264.7 sont une lignée mixte de Mo/Ma probablement moins différenciée, moins spécialisées dans l'endocytose.

Les NPs Fe de l'équipe coréenne n'engendrent pas le même type de réaction des cellules. Ces NPs mesurent 15 nm individuellement mais s'agglomèrent en formant des amas d'une centaine de nm. Il est très probable que ce phénomène s'accentue encore lorsque les NPs sont mises en contact avec le milieu de culture et les protéines qui le composent. Les cellules sont donc exposées à des NPs de 23 nm de diamètre avec le FerInject, contre des amas d'une centaine de nm avec les NPs Fe coréennes. Les mécanismes utilisés par les cellules pour internaliser de tels amas ne sont probablement pas les mêmes que ceux mis en œuvre pour internaliser le FerInject. Les NPs Fe coréennes sont endocytées dans des vésicules hétérogènes de taille plus importante que les vésicules chargées

de FerInject. Ces vésicules sont peut-être liées aux lysosomes. Les mécanismes d'endocytose des NPs les plus probables regroupent la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose à clathrine. Selon le mécanisme d'internalisation, le destin intracellulaire des NPs Fe ne sera pas forcément le même. Une annexe (voir **??**) est consacrée à l'endocytose des NPs.

Ces observations sont assez cohérentes avec le fait que le FerInject a été optimisé pour n'être internalisé que par les macrophages et facilement métabolisé pour résoudre les problèmes d'anémie. Celui-ci ne doit pas engendrer de toxicité dans ces concentrations, étant utilisé comme traitement chez l'homme en injections de concentrations plus importantes. Enfin, ces observations pour les cellules F774A.1 et RAW264.7 sont en accord avec le fait que les macrophages sont capables d'endocyter des NPs avec une taille allant du dixième de nm au µm [Vino 14].

9.3.1.2 Masse de fer internalisée

Les macrophages J774A.1 internalisent plus de fer que les Mo/Ma de lignée pour une même concentration de fer. Les J774A.1 sont des cellules phagocytaires professionnelles. Il est probable que les Mo/Ma primaires ne soient pas encore suffisamment spécialisés pour internaliser autant de NPs Fe.

D'autre part, il apparaît souvent dans la littérature que les NPs Fe les plus grandes (autour de 100 nm) sont plus efficacement internalisés par les macrophages que les plus petites NPs Fe (20 nm), pour un même coating [Tong 16]. Selon le seul paramètre de la masse de fer internalisée, il semblerait donc plus intéressant d'utiliser des NPs Fe de grand diamètre. En effet, la masse de fer internalisée par cellule conditionne la densité de macrophages chargés nécessaire à obtenir dans la tumeur pour obtenir un effet thérapeutique. Si les macrophages n'apportent que peu de fer dans la tumeur, il faudra qu'il y ait plus de macrophages chargés dans la tumeur pour que la photoactivation du fer donne des résultats significatifs.

Une masse de 100 pg de fer par cellule correspond environ à une concentration en fer intracellulaire de 100 mg/mL (voir 7.3.5.1). Selon les simulations Monte-Carlo réalisées avec PENELOPE, une telle concentration en fer mène environ à un DEF de 2.55 à 80 keV (énergie d'irradiation usuelle des tumeurs pour les études sur ID-17), c'est-à-dire à une multiplication par 2.5 du dépôt de dose dans la tumeur par rapport aux tissus sains. Pour 10 pg de fer par cellule, le DEF est d'environ 1.15 à 80 keV.

Dans la méthode du Cheval de Troie, le DEF obtenu à l'intérieur de la cellule porteuse de fer n'est pas la donnée qui nous intéresse le plus. Il s'agit par la suite d'obtenir par simulations Monte Carlo le DEF autour de la cellule porteuse de fer, de façon à avoir une idée des dégâts pouvant être faits aux cellules voisines des Mo/Ma chargés (qui seront donc les cellules tumorales). Cependant, ces résultats sont très encourageants. En effet, lors d'autres expériences par l'équipe avec d'autres agents (Au, Gd, I), de telles concentrations dans les cellules n'étaient pas atteintes. Pour une même concentration, le Fe permet d'obtenir des DEFs bien moindres en comparaison à l'Au, Gd ou I. Cependant, le fer arrive à s'accumuler en grande quantité dans les cellules et révèle ainsi un potentiel à étudier. Le tableau 9.1 donne les DEFs obtenus par simulation pour des concentrations caractéristiques obtenues avec différents agents. Encore une fois, il s'agit de DEF intracellulaires, mais cela permet d'avoir une première idée des effets auxquels on peut s'attendre.

élément	Gd	Gd	I	I	Fe	Fe
concentration (mg/mL)	1	2.5	2	5	10	100
DEF théorique	1.29	2.49	1.18	1.46	1.15	2.55

Table 9.1 – *DEF théorique obtenu à 80 keV par simulation Monte-Carlo dans un milieu homogène, en fonction de la concentration en élément dans le milieu (I, Gd ou Fe). Ces concentrations sont des concentrations réalistes par rapport à ce qu'il est possible d'obtenir in vivo (pour le Gd et l'I) ou in vitro dans les cellules (pour le Fe).*

9.3.2 Impact de l'internalisation du FerInject sur les monocytes-macrophages

La masse de fer internalisée par cellule n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. L'objectif est d'utiliser les Mo/Ma comme transporteurs : leur cargaison en NPs Fe ne doit donc pas, ou peu, affecter leurs capacités migratoires. De plus, pour le succès de la méthode, les Mo/Ma doivent être capables de stocker les NPs Fe le temps de la migration jusqu'à la tumeur. Des tests de migration sous agarose ont été mis au point au début de ces travaux de thèse, sans succès avec les J774A.1 (données non montrées). Il s'est avéré par la suite que d'autres équipes se servaient de cette lignée comme témoin négatif de migration.

L'exposition des J774A.1 au FerInject n'a pas engendré de baisse de la viabilité des cellules, même à la plus forte concentration utilisée (2.4 mg(Fe)/mL), bien que les cellules internalisent alors de grandes quantités de fer. Concernant la capacité à garder ce fer intracellulaire accumulé, plusieurs articles semblent s'accorder pour dire que les NPs Fe restent plusieurs jours dans les lysosomes [Mull 07, Gu 11]. La lignée de RAW264.7 métaboliserait de trois manières différentes les NPs Fe qu'elle internalise : soit les NPs Fe sont dégradées dans les lysosomes, ce qui augmente le pool d'ions fer libres intracellulaire, soit elles sont distribuées aux cellules filles pendant la mitose (voir Fig. 9.5), soit elles sont relarguées par les cellules [Gu 11]. L'auteur et ses collaborateurs ajoutent que l'internalisation de NPs Fe perturbe le métabolisme du fer cellulaire puisque la cellule se met à synthétiser plus de ferritine, ce qui fait écho à ce que nous avions supposé sur les cellules de gliome dans la section 6.3.3.3.

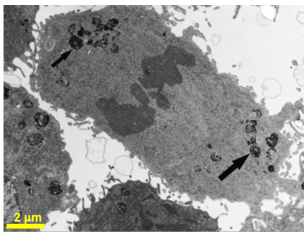


Figure 9.5 – *Image TEM d'une cellule se divisant après internalisation de NPs Fe γ-Fe_2O_3. Les NPs sont partagées entre les deux cellules filles [Gu 11].*

Concernant l'impact sur la migration des Mo/Ma, les résultats varient selon les études. Muller *et al.* ont exposé des Mo/Ma au Ferumoxtran-10 : même aux plus grandes concentrations de fer intracellulaire atteintes, les NPs Fe n'ont alors que des effets modérés ou nuls sur les activités des Mo/Ma. Les études de Tong *et al.* tempèrent un peu ces propos : l'internalisation de NPs d'oxyde de fer de 30 nm de diamètre (SHP30, Ocean Nanotech) par des monocytes primaires provoquerait leur différenciation en macrophages. Selon la concentration de NPs Fe dans le milieu de culture, et donc selon la quantité de fer internalisée, la capacité de migration des Mo/Ma s'en trouve altérée

[Tong 16].

Bastien Dalzon *et al.*, nos collaborateurs du CEA Grenoble, ont étudié la réponse des J774A.1 et des macrophages primaires lorsqu'ils sont exposés au FerInject ou à des NP Fe de Fe_2O_3 (Sigma). Ils observent que l'internalisation de FerInject n'induit aucun changement sur la capacité phagocytaire ni sur le cytosquelette d'actine des J774A.1. De plus, la réponse inflammatoire des Mo/Ma n'est pas modifiée lorsque les cellules ont accumulé du FerInject. Au contraire, l'internalisation de NPs Fe_2O_3, qui ont tendance à s'agréger, diminue les capacités de phagocytose des macrophages et modifie significativement leur réponse inflammatoire lors d'une exposition au LPS (lipopolysaccharide) [Dalz 18].

9.4 Le Chapitre 9 en quelques mots

Les expériences présentées dans ce chapitre constituent la première étape de l'étude de la stratégie "Cheval de Troie" : elles avaient pour objectif de quantifier la capacité des Mo/Ma à internaliser les NPs Fe, ainsi que de vérifier que cette internalisation n'affectait ni leur comportement, ni leur capacité de migration. L'interprétation des résultats nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

- Les Mo/Ma de lignée internalisent les NPs FerInject : lorsqu'ils sont exposés à une concentration de 2.4 mg(Fe)/mL, les macrophages J774A.1 internalisent 108 ± 8 pg(Fe)/cellule, ce qui correspond approximativement à une concentration intracellulaire de fer de 100 mg/mL. Le DEF théorique correspondant à cette concentration est de 3.86 à 30 keV et 2.55 à 80 keV. Les Mo/Ma primaires internalisent moins de NPs FerInject que les J774A.1 pour une concentration d'exposition identique : une première mesure indique qu'ils en internalisent 17.2 pg(Fe)/cellule lorsqu'ils sont exposés aux NPs FerInject à une concentration de 2.4 mg/mL.
- Les NPs Fe internalisées sont stockées dans des vésicules du cytoplasme. Selon la nature de la NP à laquelle ils sont exposés (NPs FerInject, ou NPs de l'équipe coréenne), les macrophages semblent internaliser les NPs Fe avec des mécanismes d'endocytose différents.
- L'exposition des Mo/Ma de lignée au FerInject n'a pas d'impact sur la viabilité des cellules, même pour la plus grande concentration étudiée (2.4 mg/mL, la viabilité est de 97 ± 8 % pour les J774A.1).

Des tests de migration *in vitro* sous l'agarose ont été développés au début de ces travaux de thèse, mais nous ne sommes pas parvenus à faire migrer les J774A.1, même en présence de substances attractrices comme le LPS (lipopolysaccharide).

Chapitre 10

Approche Cheval de Troie : résultats *in vivo*

Sommaire

10.1 Matériels et méthodes 212
10.1.1 Irradiation des animaux 213
10.1.2 Stratégies pour suivi *in vivo* des macrophages 213
10.1.3 Injection des Mo/Ma 214
10.1.4 Analyse des coupes de cerveau 214
10.2 Utilisation de lignées commerciales comme Chevaux de Troie 214
10.2.1 Résultats : expérimentation de la migration des lignées de Mo/Ma commerciales dans la tumeur 9L chez le rat Fischer 215
10.2.2 Discussion : raisons possibles de l'échec de la migration de Mo/Ma 215
10.2.3 Conclusion : les Mo/Ma de lignée ne migrent pas dans notre modèle non immuno-déprimé 216
10.3 Utilisation de Mo/Ma primaires comme Chevaux de Troie 217
10.3.1 Résultats : injection systémique de Mo/Ma primaires 217
10.3.2 Résultats : injection intratumorale de Mo/Ma primaires chez le rat Fischer porteur de tumeur 9L 218
10.4 Discussion finale et conclusion 220
10.4.1 Localisation des Mo/Ma primaires injectés par voie intraveineuse : où ont-ils migré ? 220
10.4.2 Optimisation et choix du marqueur 221
10.4.3 Nombre de Mo/Ma nécessités pour transporter une quantité suffisante de composés dans les tumeurs 224
10.4.4 Influence de présence de la BHE dans la migration des Mo/Ma primaires vers les tumeurs 225
10.4.5 Origine des Mo/Ma endogènes recrutés sur les sites d'inflammation 226
10.4.6 Conclusion générale 227
10.5 Le Chapitre 10 en quelques mots 228

Objectifs du chapitre : expérimenter l'aptitude des Mo/Ma à travers la BHE tumorale chez le rongeur

Les NPs Fe ont prouvé leur potentiel *in vitro* pour augmenter le dépôt de dose dans les cellules tumorales. Comme de nombreuses techniques reposant sur l'usage de NPs pour traiter les gliomes, cette méthode est confrontée à un problème récurrent lors du passage en préclinique : la distribution des NPs Fe doit être homogène dans les tissus tumoraux et à une concentration suffisamment élevée pour espérer obtenir un bénéfice thérapeutique. Or, la BHE bloque le passage du sang au cerveau de la majorité des composés injectés par voie intraveineuse.

Cette thèse se propose alors d'explorer une méthode peu invasive initiée en 2012 par M.R. Choi *et al.* [Choi 12d]. Les NPs Fe sont accumulées *ex vivo* dans des Mo/Ma. Attirées par la zone tumorale et les signaux biochimiques exprimés par les cellules néoplasiques, ces cellules immunitaires sont capables de s'infiltrer à travers la BHE et de se répartir dans les tissus tumoraux jusque dans les zones centrales nécrotiques.

Dans le chapitre 4, les simulations nous ont conforté sur le fait que les photoélectrons émis par des NPs Fe accumulées dans des macrophages pouvaient bien atteindre les cellules tumorales voisines. En effet, les photoélectrons peuvent parcourir plusieurs dizaines de µm lorsque les NPs sont irradiées à plus de 30 keV. D'après cette étude, leur portée serait de 80 µm pour une irradiation à 80 keV. De plus, dans le chapitre précédent, nous avons confirmé la capacité des Mo/Ma à internaliser des NPs Fe. Dans ce chapitre, nous tenterons de développer le protocole de transport des NPs Fe dans un modèle de gliome chez le rat utilisant comme vecteur des Mo/Ma de lignée ou primaires. Différents types de Mo/Ma ont été expérimentés ainsi que plusieurs moyens d'injection. Les résultats obtenus sont présentés dans un ordre chronologique qui tente de rendre compte des efforts d'optimisation du procédé -bien que l'ordre chronologique ne soit habituellement pas le plus pertinent d'un point de vue scientifique.

Le protocole général utilisé afin de tester la capacité de migration des Mo/Ma correspond au schéma suivant :

- les rats porteurs de tumeur sont irradiés au niveau de la tumeur (afin de stimuler la migration des Mo/Ma),
- puis des Mo/Ma marqués sont injectés par voie intraveineuse (veine caudale),
- les rats sont sacrifiés quelques jours après injection selon les délais étudiés.
- Enfin, les cerveaux sont prélevés et les coupes observées en histologie afin d'y retrouver les Mo/Ma marqués injectés.

Ces travaux de recherche *in vivo* ont été effectués avec **Mélanie Flaender** alors en post-doctorat dans l'équipe.

10.1 Matériels et méthodes

Les Mo/Ma de lignée sont décrits dans la section A.2.2.1 et leur protocole de culture dans la section B.2.

Concernant les Mo/Ma primaires, notre laboratoire ne possédait pas d'expertise dans ce domaine et la mise au point de ce type de protocole peut rapidement devenir chronophage. Nous avons donc entamé une collaboration avec une équipe du CEA (T. Rabilloud, C. Augé-Rochereau, B. Dalzon) qui maîtrise la culture des Mo/Ma primaires de souris et s'intéresse à la caractérisation *in vitro* de ces macrophages dans le but d'en faire des Chevaux de Troie. La méthode de culture des Mo/Ma

de souris a été adaptée aux Mo/Ma de rat. Les principes directeurs du protocole de culture sont disponibles dans la section A.2.2.2 et le protocole précis est décrit dans la section B.6.2. Il s'agit, en résumé, d'extraire la moëlle de rats "donneurs", puis de la cultiver dans un milieu promouvant la différenciation des monocytes en macrophages. De cette manière, les cellules obtenues ont les mêmes caractéristiques immunologiques que celles du rat "receveur" qui sera un rat de la même espèce.

Les modèles de gliome chez le rat sont décrits dans la section A.4 et le protocole d'implantation est détaillé en annexe (B.6.1). Les NPs FerInject sont décrites dans la section A.1.1.

10.1.1 Irradiation des animaux

10.1.1.1 Générateur de rayons X

Les irradiations au générateur de rayons X ont été réalisées sur le générateur de rayons X de la ligne ID-17 de l'ESRF (voir A.5.1). Les animaux, anesthésiés par un mélange kétamine/xylazine (64.5/5.4 mg/kg, injection intrapéritonéale), sont placés sur le ventre dans un berceau adapté et le demi-hémisphère droit est positionné dans le champ d'irradiation à l'aide du champ lumineux. L'irradiation est réalisée avec une tension de polarisation de 200 kVp.

10.1.1.2 MRT

Les irradiations par MRT ont été réalisées sur la ligne ID-17 de l'ESRF (voir A.5.2.2). Le faisceau provenant du *wiggler* a un spectre large qui s'étend de 50 à 350 keV et d'énergie moyenne de 90 keV. Ce faisceau est divisé spatialement en un réseau de microfaisceaux quasi-parallèles à l'aide d'un collimateur multifentes. Le protocole d'irradiation des animaux par MRT est décrit par exemple dans les travaux de Bouchet *et al.* [Bouc 15]. Rapidement, les animaux anesthésiés par un mélange kétamine/xylazine (64.5/5.4 mg/kg, injection intrapéritonéale) sont irradiés par deux réseaux orthogonaux de 10 mm de haut composés de 40 microfaisceaux verticaux de 50 µm de large et espacés de 200 µm. Les animaux sont alignés dans le faisceau de telle manière que la tumeur soit à l'intersection des deux réseaux.

10.1.2 Stratégies pour suivi *in vivo* des macrophages

Les Mo/Ma injectés *in vivo* sont préalablement marqués par diverses stratégies de façon à pouvoir les retrouver dans les tissus tumoraux. Ces marquages doivent donc être résistants et encore visibles après plusieurs jours *in vivo*, mais l'impact de leur utilisation sur les cellules doit être minimal et ne doit affecter ni leur viabilité, ni leur capacité de migration. Parmi les stratégies employées, les Mo/Ma ont été colorés par des **colorants fluorescents** cytoplasmiques ou marqueurs de l'ADN : Hoechst, DDAO-SE et CFSE. Les protocoles exacts sont décrits en annexe (B.6.3.2 et B.6.3.3). Les Mo/Ma peuvent aussi être marqués par l'internalisation de **billes fluorescentes** : les références ainsi que le protocole sont disponibles dans la section B.6.3.1. D'autre part, les Mo/Ma ayant internalisé du **FerInject** peuvent être repérés dans les tissus par coloration du fer au Bleu de Prusse (protocole : B.5.3). Enfin, nous avons tenté d'utiliser la méthode **FISH** (hybridation *in situ* en fluorescence) pour retrouver des Mo/Ma de rats donneurs dans les tissus de rattes receveuses par marquage du chromosome Y (principe, détails et protocole : B.6.3.4). Ces divers protocoles de coloration seront discutés dans la section 10.4.2.

10.1.3 Injection des Mo/Ma

Les injections par voie intraveineuse des Mo/Ma sont réalisées par pose d'un cathéter dans une des veines caudales des rats anesthésiés par un mélange air/isoflurane (3%). La seringue est ensuite rincée par une injection de sérum physiologique.

Les injections par voie intratumorale chez les rats sont réalisées sous anesthésie kétamine/xylazine (64.5/5.4 mg/kg, injection intrapéritonéale) après induction de l'anesthésie par un mélange air/ isoflurane (3%). Le crâne des animaux est ensuite rasé et les rats placés dans un cadre stéréotaxique à l'aide des barres d'oreille et de la barre d'incisives. Le crâne des animaux est désinfecté et l'incision réalisée lors de l'implantation est réouverte. Le trou percé est alors repéré et l'aiguille de la seringue Hamilton est descendue à 6 mm de profondeur puis remontée de 0.5 mm. Les Mo/Ma marqués sont alors injectés (quantités décrites dans les sections suivantes) et l'aiguille est retirée. Le trou est rebouché par de la cire à os, la plaie est désinfectée à la Bétadine puis refermée à l'aide de points de suture. Les animaux sont ensuite déposés dans une couveuse maintenue à 27°C.

10.1.4 Analyse des coupes de cerveau

Les cerveaux sont congelés dans l'isopentane après prélèvement puis conservés à -80°C. Les coupes de cerveau sont réalisées au cryotome (coupes de 20 μm). Si les Mo/Ma n'ont pas été colorés au Hoechst, les lames sont ensuite montées avec du DAPI/Vectashield. Si les Mo/Ma ont été colorés au Hoechst, les lames sont montées au Vectashield seul.

10.2 Utilisation de lignées commerciales comme Chevaux de Troie

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'utilisation de Mo/Ma de lignées : ces expériences sont en effet plus simples à mettre en œuvre qu'une culture de macrophages primaires. Différentes lignées commerciales d'ATCC présentes dans la littérature ont donc été testées :

- J774A.1 (macrophage souris BALB/c)
- Raw264.7 (monocyte/macrophage de souris BALB/c)
- Raw264.7 RFP (monocyte/macrophage de souris BALB/c, cellules fluoresçant en rouge, CEA Grenoble)
- P388D1 CCL-46 (monocyte de souris DBA/2 [Vala 07])
- NR-8383 (macrophage alvéolaire de rat Sprague-Dawley [Mads 13, Mads 15])

Des tumeurs 9L ont été implantées dans le noyau caudé de rats Fischer. 12 jours après implantation, les tumeurs ont été irradiées au générateur de rayons X de la ligne ID-17 (basse énergie, 15 Gy) ou en MRT (15 Gy en dose vallée) (cf Fig. 10.1). Quatre jours après l'irradiation, les Mo/Ma ont été injectés par la veine de la queue par pose d'un cathéter (entre 10 et 50 millions de Mo/Ma par rat, selon le type cellulaire). Préalablement à l'injection, les Mo/Ma ont été marqués grâce à un colorant fluoresçant en vert, le CFSE (de *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*), qui colore le cytoplasme. Ce marquage permettra ensuite de reconnaître les cellules injectées parmi les autres cellules composant les tissus. 3 jours après injection des Mo/Ma, les rats ont été sacrifiés et leur cerveau prélevé. Les cerveaux ont ensuite été découpés au cryotome et les coupes analysées par histologie et au microscope à fluorescence, de manière à retrouver les Mo/Ma colorés en vert.

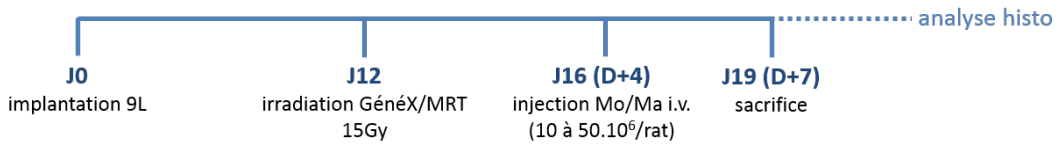


Figure 10.1 – *Déroulement de l'expérience in vivo pour l'étude de la migration des lignées cellulaires.*

10.2.1 Résultats : expérimentation de la migration des lignées de Mo/Ma commerciales dans la tumeur 9L chez le rat Fischer

Après analyse des cerveaux, aucun signal fluoresçant en vert dans les tumeurs n'a pu être observé pour la lignée J774A.1. Pour les lignées NR8383, P38D1 et RAW264.7, quelques rares points fluorescents ont pu être observés dans les coupes, parfois à la périphérie de la tumeur et parfois en son cœur. Cependant, ces points fluorescents ne colocalisaient pas avec le DAPI [1]. Qu'un colorant cytoplasmique ne colocalise pas exactement avec un colorant du noyau n'est pas surprenant, cependant, ici, les deux marquages étaient bien trop éloignés pour que les signaux verts correspondent à une cellule -dont le noyau aurait été marqué en bleu.

10.2.2 Discussion : raisons possibles de l'échec de la migration de Mo/Ma

N'ayant pas d'expérience sur l'utilisation du CFSE *in vivo*, nous avons émis l'hypothèse que **le marquage avait pu être atténué avec le temps** : ceci permettrait alors d'expliquer l'absence de signal fluorescent dans les coupes. Certaines des lignées injectées étant des lignées cellulaires de souris, nous avons ensuite tenté d'utiliser des anticorps spécifiques à la souris afin de repérer les cellules de souris dans les cerveaux de rat. Néanmoins cette tentative ne nous a pas non plus permis de retrouver les Mo/Ma injectés.

Une seconde raison à l'absence de signal venant des cellules injectées peut être trouvée dans **la non-optimisation des délais**. Cette expérience étant une expérience pilote, nous n'avions pas de recul quant au temps nécessaire aux Mo/Ma pour arriver jusqu'à la tumeur. Notre protocole a donc été construit grâce aux données présentes dans la littérature. Cependant, il est fort probable que ce temps puisse varier selon les modèles ; nous ne pouvons donc pas écarter l'hypothèse selon laquelle la date d'injection des Mo/Ma, ou la date du sacrifice des animaux, était peut être trop écartée de l'optimum pour permettre une observation des Mo/Ma dans la tumeur. Il serait donc nécessaire par la suite de réaliser une expérience en faisant varier l'un, puis l'autre, de ces paramètres, afin de connaître :

- le moment précis après irradiation où les Mo/Ma sont le plus recrutés dans la tumeur, c'est-à-dire le "pic de recrutement des macrophages". Ce serait alors le moment optimal pour injecter les Mo/Ma dans le sang.
- le moment où le maximum de Mo/Ma répartis dans la tumeur après injection et migration est atteint. Il s'agirait donc du moment optimal où l'irradiation "thérapeutique" des NPs Fe devra se faire ("thérapeutique", par rapport à l'irradiation à 15 Gy qui a simplement une visée d'augmention du potentiel attractif de la tumeur).

Une autre hypothèse pourrait expliquer l'absence de signal fluorescent dans les tissus tumoraux : les

1. DAPI : colorant fluoresçant en bleu marquant la présence d'un noyau cellulaire

lignées J774A.1, Raw264.7, Raw264.7 RFP et P38D1 étant des Mo/Ma de souris, ces cellules ont pu être détectées par **le système immunitaire des rats** et éliminées avant d'avoir pu atteindre le cerveau. Concernant la lignée de Mo/Ma de rat, les NR-8383, les résultats sont tout aussi négatifs. Une explication peut être donnée par le côté "dénaturé" des cellules de lignée qui perdent parfois certaines de leurs capacités (par exemple, les J774A.1 ont été incapables de migrer *in vitro* dans les tests réalisés au cours de ces travaux -données non montrées). De plus, les NR-8383 sont des lignées originaires de rats Sprague-Dawley, ce qui est peut-être immunogène dans le cas d'une injection chez le rat Fischer.

Bien que nous ne puissions pas conclure sur la raison précise pour laquelle nous n'avons pas retrouvé les Mo/Ma injectés, nous favorisons l'hypothèse selon laquelle les cellules de lignée auraient été détruites après l'injection systémique par les cellules immunitaires du rat receveur. La présence des quelques signaux fluorescents observés sur les coupes de cerveau peut alors s'expliquer par l'attraction réelle de la tumeur irradiée pour les Mo/Ma du rat : les monocytes circulant dans le sang auraient pu internaliser des fragments de cellules de lignée colorées une fois détruites par le système immunitaire, puis auraient été attirés par la tumeur et auraient migré à travers la BHE pour y résider, transportant avec eux des fragments fluorescents de cellules marquées.

Certains résultats obtenus par d'autres équipes sur la migration de cellules de lignée dans les tumeurs peuvent aussi s'expliquer par l'internalisation de fragments des cellules injectées et/ou de leur contenu par les Mo/Ma du rat ou de la souris receveuse, puis par la migration de ces Mo/Ma dans la tumeur. Cette hypothèse est discutée dans plusieurs articles, notamment dans l'article de Tong *et al.* : ayant marqué les Mo/Ma de souris donneuses GFP+ [2] avec des NPs Fe, l'auteur observe certaines cellules GFP- contenant du fer : ces cellules endogènes auraient selon lui phagocyté les particules relâchées dans la circulation sanguine ou dans la tumeur. Cependant, dans cette étude, l'observation de cellules endogènes porteuses de NPs Fe dans les tissus tumoraux reste minime comparé au nombre visible de Mo/Ma injectés ayant migré dans la tumeur [Tong 16].

Il serait intéressant, pour lever cette interrogation, de réaliser systématiquement un contrôle "négatif" avec l'injection seule des NPs en parallèle des expériences de migration. Ce contrôle permettrait de mettre en évidence le gain apporté par la vectorisation des NPs par les Mo/Ma.

10.2.3 Conclusion : les Mo/Ma de lignée ne migrent pas dans notre modèle non immuno-déprimé

D'après cette première étude, les Mo/Ma de lignée n'ont pas réussi à migrer à travers la BHE pour se répartir dans la tumeur. Cet échec est certainement du à la destruction des cellules injectées par le système immunitaire des rats.

Nous pourrions envisager de réaliser les expériences avec **des souris ou des rats privés de système immunitaire**, comme cela a été fait dans la littérature [Choi 12b, Choi 12c, Muth 15]. Cependant, ce modèle ne serait pas très représentatif de la réalité et certains mécanismes biologiques pourraient être changés, faussant ce qu'il est réellement possible d'obtenir dans un animal avec système immunitaire, et donc chez un patient. Cela aurait nécessité une autre étude approfondie par la suite pour permettre le transfert de la méthode dans un être vivant avec un système immunitaire fonctionnel. C'est pourquoi, dans les expériences suivantes, l'idée d'utiliser des animaux sans système immunitaire a été laissée de côté et c'est sur la solution des Mo/Ma primaires que nous nous sommes concentrés. Par ailleurs, il est aussi vraisemblable que le CFSE ne soit pas

2. La GFP, de *Green Fluorescent Protein*, est une protéine intrinsèquement fluoresçante en vert. Les animaux GFP+ désignent des animaux pour lesquels toutes les cellules expriment cette protéine fluorescente.

non plus le colorant optimal pour ce type de marquage. La question du marquage deviendra aussi une question centrale par la suite.

10.3 Utilisation de Mo/Ma primaires comme Chevaux de Troie

10.3.1 Résultats : injection systémique de Mo/Ma primaires

L'utilisation de Mo/Ma de lignée n'ayant pas permis de mettre en évidence la migration des cellules dans la tumeur, nous avons donc par la suite étudié le potentiel de Mo/Ma primaires comme transporteurs. Deux expériences pilotes (résultats non montrés) ont tout d'abord été effectuées sur des rats Wistar porteurs de gliome C6 (animaux déjà présents à l'animalerie : application de la Règle d'éthique des "3 R" [3]). Après irradiation des tumeurs à basse énergie (dose : 15 Gy) au générateur de rayons X, les Mo/Ma primaires colorés par des marqueurs fluorescents (Hoechst et CFSE) ont été injectés par voie intraveineuse (un ou deux jours après irradiation). Les animaux ont été sacrifiés six jours après irradiation et les coupes de cerveau analysées. Nous avons pu conclure les points suivants de ces expériences pilote :

- le protocole de différenciation des Mo de souris en Ma primaires, mis au point par l'équipe collaboratrice du CEA de Grenoble, est transférable chez le rat.
- si ce protocole de différenciation est réalisé au CEA, les cellules souffrent du trajet jusqu'au synchrotron (les Mo/Ma sont injectés à l'animalerie de l'ESRF) le jour de l'expérience. Aucune cellule colorée n'a été détectée dans les tumeurs tandis que les Mo/Ma remis en culture dans des flasques étaient encore fluorescents.
- l'injection jusqu'à 68 millions de Mo/Ma ne semble pas avoir eu d'impact sur la santé de l'animal.
- le marquage au Hoechst et au CFSE ne permet pas de tirer de conclusion de l'observation des coupes de cerveau : des points fluorescents sont visibles, mais il est impossible de déterminer s'il s'agit bien d'un Mo/Ma injecté (discuté dans la section 10.4.2)

Suite à ces expériences pilote qui ont permis de précieuses mises au point, une expérience sur des rats Fischer porteurs de gliome 9L a été réalisée. Lors de cette expérience, des rattes Fischer porteuses d'une tumeur 9L ont été irradiées à basse énergie sur le générateur de rayons X (dose : 20 Gy). Trois jours après irradiation (cf Fig. 10.2), une première série de rattes a reçu 43 millions de Mo/Ma colorés (billes vertes fluorescentes) injectés par voie intraveineuse, et une deuxième série de rattes a reçu 40 millions de Mo/Ma non colorés injectés par voie intraveineuse, dans le but d'utiliser la méthode FISH. Les animaux ont été sacrifiés 4 jours après injection des cellules.

Suite à l'observation des coupes au microscope à fluorescence, quelques cellules porteuses de billes ont pu être retrouvées, au maximum une dizaine par coupe de 20 μm (Fig. 10.3). Des Mo/Ma marqués issus du lot de cellules injectées ont été gardés en culture. Les billes étaient encore fluorescentes le jour du sacrifice des animaux, et le nombre de billes par cellule en culture (observation des flasques) s'est avéré similaire à celui observé dans les cellules marquées des coupes.

3. La *Règle des Trois "R"* est une règle d'éthique introduite dans la règlementation de l'expérimentation animale. Les trois "R" correspondent à trois principes directeurs à respecter : Réduire (diminuer le nombre d'animaux utilisés), Raffiner (soulager la douleur ou le stress de l'animal), Remplacer (remplacer autant que possible les animaux par des modèles *in vitro* ou des simulations numériques).

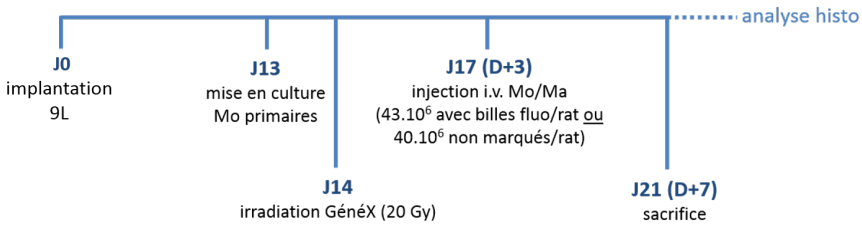


Figure 10.2 – *Déroulement de l'expérience in vivo pour l'étude de la migration des Mo/Ma primaires après injection en intraveineuse.*

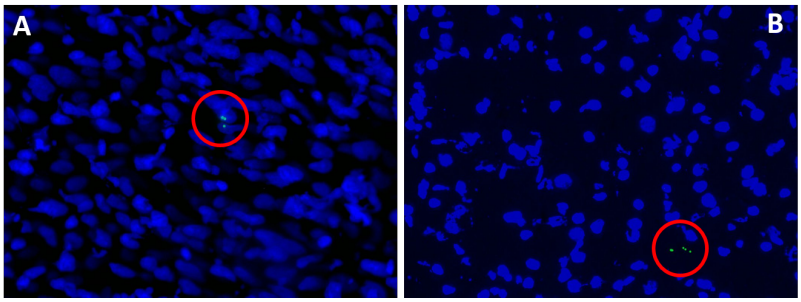


Figure 10.3 – *(A) et (B) : images en fluorescence (x40) de coupes de cerveaux de rats ayant reçu une injection en i.v. de Mo/Ma primaires marqués avec des microbilles ([bleu] : noyau des cellules / DAPI ; [vert] : microbilles marquant les Mo/Ma injectés). Les images ont été prises dans la zone tumorale.*

10.3.2 Résultats : injection intratumorale de Mo/Ma primaires chez le rat Fischer porteur de tumeur 9L

Suite aux résultats certes décevants obtenus avec les injections des Mo/Ma par voie intraveineuse, nous avons choisi de tenter une autre approche en injectant des Mo/Ma par voie intratumorale (cf Fig. 10.4). Plus invasive, cette méthode permettrait néanmoins de bénéficier des capacités de migration des cellules pour répartir le fer de façon homogène dans la tumeur, ce qui est complexe à réaliser avec une injection de NPs en solution -même avec la méthode CED. De plus, les Mo/Ma étant aussi attirés par les zones nécrotiques de la tumeur, cette méthode serait susceptible de mener à une distribution du fer dans ces zones non vascularisées, habituellement peu atteintes par les médicaments de chimiothérapie. Tester cette approche reste pertinent d'un point de vue clinique, car il serait possible pour le chirurgien de déposer les Mo/Ma chargés en fer dans la cavité tumorale lors de l'opération de résection (voir section 3.1.3.2).

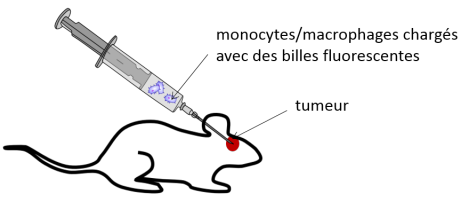


Figure 10.4 – *Schéma illustratif d'une injection intra-tumorale de Mo/Ma primaires.*

Afin de tester cette hypothèse et de voir si l'injection intratumorale des Mo/Ma chargés permet

bien la répartition du fer de façon homogène dans la tumeur, le plan d'expérience suivant a été construit : les rattes porteuses de tumeur 9L ont reçu, 4 jours après irradiation à basse énergie au générateur de rayons X (dose reçue : 15 Gy), une injection intratumorale d'un million de Mo/Ma primaires marqués avec des billes ou ayant été incubés avec du FerInject (cf Fig. 10.5). Un ou trois jours après injection, les rattes ont été sacrifiées et leurs cerveaux prélevés pour analyse. L'expérience a été réalisée avec la même logique d'injection de Mo/Ma primaires mâles à des rats femelles, de façon à pouvoir utiliser la méthode FISH.

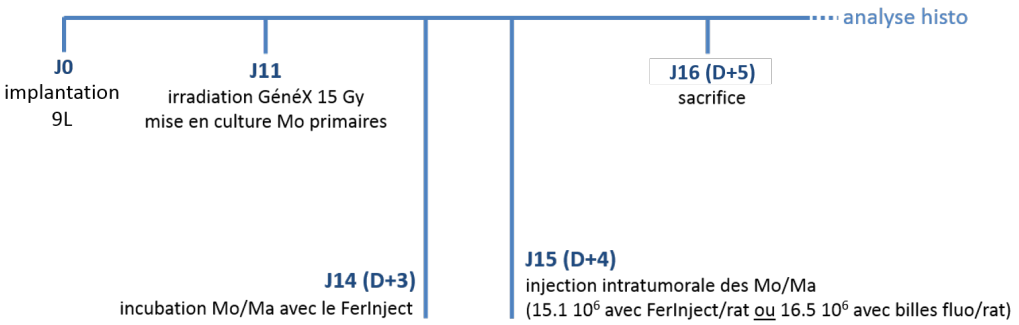


Figure 10.5 – *Déroulement de l'expérience in vivo pour l'étude de la migration des Mo/Ma primaires après injection intratumorale.*

Les coupes de cerveau des rats injectés avec des Mo/Ma porteurs de billes ont été observées au microscope à fluorescence. Les coupes de cerveau des rats injectés avec des Mo/Ma porteurs de FerInject ont été colorées au H&E (coloration des tissus en rose et violet) et au Bleu de Prusse (marquage du fer en bleu), puis observées au microscope.

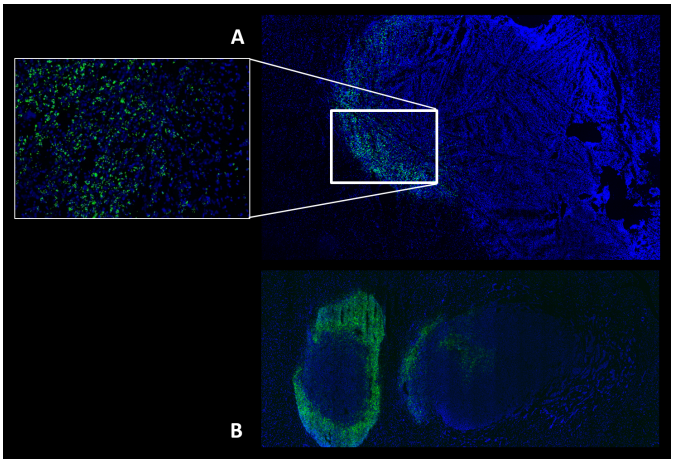


Figure 10.6 – *Images en fluorescence de coupe de cerveaux de rats ayant reçu une injection en intratumorale de Mo/Ma primaires marqués avec des microbilles ([bleu] : noyau des cellules / DAPI ; [vert] : microbilles marquant les Mo/Ma injectés), (A) : 3 j après injection et (B) : 24 h après injection.*

Des images représentatives des coupes analysées sont présentées dans la figure 10.6 pour le marquage utilisant les billes et dans la figure 10.7 pour le FerInject. Dans les deux cas (billes et FerInject), on observe le même type de résultats : on retrouve des Mo/Ma injectés dans les environs de la tumeur, et ce, en plus grand nombre qu'avec l'injection en intraveineuse. Cependant,

les Mo/Ma restent localisés et ne recouvrent pas la totalité de la tumeur de façon homogène.

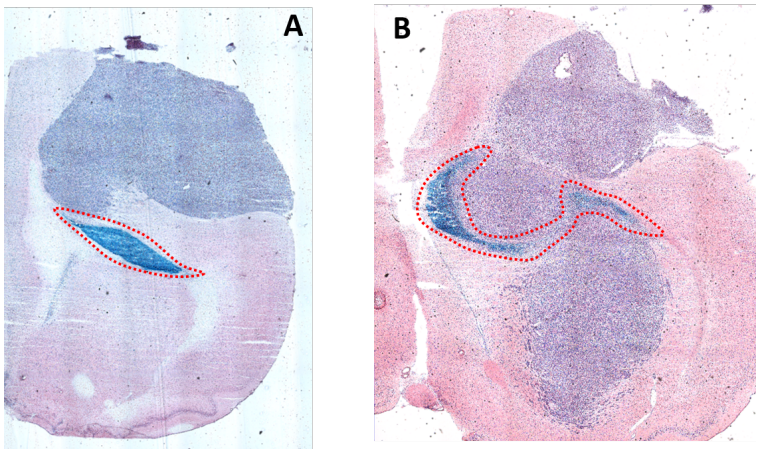


Figure 10.7 – *(A) et (B) : images en transmission de coupe de cerveaux de rats ayant reçu une injection en intra-tumorale de Mo/Ma primaires marqués au FerInject. Les coupes ont subi une coloration du H&E puis au Bleu de Prusse ([bleu] : marquage du fer ; [zones encadrées en rouge] : les cellules porteuses de Fe sont restées regroupées localement).*

10.4 Discussion finale et conclusion

10.4.1 Localisation des Mo/Ma primaires injectés par voie intraveineuse : où ont-ils migré ?

Si les Mo/Ma injectés ne sont pas retrouvés dans le cerveau, il est fort probable qu'ils aient migré vers d'autres organes. Nous avions donc prélevé la rate, le foie, les poumons et les reins des animaux afin de pouvoir comprendre où les cellules injectées s'accumulaient. Les organes ont été prélevées en même temps que les cerveaux.

Dans le cas de l'injection de Mo/Ma marqués au CFSE ou au Hoechst, l'auto-fluorescence des coupes de rate s'est révélée trop importante pour pouvoir donner une conclusion aux observations. Les coupes de rate des rats contrôle non injectés étaient similaires à celles des rats injectés.

Dans le cas de l'injection de Mo/Ma marqués par les billes fluorescentes, l'analyse des coupes de rate montre la présence de cellules chargées de billes, en quantité plus importante que dans les coupes de cerveau (cf Fig. 10.8). Il est donc probable que les Mo/Ma aient eu du mal à passer la BHE malgré leurs capacités de diapédèse, et se soient retrouvés dans d'autres organes, probablement plutôt des organes avec une fonction de filtration du système circulatoire. Ces observations sont d'ailleurs cohérentes avec les études d'Audran et collaborateurs décrites dans la section 3.2.2.2 : seule une petite fraction des Mo/Ma injectés atteignent la zone inflammée, les autres sont accumulés dans les poumons, le foie et la rate [Audr 95].

Cependant, malgré ces questions auxquelles il est tentant d'apporter une réponse, il ne faut pas perdre de vue l'objectif de notre étude : utiliser les Mo/Ma comme vecteurs pour transporter les NPs Fe jusque dans la tumeur. Si les Mo/Ma sont incapables de migrer en quantité suffisante pour espérer obtenir par la suite un effet thérapeutique lors de l'irradiation de la tumeur, le fait

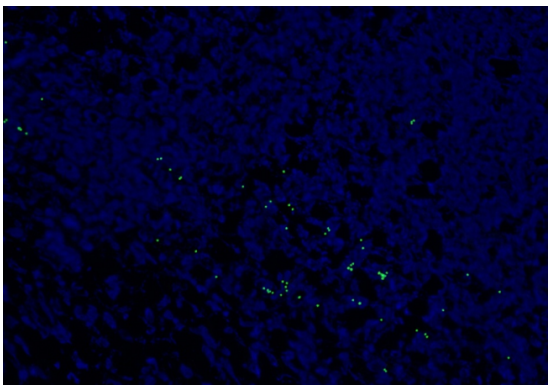


Figure 10.8 – *Image en fluorescence d'une coupe de rate de rat (x20) ayant reçu une injection en i.v. de Mo/Ma primaires marqués avec des microbilles ([bleu] : noyau des cellules / DAPI ; [vert] : microbilles marquant les Mo/Ma injectés).*

de savoir qu'elles sont dans la rate ou le foie ne changera pas la conclusion finale : la méthode de Cheval de Troie telle que nous l'avons expérimentée ne permettra pas de résoudre le problème de la répartition des NPs Fe dans la tumeur de manière peu invasive. L'étude des autres organes (coupes histologiques, observation au microscope) demandant un travail supplémentaire, nous avons décidé de consacrer ce temps à avancer sur le reste du projet, car les conclusions qu'apporteraient ces observations ne changeraient en rien l'abandon -au moins temporaire- de la méthode Cheval de Troie.

10.4.2 Optimisation et choix du marqueur

Ces expériences ont montré que le choix du colorant marquant les cellules est une étape cruciale et décisive pour obtenir des résultats exploitables. Celui-ci doit être suffisamment robuste pour colorer les cellules pendant plusieurs jours, et ce même une fois celles-ci injectées *in vivo*. De plus, la toxicité du colorant doit être la plus faible possible. En plus de ne pas faire preuve de cytotoxicité, le colorant doit aussi marquer la cellule sans trop la modifier ni changer son comportement.

Un tableau résumant les différents types de marquages testés est présenté dans la Fig. 10.9.

10.4.2.1 Utilisation de colorants fluorescents

Le marquage CFSE, colorant cytoplasmique fluoresçant en vert, est peu cytotoxique mais sa répartition dans la cellule varie au cours du temps et devient moins uniforme. Il est alors complexe de déterminer si le colorant marque une cellule entière ou un fragment. Même en flasque de culture, le marquage évolue : il reste bien cytoplasmique mais devient très hétérogène avec des points plus brillants qui ressortent, comme l'illustre la figure 10.10.

Le **DDAO-SE**, colorant rouge robuste, a été écarté des possibilités car celui-ci s'est révélé trop toxique. Le **Hoechst**, marqueur de l'ADN fluoresçant en bleu, est plutôt résistant et peu toxique. Cependant, son utilisation empêche l'habituel marquage au DAPI des coupes à examiner, employé pour observer la répartition des cellules du tissu lors de l'analyse au microscope. En effet, le colorant Hoechst marque le noyau des cellules de la même couleur que le DAPI. Il devient alors impossible

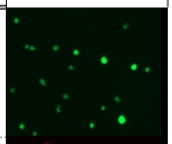
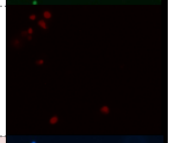
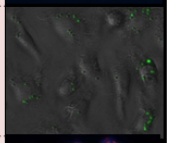
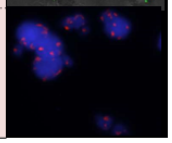
	simplicité du protocole de marquage ?	coût du marquage raisonnable ?	coloration longue durée ?	non toxique ?	autres commentaires	observation caractéristique
CFSE	v	x	x	v		
DDAO	v	x	x	x		
Hoechst 33342	v	v	v	v	ne permet pas l'utilisation de DAPI pour visualiser les tumeurs	
billes fluorescentes	v	v	v	v	biais sur la migration possible	
FISH	x	x	coloration sur les coupes	v	pas mis au point	

Figure 10.9 – *Tableau comparatif des différents marqueurs cellulaires utilisés pour retrouver les Mo/Ma injectés dans les coupes, adapté du travail de Mélanie Flaender.*

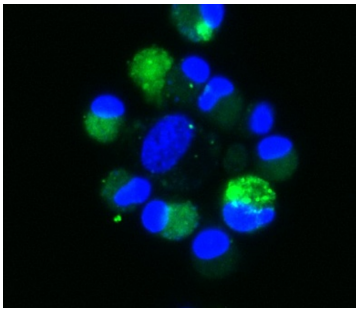


Figure 10.10 – *Image en fluorescence de Mo/Ma primaires marqués au CFSE (vert) et au DAPI (bleu) illustrant l'irrégularité du marquage CFSE après quelques jours (x40).*

de discriminer les Mo/Ma injectés (dont le noyau est marqué en bleu grâce au Hoechst) des cellules des tissus (dont le noyau serait alors marqué en bleu grâce au DAPI).

Nous avons donc réalisé les premières expériences en marquant les cellules au **Hoechst** et au **CFSE**. En plus des remarques précédentes, l'emploi de tels colorants possède deux autres aspects défavorables :

- il est possible que ces types de marquage s'estompent par photoblanchiment. Un grand soin a donc été porté pendant les manipulations des cerveau et des coupes pour limiter ce phénomène (cerveaux et coupes gardés sous un papier d'aluminium le plus possible, manipulations évitant la lumière).
- comme l'illustre la figure 10.11, les coupes de cerveau des rats montrent quelques cellules fluoresçant en bleu et en vert au niveau de la tumeur après une injection de Mo/Ma primaires par voie intraveineuse. Cependant, il est difficile de déterminer avec précision ce que ces

marquages représentent : des Mo/Ma ayant migré, des débris de Mo/Ma phagocytés et apportés dans les tissus par les monocytes circulants, une autofluorescence ?

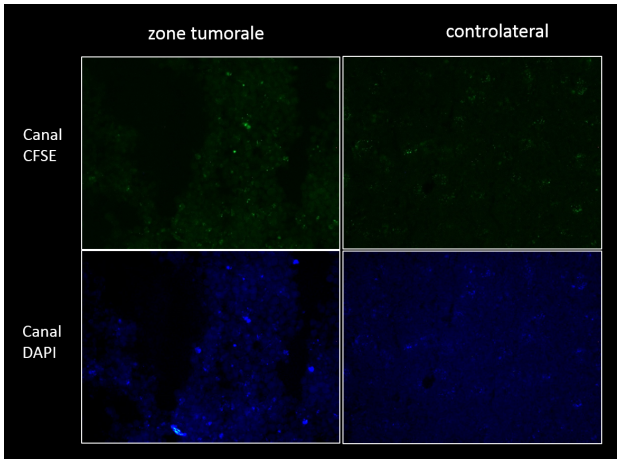


Figure 10.11 – *Images en fluorescence de coupes de cerveaux de rats ayant reçu une injection en i.v. de Mo/Ma primaires marqués au Hoechst (canal DAPI) et au CFSE (expérience pilote). Les images ont été prises dans la zone tumorale ou dans le controlatéral.*

10.4.2.2 Utilisation de billes fluorescentes

C'est pour ces multiples raisons que nous nous sommes tournés vers les **billes en Latex fluorescentes** (colorant vert). Le marquage est réalisé par l'internalisation des billes fluorescentes par les Mo/Ma avant injection. Grâce à leur forme caractéristique, l'observation de billes dans les coupes ne laisse aucun doute sur le fait qu'il s'agisse bien des billes servant de marqueur.

Cependant, l'influence de l'internalisation des billes sur les capacités de migration des Mo/Ma n'a pas été étudiée. Selon les études de Tong *et al.*, le chargement des Mo/Ma peut en effet affecter les cellules et freiner leur capacités de migration vers le site endommagé du cerveau [Tong 16]. De plus, il est possible que ces billes soient relarguées par les Mo/Ma : d'après les études de Dalzon *et al.* (données expérimentales non montrées), les macrophages primaires ne relâchent pas plus de 40% des billes. Cette externalisation a lieu surtout pendant les 3 premiers jours après marquage et se stabilise ensuite (mesures par cytométrie). Ces mesures ont été confirmées par le suivi des Mo/Ma marqués au microscope.

10.4.2.3 Utilisation de la méthode FISH

L'utilisation de la méthode FISH n'a pas permis de tirer de conclusion de l'expérience. Comme nous pouvons le voir sur la figure 10.12, le marquage des chromosomes Y n'a pas fonctionné : si les cellules tumorales sont marquées, ce à quoi l'on peut s'attendre au vu du génome des cellules 9L, les cellules saines du controlatéral sont elles aussi marquées. Pourtant, les animaux étant des rattes, les cellules cérébrales saines ne possèdent pas de chromosome Y.

Un point positif cependant ressort de cette tentative : la méthode FISH s'est malgré tout révélée compatible avec l'observation des billes fluorescentes. Les étapes du FISH ne dénaturaient donc pas suffisamment le colorant des billes, et ces dernières étaient encore visibles. Cela aurait pu permettre

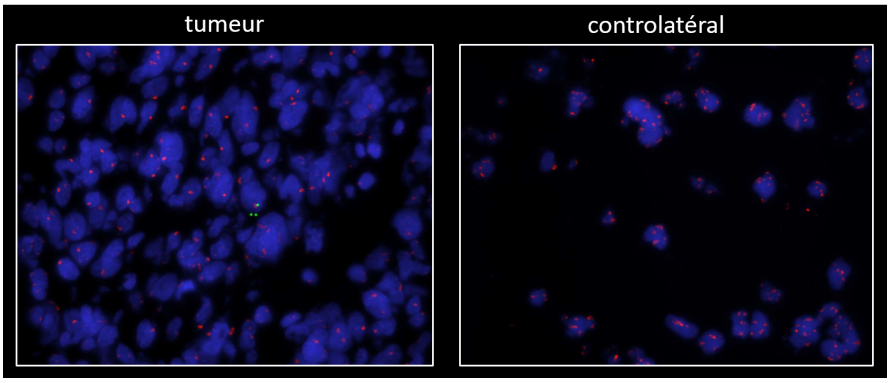


Figure 10.12 – *Tentative d'utilisation de la méthode FISH, sur une coupe de cerveau de ratte porteuse de tumeur F98 et ayant reçu des Mo/Ma par voie intraveineuse (marqués par des billes fluoresçantes en vert). Le marquage (rouge) est présent autant dans la tumeur que dans le controlatéral, qui pourtant n'est pas supposé contenir des cellules porteuses de chromosome Y.*

de colocaliser la présence des billes et les chromosomes Y, de façon à être certains que les billes marquaient bien la présence d'un Mo/Ma injecté.

Le FISH est une alternative intéressante aux marqueurs cytoplasmiques ou nucléaires et aux billes fluorescentes. Sa mise au point demandera encore un travail supplémentaire, car nous ne sommes pas parvenus à l'utiliser de manière fiable malgré l'aide précieuse apportée par nos collaborateurs du CHU.

10.4.3 Nombre de Mo/Ma nécessités pour transporter une quantité suffisante de composés dans les tumeurs

La méthode de transport de NPs par "Cheval de Troie" permet en théorie de distribuer le fer dans les tumeurs cérébrales d'une manière peu invasive pour le patient, en limitant la toxicité des NPs pour les tissus non concernés, car celles-ci sont transportés à l'intérieur des cellules. De plus, les NPs sont susceptibles d'être amenées par les Mo/Ma jusque dans les zones nécrotiques habituellement non atteintes par les médicaments de chimiothérapie, car éloignées des zones vascularisées.

Cependant, cette méthode est aussi soumise à quelques contraintes : pour espérer obtenir un effet thérapeutique significatif avec le fer, il faut qu'un nombre conséquent de Mo/Ma atteigne la tumeur et s'y répartisse. Par conséquent, en prenant en compte le pourcentage de Mo/Ma injectés qui ne se rend pas dans la tumeur (et qui sont donc "perdus" du point de vue de notre expérience), il faut injecter un très grand nombre de Mo/Ma : pour un rat, de l'ordre de 50 millions de Mo/Ma lors de nos expériences, et donc pour l'homme autour de 10 milliards de Mo/Ma. D'autre part, les Mo/Ma "perdus" dans d'autres organes peuvent engendrer une toxicité ou des effets secondaires indésirables.

Remarque : le nombre de cellules injectées dans notre étude varie d'une expérience à une autre. En effet, la culture des Mo/Ma primaires est sujette à de nombreux aléas : le risque de contamination s'est révélé relativement élevé lorsque l'on n'utilise pas d'antibiotiques dans le milieu de culture (ce qui a été changé dans le protocole par la suite). De plus, le nombre de Mo/Ma récoltés après mise en culture varie beaucoup selon l'âge du rat donneur, et sûrement d'autres nombreux paramètres que nous ne maîtrisons pas. Nous avons donc réalisé les expériences en conjuguant au mieux les différents imprévus et la nécessité d'injecter une grande quantité de Mo/Ma par rat pour espérer

observer une migration de ces cellules dans la tumeur.

Du point de vue de l'expérimentation animale, le nombre de monocytes récupérés par extraction de la moëlle osseuse est très variable mais est de l'ordre de la centaine de millions de macrophages. Cela amène à sacrifier un rat donneur pour 3 à 6 rats receveurs environ, ce qui, du point de vue préclinique, représente un sacrifice conséquent pour traiter peu d'animaux. Du point de vue clinique, le grand nombre de macrophages nécessaires à l'implémentation de la méthode en injection intraveineuse rendrait impossible l'utilisation seule des monocytes du patient récupérés par prise de sang : avec 480 mL de sang humain (volume prélevé lors d'un don du sang au maximum, d'après le site du *Don du Sang*), on obtiendrait 240 millions de monocytes contre 10 milliards nécessaires (500 000 monocytes environ dans 1 mL de sang [Cell 08]). Il aurait donc fallu, comme cela se fait dans [Mads 13, Mads 15], utiliser des poches de sang pour en extraire les monocytes. D'autres études plus anciennes proposent la solution d'utiliser des cellules de donneurs ayant subi une dialyse péritonéale (2 à 6 milliards de macrophages injectés à l'homme [AL W 86, Al W 89]). L'injection de ces cellules n'a produit aucun effet secondaire dangereux pour le patient receveur. L'apparition de fièvre et de maux de tête dans quelques cas a été résolue par l'administration d'antipyrétiques.

10.4.4 Influence de présence de la BHE dans la migration des Mo/Ma primaires vers les tumeurs

Nos collaborateurs du CEA T. Rabilloud, C. Aude-Garcia et B. Dalzon ont étudié la capacité des Mo/Ma de souris primaires injectés par voie intraveineuse à migrer dans une tumeur sous-cutanée implantée. Le protocole de différenciation des Mo en Ma est similaire à celui que nous avons employé puisque cette équipe nous a transmis leurs connaissances sur ce point. Les cellules ont été marquées par des billes fluorescentes (FluoSphere Dark Red, *ThermoFisher Scientific*) avant injection. La figure 10.13 montre que la tumeur a bien un potentiel attractif pour les Mo/Ma injectés : ceux-ci s'y accumulent et leur présence est détectable encore 48h après l'injection. D'autre part, les Mo/Ma injectés sont aussi retrouvés dans les poumons, la rate, le foie et les glandes surrénales.

Bien que ces deux études ne soient pas non plus tout à fait comparables, elles permettent toutefois d'illustrer l'obstacle à la migration que représente la BHE. Les études tirées de la bibliographie (présentées dans l'état de l'art, section 3.2.2.2) démontrent qu'il est tout de même possible de faire migrer des Mo/Ma dans les gliomes. Cependant, plusieurs de ces études utilisent des animaux privés de système immunitaire. D'autre part, à notre connaissance, aucune étude n'a montré à ce jour la migration d'un nombre conséquent de Mo/Ma injectés dans la tumeur permettant de recouvrir une grande partie de la masse tumorale -ce qui serait nécessaire dans le contexte de l'application à la SSRT.

Remarque : nous pouvons aussi supposer que l'observation d'un faible nombre de cellules marquées relève de notre méthode d'observation. Certaines cellules auraient pu migrer mais si notre méthode d'observation (recherche d'un marquage sur des coupes histologiques) n'est pas assez performante, elle n'aurait pas permis de détecter la présence des cellules marquées dans le cerveau. Dans de nombreux articles de la littérature [Choi 12d, Jian 15, Brow 03], les cellules ayant migré sont bel et bien observées sur des coupes histologiques. La méthode d'analyse par observation des coupes histologiques semble donc appropriée.

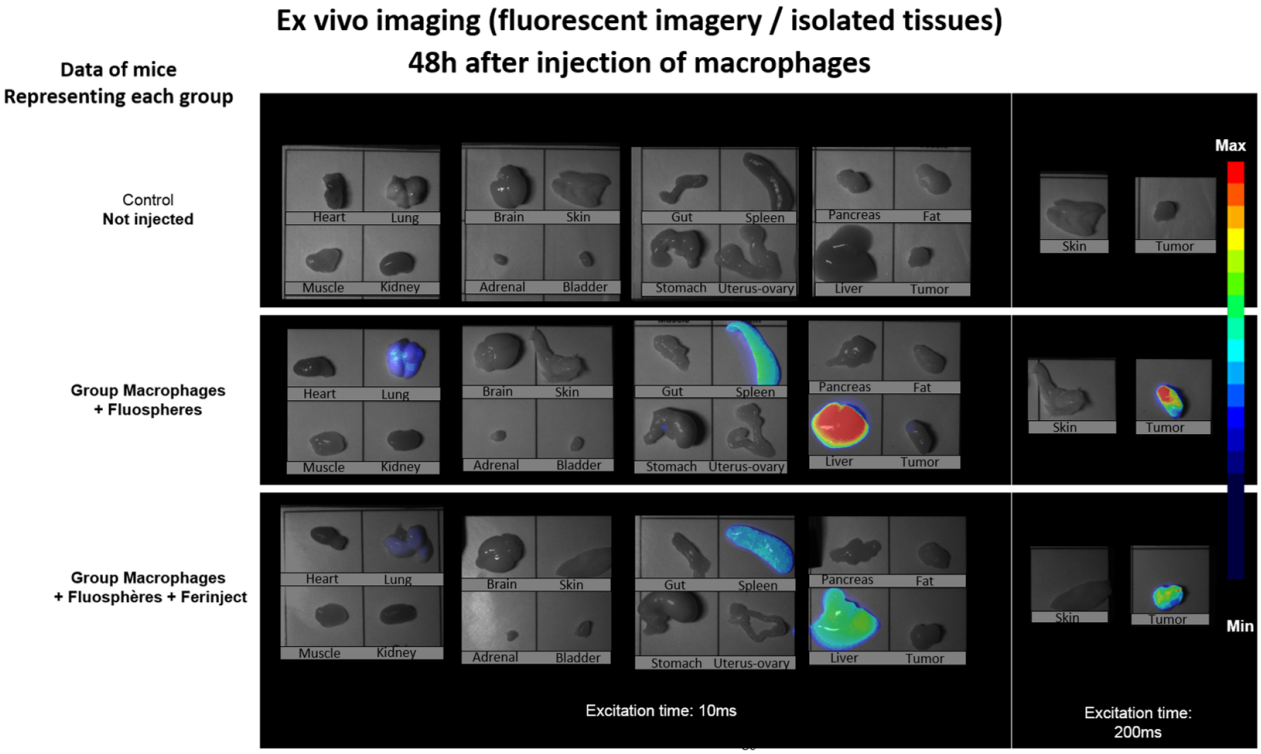


Figure 10.13 – *Imagerie ex vivo des organes d'animaux 48 h après injection (ou non) de macrophages primaires. Les macrophages, en plus d'avoir internalisé les billes fluorescentes permettant de les détecter, ont été chargés ou non de FerInject. D'après les travaux de Dalzon et al. [Dalz 18].*

10.4.5 Origine des Mo/Ma endogènes recrutés sur les sites d'inflammation

La population de cellules hématopoïétiques ("globules blancs", globules rouges et plaquettes) est maintenue par l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, qui se trouvent dans la moëlle osseuse pour les individus adultes. Cependant, il semblerait que certaines cellules immunitaires résidant dans certains tissus (foie, cerveau, poumon, épiderme) ne proviennent pas de ces cellules souches hématopoïétiques. Ainsi, l'origine de la microglie dans les tissus adultes n'est pas encore élucidée. Chez la souris, la majorité des macrophages résidant dans les tissus proviennent de "progéniteurs érythro-myéloïdes" (EMP) distincts des cellules souches hématopoïétiques [Gome 15]. Ceux-ci se développeraient dans la vésicule vitelline au stage embryonnaire, migreraient et coloniseraient le cerveau où ils prolifèreraient activement pendant le développement [Alli 99]. Les macrophages résidant dans le cerveau, faisant partie de la microglie, ne seraient donc pas originaires des cellules de la moëlle osseuse. Ainsi, cette population ne serait pas alimentée en temps normal par la migration de cellules indifférenciées présentes dans le sang.

Cependant, la présence d'une inflammation dans le cerveau peut changer les choses. Les études présentées dans la section 3.2.2.1 montrent que l'inflammation causée par l'irradiation de la tumeur promeut le recrutement de cellules immunitaires dans la zone tumorale [Jian 15]. Les cellules immunitaires recrutées dans les zones inflammées proviennent de la différenciation des cellules de la moëlle osseuse. Cependant, les recherches actuelles ne permettent pas à ce jour de savoir si la production des cellules immunitaires est réalisé de façon homogène dans tout le corps, ou si celle-ci est par exemple localisée selon l'emplacement de la zone inflammée [Heri 18]. Les doses déposées

dans les tumeurs avant l'injection des Mo/Ma lors de nos expériences sont loin d'être anecdotiques. Si ces doses ne permettent de recruter que peu de Mo/Ma circulant dans le sang, on peut aussi s'interroger sur l'origine des cellules immunitaires endogènes détectées dans les zones tumorales irradiées. Les études de Herrison *et al.* ont montré que, dans le cas d'un accident vasculaire cérébral ou d'une méningite aseptique chez la souris, les neutrophiles venant de la moëlle osseuse du crâne ont plus de probabilité de migrer dans les tissus cérébraux adjacents que les cellules provenant du tibia. Cette équipe découvert que les cellules myéloïdes de la moëlle osseuse du crâne migraient à travers des canaux vasculaires microscopiques qui relient la moëlle osseuse du crâne et la surface du cerveau [Heri 18]. Si la majorité des cellules immunitaires présentes dans les gliomes irradiés proviennent de la moëlle osseuse du crâne, cela pourrait donner une raison supplémentaire expliquant le peu de cellules ayant migré dans la tumeur.

Ces réflexions permettent d'alimenter la discussion sur les possibles obstacles à la méthode "Cheval de Troie". Malgré tout, plusieurs auteurs sont bien parvenus à faire migrer des Mo/Ma injectés par voie intraveineuse à travers la BHE [Kioi 10, Vala 07]. La même stratégie est par ailleurs employée avec des cellules souches neurales : Tobias *et al.* montrent que l'utilisation de cellules neurales pour transporter des virus oncolytiques (CRAd-Survivin-pk7) dans les gliomes contribue à l'augmentation significative de la survie de souris porteuses de gliome (survie de 35 jours lorsque cette stratégie est couplée à la radiothérapie et à la chimiothérapie (temozolomide), contre 24 jours pour le traitement comprenant seulement la radiothérapie et la chimiothérapie) [Tobi 13]. Cette stratégie est aujourd'hui portée en phase I d'essai clinique (NCT 03072134).

10.4.6 Conclusion générale

Aucun des **Mo/Ma de lignée** injectés par voie intraveineuse n'a été détecté dans les gliomes des animaux. Ces Mo/Ma ont probablement été détruits par le système immunitaire des rats. L'injection de **Mo/Ma primaires** par voie intraveineuse ne permet de retrouver qu'une dizaine de cellules injectées par coupe de cerveau de 20 μm. D'un point de vue thérapeutique, cette méthode ne permettrait pas d'obtenir un effet significatif : le fer serait acheminé en trop faible quantité dans la tumeur pour espérer avoir une augmentation du dépôt de dose dans la tumeur.

Nous avons donc étudié les capacités des Mo/Ma à se répartir dans la tumeur lorsqu'ils sont injectés par voie intra-tumorale. Cette stratégie garde un sens du point de vue clinique, car elle pourrait permettre de favoriser l'infiltration des NPs dans les tissus tumoraux, ce qui reste complexe à réaliser même avec la CED. Les résultats ont montré que les Mo/Ma injectés directement dans la tumeur ne se répartissaient que dans une partie limitée du gliome. Une telle répartition ne permettrait d'obtenir un effet d'augmentation de dose que dans les quelques régions occupées par les Mo/Ma. Pour espérer obtenir des résultats précliniques significatifs sur la survie des rats après irradiation, il aurait été nécessaire que les Mo/Ma migrent dans la totalité de la tumeur de façon à s'y répartir, au lieu de rester autour de leur point d'injection.

Cependant, cette méthode reste pertinente dans le contexte d'autres applications thérapeutiques. En effet, dans le cas de la "photoactivation" du fer, l'effet thérapeutique ne peut être espéré que lorsqu'un nombre conséquent de Mo/Ma chargés en fer se répartit de manière uniforme dans la tumeur. Pour d'autres méthodes thérapeutiques, en chimiothérapie par exemple, cette limite peut ne pas être aussi élevée. La méthode Cheval de Troie ainsi développée peut être utilisée dans le cas où la quantité de cellules ayant migré suffit à obtenir des résultats intéressants d'un point de vue thérapeutique.

De plus, d'autres auteurs sont parvenus à faire fonctionner cette méthode *in vivo* : les études

montrent une augmentation significative de la survie des animaux grâce aux composés transportés par les cellules [Mads 15, Tobi 13]. L'utilisation de cellules souches neurales comme transporteurs fait l'objet d'un essai clinique de phase I dans le cadre du traitement du glioblastome (NCT 03072134). Il est donc possible d'optimiser le protocole de manière à assurer un transport efficace des composés dans les gliomes.

10.5 Le Chapitre 10 en quelques mots

Les expériences présentées dans ce chapitre avaient pour objectif de tester le potentiel des Mo/Ma comme vecteurs pour transporter les NPs Fe jusqu'à la tumeur. Lors de ces expériences, les tumeurs cérébrales des animaux sont **préalablement irradiées de façon à accroître leur potentiel attractif pour les Mo/Ma**. Puis les Mo/Ma marqués sont injectés par voie intraveineuse dans les animaux. Après une durée pendant laquelle les cellules migrent et se répartissent dans les organes, et éventuellement dans la tumeur, les animaux sont sacrifiés, leurs cerveaux sont prélevés et les coupes sont observées au microscope de façon à y retrouver les cellules marquées.

Différentes stratégies de marquage ont été testées. Le choix du marquage est un point clef de l'expérience : celui-ci doit être assez robuste pour pouvoir être repéré après plusieurs jours *in vivo*, sans toutefois perturber le comportement des cellules.

- le DDAO a montré une toxicité trop importante,
- le CFSE est moins toxique mais le marquage est peu reconnaissable après plusieurs jours en *vivo*,
- le Hoechst est toujours visible après plusieurs jours et ne semble pas trop affecter les cellules, mais son emploi empêche l'utilisation simultanée du DAPI sur les coupes histologiques,
- nous ne sommes pas parvenus à mettre la méthode de marquage FISH au point,
- les billes fluorescentes (colorant vert) sont reconnaissables après plusieurs jours en *vivo* mais leur internalisation peut perturber les cellules,
- il est aussi possible d'utiliser les NPs Fe comme marqueur, et de les repérer sur les coupes avec le bleu de Prusse. Cette méthode fonctionne bien mais l'internalisation des NPs Fe peut affecter le fonctionnement des cellules. De plus, nous n'avons pas de recul sur la sensibilité de cette méthode.

Différentes stratégies d'injection des Mo/Ma ont été expérimentées sur les animaux porteurs de gliome :

- les Mo/Ma de lignée (J774A.1, RAW264.7, P388D1 CCL-46 et NR-8383) injectés en i.v. ne parviennent pas à rejoindre la tumeur (possible destruction par le système immunitaire de l'animal).
- les Mo/Ma primaires injectés en i.v. ne parviennent à migrer dans la tumeur qu'en faible nombre (insuffisant pour espérer un effet thérapeutique grâce à l'irradiation successive des NPs Fe).
- les Mo/Ma primaires injectés directement dans la tumeur ne s'y répartissent pas de manière assez homogène pour espérer un bénéfice thérapeutique par rapport à l'injection des NPs Fe seules.

Chapitre 11

Approche Ultra-sons : ouverture

Sommaire

11.1 Matériels et méthodes 230
11.1.1 Protocole d'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés 230
11.1.2 Imagerie IRM et détection indirecte de la présence de NPs Fe 231
11.2 La motivation : une étude pilote sur deux rats sains 233
11.2.1 Résultats : ouverture de la BHE suivie d'une injection de NPs Fe 233
11.2.2 Discussion suite à cette expérience pilote 233
11.3 Résultats : ouverture locale de la BHE chez le rat sain ou porteur de tumeur F98 pour améliorer la répartition des NPs Fe 235
11.3.1 Ouverture de la BHE chez le rat sain 236
11.3.2 Injection des NPs Fe par voie intraveineuse après ouverture de la BHE chez le rat sain 236
11.3.3 Injection intraveineuse de NPs Fe après ouverture de la BHE chez le rat porteur de gliome F98 238
11.4 Discussion générale : ouverture de la BHE par ultrasons focalisés . . . 240
11.4.1 Reproductibilité du tir et ciblage de la tumeur 240
11.4.2 Accumulation des NPs Fe dans la zone perméabilisée ? 240
11.4.3 Ajout d'étapes au protocole expérimental pour résoudre le problème des "cas litigieux" 241
11.4.4 Influence de la sonication 241
11.4.5 Optimisation des paramètres du protocole 242
11.4.6 Possibilité de transfert de cette méthode à l'accumulation d'un agent de contraste au Gd 242
11.5 Conclusion et perspectives 244
11.6 Le Chapitre 11 en quelques mots 245

Objectif : ouverture temporaire et locale de la BHE permettant l'infiltration des NPs Fe dans le gliome

La méthode Cheval de Troie étudiée dans les chapitres 9 et 10 ne s'est pas avérée applicable à notre stratégie thérapeutique SSRT renforcée par les NPs Fe. En effet, la répartition des NPs Fe qu'elle induit est insuffisante pour espérer obtenir un bénéfice thérapeutique suite à l'irradiation. Une autre stratégie a été abordée au cours de cette thèse : il s'agit d'ouvrir localement la barrière hémato-encéphalique au niveau de la tumeur. Ainsi, les NPs habituellement bloquées par cette barrière naturelle peuvent s'accumuler dans la tumeur de façon bien plus importante que par l'effet passif EPR (qui repose sur la non étanchéité des vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur).

Cette méthode repose sur l'interaction entre des microbulles injectées par voie intraveineuse et des ultrasons délivrés dans la zone à traiter (Fig. 11.1). Les microbulles entrent en résonance avec les ultrasons et se compriment et enflent périodiquement. L'équilibre peut être aussi rompu et la microbulle éclate. Ces deux phénomènes physiques accompagnés d'autres processus contribuent à rendre la BHE plus perméable (voir section 3.3) [Liu 14].

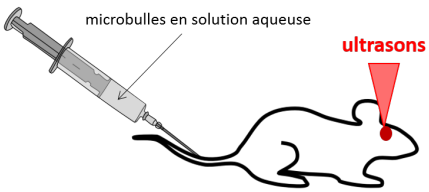


Figure 11.1 – *Injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons pour ouvrir la BHE d'un rat porteur de tumeur.*

Ce chapitre expose les résultats des premières expériences d'ouverture de la BHE appliquées à l'accumulation des NPs Fe dans la tumeur : il ne représente pas une étude complète mais plutôt une ouverture de ce projet de thèse. Ces expériences ont été rendues possibles grâce à la collaboration amorcée avec une équipe du GIN (Grenoble Institut des Neurosciences) qui étudie l'ouverture de la BHE par ultrasons (Vasile Stupar, Nora Collomb et Emmanuel Barbier). Les micro-bulles sont fournies par un de leurs collaborateurs, Anthony Delalande (Université d'Orléans) qui possède une expertise dans ce domaine.

11.1 Matériels et méthodes

Le modèle de gliome de rat F98 est décrit dans la section A.4 et détaillé en annexe (B.6.1). Les NPs Fe de l'équipe coréenne sont décrites dans la section A.1.2 et caractérisées dans le chapitre 5.

11.1.1 Protocole d'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés

Tout d'abord, la solution lyophilisée de microbulles est reconstituée dans un tampon HEPES à 10 mM. Le rat est anesthésié sous isoflurane, son crâne est rasé et épilé et du gel utilisé en routine pour les échographies y est apposé. Le rat est ensuite placé dans un berceau fixé sur une plateforme et la plateforme est montée jusqu'à ce que la tête du rat entre en contact avec la membrane, comme

visible sur la figure 11.2. La position du rat sous la membrane est ensuite précisément réglée à l'aide des lasers d'alignement.

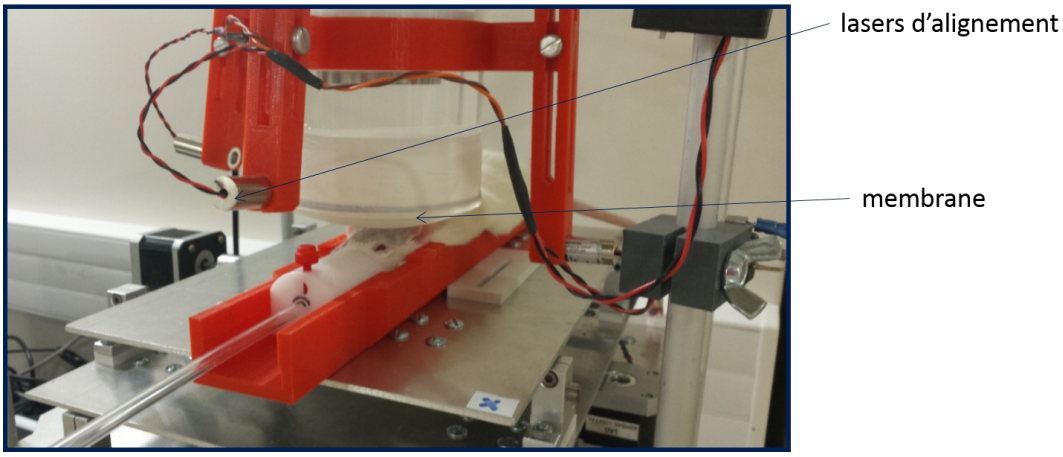


Figure 11.2 – *Set-up d'ouverture de la BHE par ultrasons (collaboration GIN V. Stupar, A. Delalande, N. Collomb).*

Un mélange de tampon HEPES et de microbulles est injecté par voie intraveineuse *via* un cathéter placé dans la veine caudale de l'animal. L'injection se fait à l'aide d'un pousse-seringue relié au poste de contrôle. Celle-ci est ainsi synchronisée avec le déclenchement de l'envoi des ultrasons qui survient 20 s après l'injection et dure 1 minute (Fig. 11.3). Dès l'arrêt des ultrasons, des NPs Fe sont éventuellement injectées par le cathéter. Dans tous les cas, environ 200 µL de Dotarem sont injectés à la suite puis le cerveau de l'animal est imagé par IRM (GIN, Grenoble). L'animal est ensuite sacrifié et son cerveau est prélevé pour analyse histologique ou imagerie supplémentaire.

Le protocole de la reconstitution des microbulles et de l'ouverture de la BHE est détaillé en annexe (B.6.4).

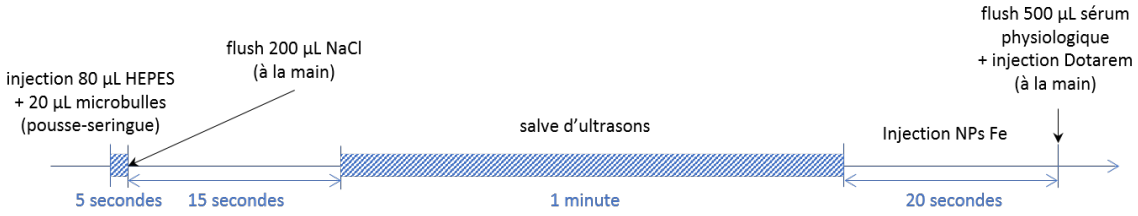


Figure 11.3 – *Protocole d'ouverture de la BHE grâce à l'interaction ultrasons - micro-bulles. Des NPs de fer sont injectées ici après l'ouverture afin de tester leur propension à s'accumuler dans les zones où les vaisseaux ont été rendus perméables.*

11.1.2 Imagerie IRM et détection indirecte de la présence de NPs Fe

L'IRM, ou Imagerie par Résonance Magnétique, est une méthode d'imagerie non invasive utilisée pour imager principalement les "tissus mous" (*e.g.* cerveau, coeur ou muscles). Elle repose principalement sur une propriété des noyaux des atomes d'hydrogènes (qui représentent 63% du corps humain, étant un composant de l'eau) : lorsqu'ils sont soumis à une onde électromagnétique

radio-fréquence, ils absorbent l'énergie de l'onde et la restituent selon un processus appelé *relaxation*. De plus, ces noyaux, comme toute charge en rotation, peuvent être considérés comme des aimants. Dans le corps, ces aimants ne sont pas alignés : l'aimantation totale qui en résulte est donc nulle.

Très schématiquement, l'IRM fonctionne en appliquant un fort champ magnétique combiné à une onde électromagnétique radio-fréquence. Le champ magnétique permet d'aligner tous ces aimants et de les orienter dans la même direction. L'onde radio-fréquence, elle, participe à deux phénomènes : d'une part, les noyaux vont "tourner en phase", de manière synchrone. D'autre part, leur orientation va un peu changer et ils vont s'aligner selon un nouvel axe. Lorsque l'onde radio-fréquence stoppe, l'aimantation des tissus revient à l'équilibre. Les "aimants" reviennent dans la direction initiale produite par le fort champ magnétique seul, et ils cessent de tourner ensemble : ils se déphasent. Comme l'onde a apporté de l'énergie aux tissus sur son parcours, ceux-ci vont donc restituer cette énergie sous forme d'un signal que l'on détecte. Grâce aux technologies actuelles, il est possible de déterminer l'origine de l'émission de ce signal, et donc la position des atomes d'hydrogène qui l'ont émis. On obtient alors une image de la position des atomes d'hydrogène, et donc, selon leur agencement dans les tissus, des différents organes du corps (d'après : *Groupe d'Imagerie Médicale Léonard de Vinci*).

Petit aparté sur l'analyse des images IRM obtenues : les images IRM présentées dans ce chapitre sont des images pondérées. Cela implique que la valeur de chaque pixel est donnée en unité arbitraire. L'obtention d'images apportant des données quantitatives demande des séquences bien plus longues qui n'ont pas pu être mises en place dans ces expériences. Plusieurs constantes de temps sont utilisées dans les images présentées ci-après : **la constante de temps T1** caractérise la relaxation dite longitudinale (*le temps que les "aimants" mettent pour revenir dans l'orientation due au champ fort seul*), et **la constante de temps T2** caractérise la relaxation transversale (*le temps que les "aimants" mettent pour se déphaser totalement à nouveau*). Ceux-ci sont spécifiques de certaines propriétés physiques des tissus imagés. Les constantes de temps T1 et T2 n'apportent pas le même type d'information. Dans notre contexte, les images pondérées T1 indiquent par exemple l'accumulation d'eau ou du Gd dans les tissus. L'accumulation de Gd indique une perméabilisation de la BHE ou la présence d'une tumeur, tandis qu'une accumulation d'eau peut être synonyme de la présence d'un oedème. Les images T2 permettent d'observer les tumeurs et les oedèmes. Les images T2* sont liées aux images T2. Plus précisément, une image T2* représentent une image "observée" ou "brute" de la vraie image T2. La RMN [1] étant très sensible aux variations du champ, toute inhomogénéité est détectée et perturbe la mesure. Cette inhomogénéité peut être due à l'imperfection de l'aimant ou à la présence de composés dans les tissus qui perturberaient le champ magnétique local. L'image T2 est obtenue grâce à une séquence permettant de "gommer" ces imperfections. Néanmoins, dans notre cas, l'image "brute" T2* nous intéresse tout particulièrement : les NPs Fe injectées étant magnétiques, celles-ci "perturbent" le champ magnétique local. Il est donc possible, de cette manière, de les détecter indirectement sur les images T2*.

1. La RMN, ou Résonance Magnétique Nucléaire, est le phénomène physique utilisé en imagerie IRM. Elle est fondée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux, et en particulier des noyaux d'hydrogène dans le cas de l'IRM.

11.2 La motivation : une étude pilote sur deux rats sains

Une première expérience pilote a été menée avec deux rats sains. Il s'agissait alors de faire un essai d'ouverture de la BHE grâce au couplage micro-bulles et ultrasons, et d'injecter dans la foulée des NPs de fer (NPs de l'équipe coréenne) afin de déterminer si celles-ci s'accumulaient dans la zone perméabilisée. Les NPs Fe ont été soniquées la veille de l'expérience (protocole : B.1.4).

Rapidement, l'expérience s'est déroulée selon les étapes suivantes :

- Sous anesthésie isoflurane 2-3%, les rats ont reçu les micro-bulles par voie veineuse puis une salve d'ultrasons a été délivrée au moment ou le bolus de microbulles atteignait le cerveau. Ce timing précis a été étudié précédemment par l'équipe du GIN et le protocole est précisément exécuté grâce à l'utilisation d'un pousse-seringue couplé au générateur d'ultrasons (figure 11.1).
- Directement après la fin des ultrasons, 900 µL de solution mère de NPs Fe (25 mg (Fe_3O_4)/mL) ont été injectées par voie veineuse pendant 20 secondes et poussées par du sérum physiologique.
- Ensuite, 100 µL d'agent de contraste au Gadolinium (Dotarem) ont été injectés par voie veineuse afin d'attester de l'ouverture de la BHE.
- Les rats ont été imagés par IRM dans la foulée, puis sacrifiés après imagerie afin de poursuivre par une analyse en histologie des coupes de cerveau.

11.2.1 Résultats : ouverture de la BHE suivie d'une injection de NPs Fe

Pour le premier rat, on observe l'accumulation de Gd dans la zone ciblée lors du tir des ultrasons. Cette zone donc été perméabilisée et la prise de contraste au Gd est visible en T1 dans la Figure 11.4. Les ultrasons ont bien permis d'ouvrir la BHE dans leur passage, formant une "colonne" dans laquelle la diffusion des molécules est momentanément possible (disque visible en coupe axiale, et rectangle en coupe coronale).

D'autre part, en comparant les images T2 et T2*, on observe une perturbation locale du champ au niveau de l'ouverture de la BHE dans l'image T2*. Cette perturbation pourrait être due à la présence des NPs Fe dans la zone dans laquelle la BHE a été ouverte. Les NPs se seraient accumulées de façon passive à cet endroit. Pour confirmer cette affirmation, il serait intéressant de réaliser une étude histologique des coupes (ce qui n'a pas pu être fait pendant cette thèse par manque de temps).

L'ouverture de la BHE n'a pas fonctionné avec le deuxième animal.

11.2.2 Discussion suite à cette expérience pilote

11.2.2.1 "Inhomogénéité" de l'ouverture de la BHE

On observe que les NPs Fe semblent se répartir selon un *pattern* régulier : la période spatiale de ce *pattern* est de 0.68 mm environ (2.06 mm pour trois périodes mesurées sur les images). La fréquence f des ultrasons utilisés étant de 1.2 MHz, il est possible d'en déduire leur longueur d'onde λ : $\lambda = c_{son/eau}/f$ avec $c_{son/eau} = 1500$ m/s, la célérité du son dans l'eau. Ceci mène à $\lambda = 1.25$ mm. Dans le cas d'une onde stationnaire, la distance entre deux ventres (ou deux noeuds) est $f/2$ donc, dans notre cas, de 0.62 mm. Cette valeur est proche des 0.68 mm mesurés.

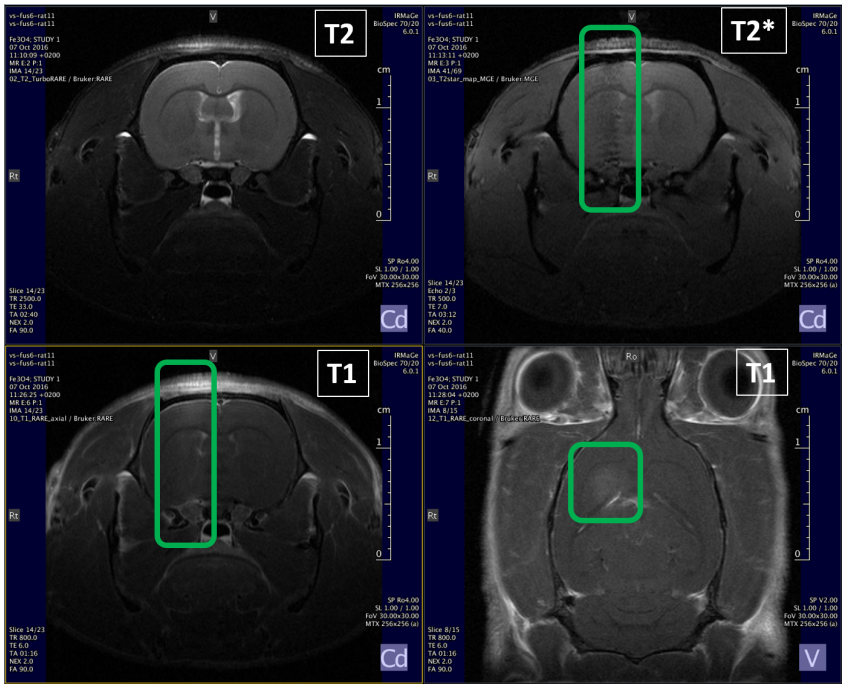


Figure 11.4 – *Observation d'un cerveau de rat sain par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de NPs de fer (in vivo). Les séquences IRM observées sont, en haut : T2 à gauche et T2* à droite ; en bas : T1, selon la coupe coronale à gauche et axiale à droite.*

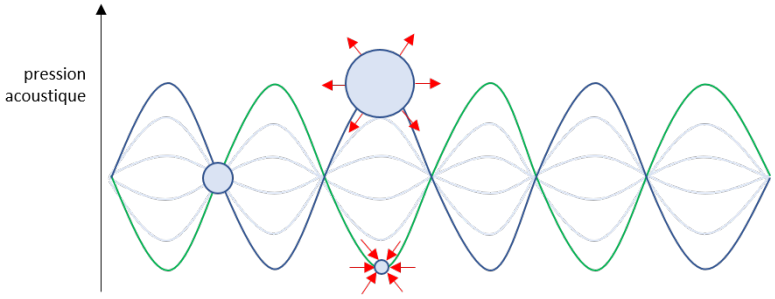


Figure 11.5 – *Principe des "ventres" et "noeuds" : la taille des microbulles étant situées sur un "noeud" n'évolue pas. Les microbulles situées sur un "ventre" enflent par exemple à t_1 (courbe bleue) et se compriment à t_2 (courbe verte). Figure réalisée d'après le principe physique explicité dans la publication [Liu 14].*

Cette observation suggèrerait que le fer s'accumule différemment dans les zones de ventre ou de noeuds des ultrasons. Il est en fait possible que, dans une zone de "ventre", les microbulles enflent et désenflent avec une grande amplitude, voire éclatent, provoquant la perméabilisation de la BHE (et donc, permettant le passage des NPs Fe qui sont bien plus grosses que les molécules de Dotarem) (voir figure 11.5). Tandis que dans une zone de "noeud", les micro-bulles resteraient dans un état plus stable : la perméabilisation de la BHE à cet endroit serait plus limitée et ne laisserait donc passer que les petites molécules.

11.2.2.2 Remarques sur l'optimisation du protocole

Suite à cette première expérience pilote qui nous a permis de prendre un peu de recul sur la technique, certaines remarques concernant le protocole et le *set-up* pourraient permettre d'alimenter la réflexion afin d'optimiser la méthode pour la suite. Les principales remarques sont notées ici : si ce projet est poursuivi au sein de l'équipe, j'espère que ce chapitre permettra d'avancer sur le projet sans reprendre la réflexion à son stade initial.

1. **Changer le protocole d'anesthésie** n'est pas anodin pour cette expérience. En effet, le timing entre l'injection du bolus de microbulles dans la veine caudale et l'envoi de la salve d'ultrasons représente exactement le temps que met le bolus de microbulles pour partir de la veine de la queue et arriver dans le cerveau *via* la circulation sanguine. Changer le protocole d'anesthésie peut donc avoir des conséquences imprévues sur la méthode. Si, lors de ces expériences, les rats sont anesthésiés à l'isoflurane, il est aussi envisageable de les anesthésier par kétamine-xylazine. Cependant, la kétamine-xylazine modifie la circulation sanguine car elle est source de vasoconstriction. Le temps pour que le bolus de microbulles atteigne le cerveau est donc modifié et le timing d'envoi des ultrasons n'est plus valable. Changer le processus d'anesthésie peut impliquer de caractériser à nouveau tout le *set-up* pour l'adapter.
2. Le **volume de solution de microbulles** (20 µL) n'est pas prélevé du flacon avec précision : on utilise en effet une seringue pour piquer à travers la membrane du flacon. Le volume prélevé peut aller du double ou simple selon l'équipe collaboratrice. L'obtention de résultats reproductibles serait peut être plus aisée avec un volume prélevé avec plus de précision (à la micropipette par exemple), bien que cela demande de réfléchir à des adaptations du protocole pour ce faire.
3. Le **positionnement du rat sous la membrane** est un point sensible du protocole. Les pointeurs laser permettent de positionner l'animal au mieux mais il reste parfois possible de faire une petite erreur d'alignement. Si l'angle entre la salve d'ultrasons et le crâne du rat varie, les ultrasons peuvent subir des réflexions indésirables sur le crâne du rat, empêchant l'ouverture de la BHE.
4. Au moment de cette expérience pilote, cette méthode d'ouverture de la BHE engendre encore des risques d'œdème comme effet secondaire, même si le protocole est bien plus optimisée qu'à ses prémices.

Conclusion : ce premier essai montre que l'approche de l'ouverture de la BHE par ultrasons est envisageable : les résultats obtenus avec ce premier rat, notamment l'observation des images T2*, sont très encourageants et incitent à approfondir cette étude. Néanmoins, le deuxième animal nous rappelle que nous sommes loin de maîtriser le procédé et que les images obtenues doivent être interprétées avec prudence.

11.3 Résultats : ouverture locale de la BHE chez le rat sain ou porteur de tumeur F98 pour améliorer la répartition des NPs Fe

Depuis les expériences pilote qui s'étaient déroulées un an auparavant, l'équipe de Vasile Stupar a pu développer un savoir-faire dans le domaine et maîtriser davantage la méthode. L'ouverture de

la BHE se fait dorénavant avec plus de finesse et les lésions n'apparaissent en profondeur que de manière vraiment occasionnelle.

11.3.1 Ouverture de la BHE chez le rat sain

L'ouverture de la BHE chez le rat Fischer a été expérimentée sur quatre rats sains. Nous avons utilisé le protocole suivant :

- Sous anesthésie isoflurane 2-3%, les rats ont reçu les micro-bulles par voie veineuse puis une salve d'ultrasons a été délivrée au moment ou le bolus de microbulles atteignait le cerveau. Nous appellerons "tir" la délivrance de la salve d'ultrasons dans la suite.
- Ensuite, 100 µL d'agent de contraste au Gadolinium (Dotarem) a été injecté par voie veineuse afin d'attester de l'ouverture de la BHE.
- Les rats ont été imagés par IRM dans la foulée, puis sacrifiés après imagerie afin de poursuivre par une analyse en histologie des coupes de cerveau.

Lors que la perméabilité de la BHE causée par les ultrasons n'est pas mise en évidence par la prise de contraste, l'expérience d'ouverture de la BHE est renouvelée dans l'autre hémisphère du cerveau si l'état du rat le permet.

Quatre rats Fischer sains ont été consacrés à cette expérience. Voici un petit récapitulatif résumant les résultats observés à l'issu de cette expérience :

- l'ouverture de la BHE semble avoir bien fonctionné pour 4 tirs.
- l'ouverture de la BHE semble avoir échoué pour 3 tirs. Les raisons de cet échec sont en général inconnues, mais pour l'un des trois cas, nous suspectons une mauvaise délivrance des micro-bulles dans la circulation sanguine (*flush* de rinçage au sérum physiologique après injection des micro-bulles peu efficace). Pour un deuxième cas, cet échec peut être du au changement de réglage du générateur à ultrasons, nous y reviendrons dans la suite.

Lorsque le tir a bien fonctionné et que la BHE est ouverte, nous pouvons observer les images IRM caractéristiques présentées dans la figure 11.6. Cette figure regroupe deux des quatre exemples où l'expérience semble s'être déroulée avec succès. La prise de contraste dans le cerveau au niveau du tir est bien visible dans les séquences T1, signe que l'agent de contraste s'accumule bien dans les zones où la BHE est devenue perméable.

11.3.2 Injection des NPs Fe par voie intraveineuse après ouverture de la BHE chez le rat sain

Nous avons ensuite réalisé une ouverture de la BHE chez le rat sain suivie de l'injection par voie intraveineuse de NPs Fe. L'objectif de l'expérience est de vérifier si la perméabilisation locale de la BHE favorise bien l'accumulation des NPs dans cette zone. Cinq rat Fischer sains ont été consacrés à cette expérience.

Le protocole est très similaire à celui utilisé précédemment. Pour plus de clarté dans le manuscrit, nous en redonnons ici les grandes étapes :

- Sous anesthésie isoflurane 2-3%, les rats ont reçu les micro-bulles par voie veineuse puis une salve d'ultrasons a été délivrée au moment ou le bolus de microbulles atteignait le cerveau.

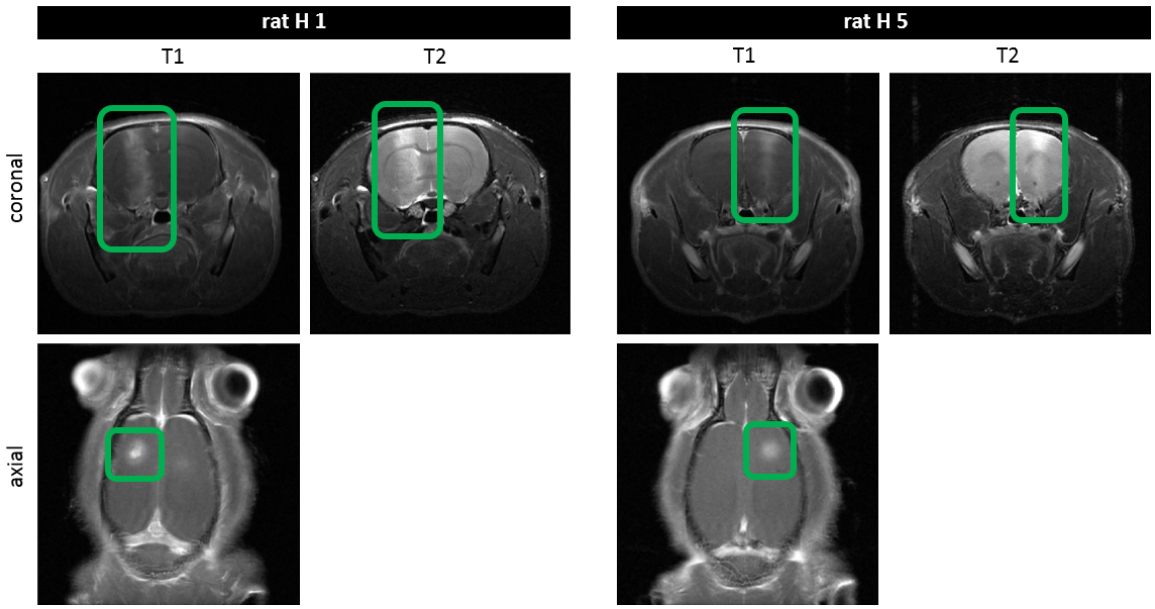


Figure 11.6 – *Observation de cerveaux de rats sains par IRM après injection de micro-bulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 100 µL d'agent de contraste au Gd pour confirmer l'ouverture de la BHE (observation in vivo).*

- 200 µL de solution mère de NPs Fe soniquées la veille sont injectés dans la veine caudale. Un rat reçut 1 mL afin de tester la faisabilité d'injection d'un aussi gros volume (toxicité et gain potentiel à étudier par la suite).
- Ensuite, environ 100 µL d'agent de contraste au Gadolinium (Dotarem) a été injecté par voie veineuse afin d'attester de l'ouverture de la BHE.
- Les rats ont été imagés par IRM dans la foulée, puis sacrifiés après imagerie afin de poursuivre par une analyse en histologie des coupes de cerveau.

Comme précédemment, lorsque l'ouverture n'est pas mise en évidence par une prise de contraste et si l'état du rat le permet, l'expérience d'ouverture de la BHE est renouvelée dans l'autre hémisphère du cerveau.

Voici un résumé des résultats obtenus sur les cinq rats Fischer sains consacrés à cette expérience :

- l'ouverture de la BHE a réussi pour 3 tirs.
- l'ouverture de la BHE a échoué pour 3 tirs (un rat, celui ayant reçu 1 mL de NPs Fe, n'a montré aucun signe d'ouverture de la BHE ; pour les autres, les images obtenues ne permettaient pas de valider avec certitude l'ouverture de la BHE).
- une perturbation du champ (images T2*) a été observée pour un rat.
- aucune perturbation du champ particulière (images T2*) n'a pu être observée pour deux rats malgré *a priori* une ouverture de la BHE.

On observe, dans un des cas, une prise de contraste en T1 qui atteste que la barrière a bien été ouverte (cf Fig. 11.7). La perturbation du champ visible dans les images T2* peut être due à la présence de fer dans la zone perméabilisée.

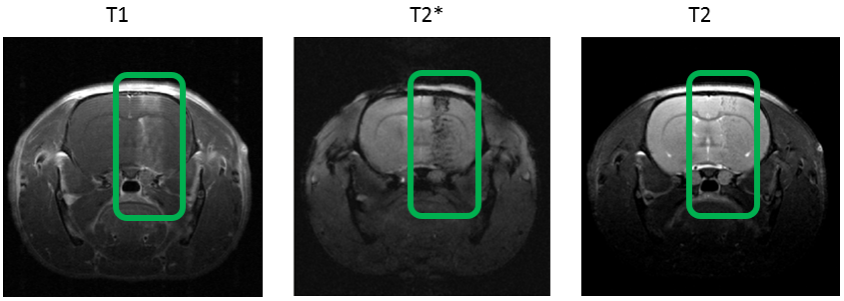


Figure 11.7 – *Observation d'un cerveau de rat sain par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 200 µL de solution mère de NPs de fer (observation in vivo). 100 µL d'agent de contraste au Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE. Le pattern observé en T2* est susceptible de provenir des NPs. Une analyse histologique est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.*

11.3.3 Injection intraveineuse de NPs Fe après ouverture de la BHE chez le rat porteur de gliome F98

L'ouverture de la BHE chez le rat porteur de tumeur n'a pas été expérimentée sans injection successive d'un composé. En effet, la tumeur accumule déjà le Gd par effet passif : il aurait donc été complexe de différencier la tumeur de la zone perméabilisée par le tir.

Cette expérience a pour objectif d'étudier la faisabilité de l'ouverture de la BHE au niveau de la tumeur cérébrale d'un rat, afin d'augmenter l'accumulation des NPs Fe dans la zone tumorale et ainsi d'obtenir des concentrations en NPs supérieures à ce qu'il est possible d'obtenir avec l'EPR seul.

Rapidement, l'expérience s'est déroulée selon les étapes suivantes :

- Sous anesthésie isoflurane 2-3%, les rats ont reçu les micro-bulles par voie veineuse puis une salve d'ultrasons a été délivrée au moment ou le bolus de microbulles atteignait le cerveau.
- 1 mL de solution mère de NPs Fe soniquées la veille sont injectés dans la veine caudale. Un rat reçut seulement 200 µL suite à des problèmes rencontrés lors de l'injection.
- Ensuite, environ 100 µL d'agent de contraste au Gadolinium (Dotarem) a été injecté par voie veineuse afin d'attester de l'ouverture de la BHE.
- Les rats ont été imagés par IRM dans la foulée, puis sacrifiés après imagerie afin de poursuivre par une analyse en histologie des coupes de cerveau.

Les rats ont été placés dans le cadre de façon à ce que les ultrasons soient délivrés le plus précisément possible au niveau de la tumeur.

Six rats Fischer porteurs de gliome F98 (16 jours après implantation) ont été consacrés à cette expérience. Les résultats peuvent être récapitulés comme suit :

- l'ouverture de la BHE semble avoir fonctionné pour trois tirs, mais à chaque fois les tirs ont perméabilisé la barrière dans un volume cylindrique à côté de la tumeur et non au sein de celle-ci.
- l'ouverture de la BHE a échoué pour un rat.
- pour deux rats, il n'est pas certain que l'ouverture ait réussi. La prise de contraste peut être seulement due à la présence de la tumeur.
- une perturbation du champ (image T2*) a été observée dans la tumeur et dans le sillage du tir ultrasons pour les trois rats pour lesquels l'ouverture de la BHE a bien fonctionné.

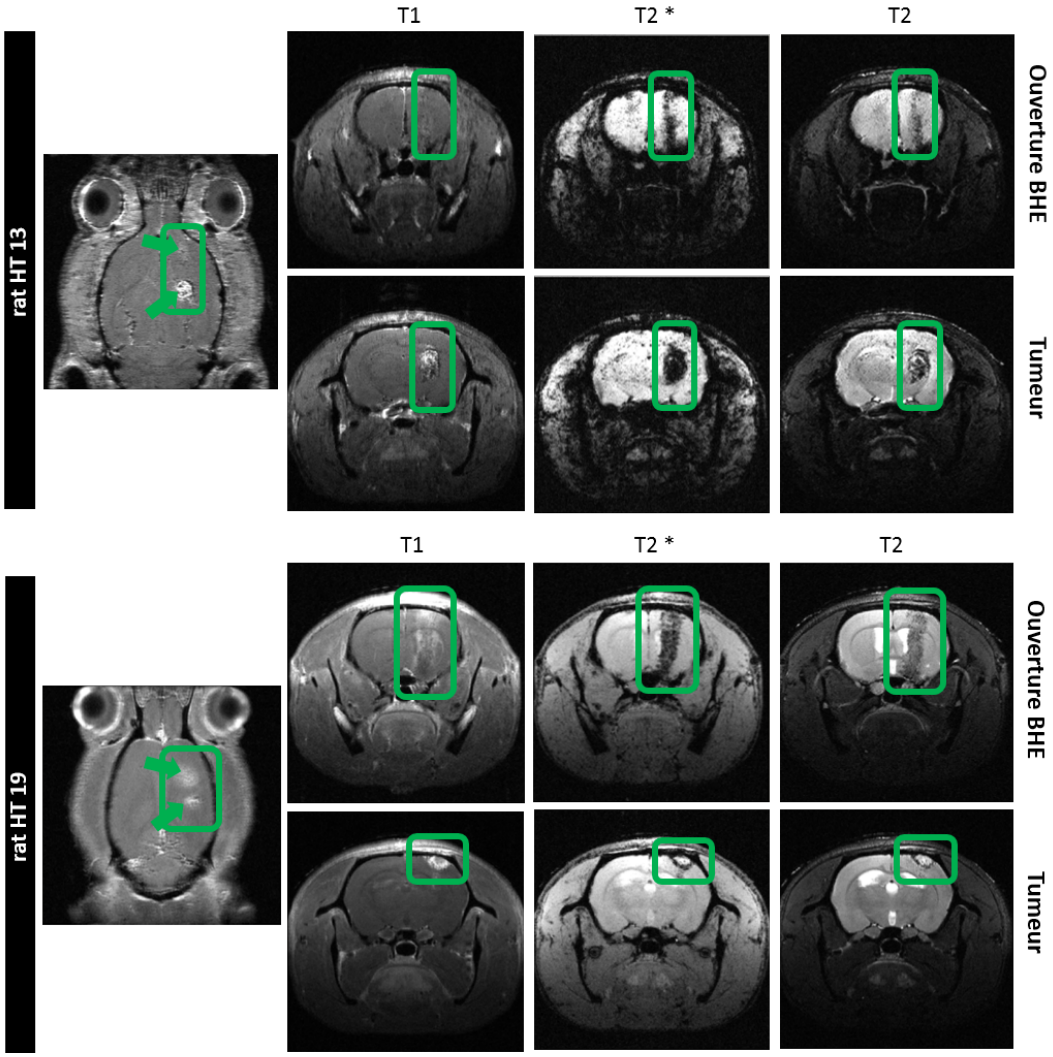


Figure 11.8 – *Observation de cerveaux de rats porteurs de tumeur F98 par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 1 mL de solution mère de NPs de fer (observation in vivo). 100 µL d'agent de contraste au Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE. La perturbation du signal T2 observée en T2* est susceptible de provenir des NPs. Une analyse histologique est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.*

La figure 11.8 illustre deux des tirs qui ont permis d'ouvrir la BHE avec succès. On peut observer, dans chacun des cas, la prise de contraste en T1 en deux endroits du cerveau (voir la coupe axiale à gauche de la figure pour chaque cas illustré). En effet, d'une part, le gadolinium s'accumule dans la tumeur par effet EPR (coupes coronales du bas de la figure pour chaque cas). D'autre part, le gadolinium s'accumule aussi dans les zones dont la vascularisation a été rendue momentanément perméable par l'interaction ultrasons et micro-bulles (coupes coronales du haut de la figure pour chaque cas).

Si l'on compare les images T2 et T2*, nous pouvons remarquer la présence d'une perturbation du champ à la fois dans ou autour de la tumeur et dans la zone d'ouverture de la BHE. Par expérience, il semblerait qu'il soit maintenant rare que des lésions aussi profondes soient créées avec les ultrasons couplés aux micro-bulles. Le signal observé peut donc possiblement être attribué

aux NPs Fe.

11.4 Discussion générale : ouverture de la BHE par ultrasons focalisés

11.4.1 Reproductibilité du tir et ciblage de la tumeur

Tout d'abord, l'ouverture de la BHE suite à l'injection des microbulles couplée à la salve d'ultrasons n'est pas systématique. Les raisons de l'échec de l'ouverture ne sont pas connues mais peuvent être dues à l'un des éléments discutés précédemment (11.2.2.2), dont une mauvaise position du rat sous la membrane entraînant des réflexions indésirables des ultrasons ou un volume insuffisant de microbulles prélevé.

D'autre part, dans le cas de l'ouverture de la BHE chez le rat tumeur, la zone perméabilisée n'est que rarement superposée avec la tumeur. En fait, aucun des trois tirs ayant permis d'ouvrir la BHE de façon certaine n'est superposé à la tumeur. Il s'est en effet avéré lors de l'expérience qu'il était complexe de "viser" avec précision la tumeur avec les ultrasons. La position exacte du rat sous la membrane qui permettrait de faire coïncider la salve d'ultrasons et la tumeur est difficile à déterminer et, lorsque le rat est installé, nous n'avons pour le moment aucun moyen de savoir si la position de l'animal est correcte avec ce niveau de précision.

11.4.2 Accumulation des NPs Fe dans la zone perméabilisée ?

L'injection de NPs Fe par voie intraveineuse suite à l'ouverture de la BHE entraîne, pour les rats sains et les rats porteurs de gliomes, l'apparition d'une perturbation du champ en T2*. Cette perturbation peut être attribuée à la présence de fer, provenant soit des NPs Fe, ce qui nous intéresse particulièrement, soit de saignements engendrés par une ouverture trop brutale de la BHE. Cependant, ce cas est maintenant rarement rencontré sur les rats sains grâce à l'optimisation de la méthode au sein de l'équipe. Il est donc très probable que ce signal proviennent bien de NPs qui se sont accumulés dans la zone où les vaisseaux sont devenus perméables suite aux interactions entre les ultrasons et les micro-bulles.

Dans le cas des rats porteurs de gliome F98, les NPs Fe se seraient donc accumulées par effet EPR dans la tumeur et dans la zone rendue perméable grâce au traitement. Toutefois il est difficile avec ces seules images IRM de déterminer qui, de la tumeur ou de la zone pour laquelle la BHE a été ouverte, parvient à concentrer le plus de nanoparticules. Il serait possible de répondre à cette question en analysant les coupes de cerveau grâce à une coloration au Bleu de Prusse par exemple, chose qui n'a pas pu être faite durant la thèse faute de temps. Il serait d'ailleurs intéressant de réaliser cette même coloration sur des coupes de cerveau de rat n'ayant pas reçu de NPs Fe mais pour lequel l'ouverture de la BHE a créé des lésions : ainsi, nous pourrons comparer le marquage au Bleu de Prusse lié au fer présent dans le sang dans les lésions au marquage lié au fer constituant les NPs.

Enfin, deux rats témoin porteurs de tumeur F98 ont été injectés avec 1 mL de **NPs Fe sans ouverture préalable de la BHE** : il sera intéressant par la suite de comparer la concentration de fer atteinte dans la tumeur sans ouverture de la BHE par effet EPR à celle obtenue en cumulant l'effet EPR et la perméabilisation de la BHE grâce aux ultrasons.

11.4.3 Ajout d'étapes au protocole expérimental pour résoudre le problème des "cas litigieux"

Dans le cas de l'ouverture de la BHE chez le rat porteur de gliome, les images sont parfois difficiles à interpréter, comme l'illustre l'exemple de la figure 11.9. La tumeur est bien visible mais l'ouverture de la BHE n'est pas clairement discernable. S'agit-il d'un tir superposé à la tumeur, ou d'une tumeur ayant une forme complexe ? Il est impossible avec ces seules images de faire la différence entre la tumeur et une ouverture potentielle de BHE. La seule façon de valider avec certitude l'ouverture de BHE repose en réalité sur l'observation de la trace du tir à côté de la tumeur, ou comme précédemment lorsque la zone perméabilisée caractéristique est bien marquée. Nous ne pouvons donc pas conclure à chaque fois sur l'échec ou le succès du tir.

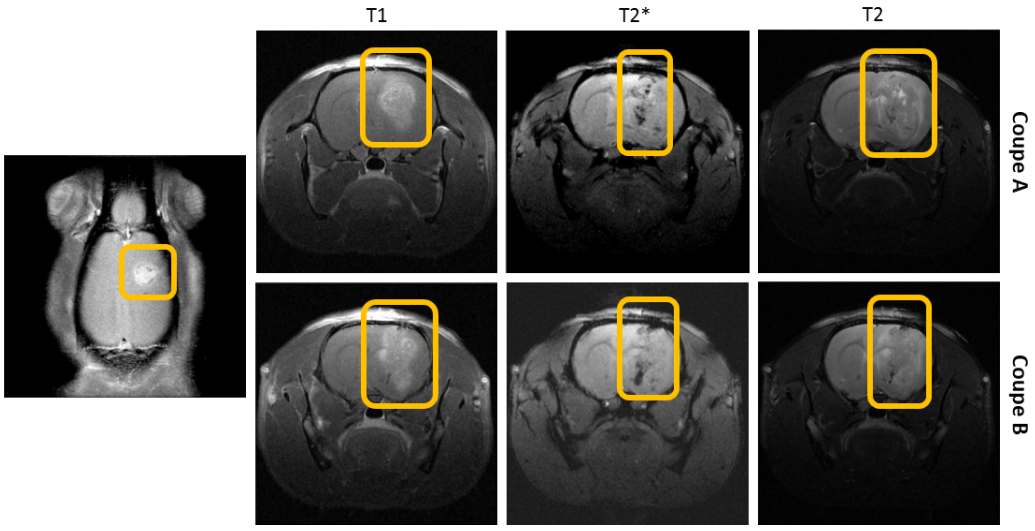


Figure 11.9 – *Observation d'un cerveau de rat porteur de tumeur F98 par IRM selon deux coupes (A et B) après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 200 µL de solution mère de NPs de fer (observation in vivo). 100 µL d'agent de contraste au Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE.*

Pour lever cette interrogation, il aurait été intéressant d'effectuer des images IRM de l'animal avant et après ouverture de la BHE afin de différencier la prise de contraste créée par la tumeur de celle due à l'ouverture de la BHE. De plus, il aurait été possible de discriminer la présence des NPs Fe des lésions créées par le traitement en imageant l'animal avant et après l'injection des NPs Fe une fois l'ouverture de la BHE effectuée. L'imagerie après l'ouverture de la BHE et avant l'injection des NPs Fe est toutefois incompatible avec nos expériences à ce stade de connaissance car l'ouverture de la BHE n'est pas irréversible. Celle-ci se referme et la cinétique de ce processus n'est pas encore bien caractérisée. Les NPs Fe ayant une taille assez conséquente, la BHE aurait peut-être été suffisamment refermée après l'image IRM pré-injection pour empêcher le passage des NPs Fe.

11.4.4 Influence de la sonication

En comparant les images pondérées T2* des deux rats HT 13 et HT 19 dans la figure 11.8, nous pouvons observer une différence dans les perturbations locales du champ (probablement dues à la présence de NPs Fe). La tête du rat HT 13 semble en effet "plus noire" que celle de HT 19,

comme si les NPs Fe étaient bien plus présentes chez HT 13. Pourtant, le volume de NPs Fe injecté est le même, et le timing des protocoles suivis est similaire pour les deux rats. Une différence peut toutefois être notée entre ces deux animaux : chacun d'entre eux a reçu les NPs Fe venant d'un flacon différent, et soniquées la veille à seulement une demie-heure d'intervalle. On peut donc se demander si cette différence réside dans le protocole de sonication des NPs Fe (position différente des tubes dans la cupule lors de la sonication par exemple). Si c'est le cas, une petite taille d'agrégats aurait peut être permis aux NPs de mieux circuler dans les vaisseaux et de rejoindre même les plus petits capillaires, et au contraire les NPs Fe les moins soniquées auraient très rapidement été filtrées. En observant les tumeurs de ces deux rats, on peut remarquer que les NPs Fe semblent s'être accumulées dans la tumeur pour le rat HT 13 et ne restent qu'en périphérie de la tumeur pour le rat HT 19. La taille des NPs Fe pourrait aussi expliquer ce phénomène. Malgré tout, l'architecture disparate de ces deux tumeurs pourrait aussi être la cause d'une telle observation.

Ce raisonnement reste fondée une simple observation pour laquelle il est difficile de donner une explication avec les seules images IRM, uniques éléments actuellement disponibles pour alimenter la réflexion. Celui-ci permet cependant de lancer une discussion sur l'impact de la taille des NPs dans ce type d'expérience et de notre probable mauvaise maîtrise de ces paramètres. Il serait nécessaire par la suite de travailler plus longuement sur la caractérisation des NPs et notre capacité à rendre les différents lots identiques et reproductibles.

11.4.5 Optimisation des paramètres du protocole

Lors des premiers essais d'ouverture de la BHE avec ce *set-up*, Vasile Stupar et son équipe ont noté des effets secondaires importants sur les rats suite à ce traitement. L'ouverture de la barrière s'accompagnait notamment régulièrement d'un œdème. L'optimisation du protocole et de l'installation a permis de régler plus finement les détails du processus et de diminuer les effets secondaires tout en perméabilisant la barrière de manière localisée. La présence d'œdèmes se fait plus rare. Toutefois, dans le but d'améliorer encore cette méthode, il est souhaitable de diminuer encore la puissance des ultrasons, de façon à protéger les tissus, tout en perméabilisant de façon réversible la barrière. Une meilleure connaissance de l'influence des différents paramètres permettra, dans un plus long terme, d'arriver à cette fin.

Dans ce but, une tentative de diminuer le voltage du générateur à ultrasons a été réalisée sur un des rats : fonctionnant habituellement à 120 mV, le voltage a alors été réduit à 20 mV. L'ouverture de la BHE avec ces paramètres n'a pas fonctionné. Cependant, ce test ayant été réalisé une unique fois, il est difficile de dire si c'est bien la diminution du voltage qui est en cause de l'échec de l'ouverture de la BHE, ou s'il s'agit seulement d'un des tirs pour lesquels l'expérience s'est révélée infructueuse.

11.4.6 Possibilité de transfert de cette méthode à l'accumulation d'un agent de contraste au Gd

Nous l'avons vu dans les chapitres précédents, si le fer est au coeur de cette thèse comme composé permettant d'augmenter la dose déposée dans la tumeur, il est aussi possible d'utiliser d'autres éléments. Le gadolinium est largement étudié par d'autres équipes à cette fin, notamment sous forme de nanoparticule (tests clinique pour les AguiX). Les agents de contraste au gadolinium pourraient aussi, grâce à leur petite taille, traverser la BHE et s'accumuler dans la tumeur plus facilement que les NPs Fe. En outre, le DEF théorique obtenu pour une même concentration de

composé est 1,45 fois plus grand avec le Gd qu'avec le fer à 80 keV [2]. C'est pourquoi nous avons aussi cherché à voir si l'ouverture de la BHE suivie de l'injection d'un volume plus important d'agent de contraste pouvait permettre d'accumuler des concentrations "intéressantes" (du point de vue thérapeutique) de Gd dans les zones perméabilisées.

Injection d'un agent de contraste au Gd chez le rat sain après ouverture de la BHE

1 mL d'agent de contraste au Gd (Dotarem) a été injecté à l'animal après ouverture de la BHE. Le rat a bien toléré l'injection des 1 mL de Dotarem et l'ouverture de la BHE a bien été confirmée grâce à l'imagerie IRM. La prise de contraste s'est révélée très intense, ce qui semblerait indiquer qu'une grande quantité de gadolinium a été accumulée dans la zone perméabilisée. La zone noire que l'on peut observer au centre semble à première vue indiquer qu'il n'y a pas de Gd. Ceci peut être du au phénomène de "sursignal" : le signal RMN n'évolue pas de façon linéaire avec la concentration. Dès que la concentration en Gd atteint un certain seuil, le signal se met à baisser alors que la concentration augmente encore.

Ouverture de la BHE chez le rat porteur de tumeur F98

1 mL de Dotarem a été injecté à des rats Fischer porteurs de tumeur F98 (16 jours après implantation) après ouverture de la BHE par ultrasons.

Les résultats obtenus sur les trois rats consacrés à cette expérience peuvent être synthétisés ainsi :

- l'ouverture de la BHE semble avoir fonctionné pour un tir, qui serait alors aligné avec la tumeur.
- pour les deux autres rats, il est difficile de déterminer si l'ouverture de la BHE a réussi ou s'il s'agit seulement d'une prise de contraste due à la présence de la tumeur.

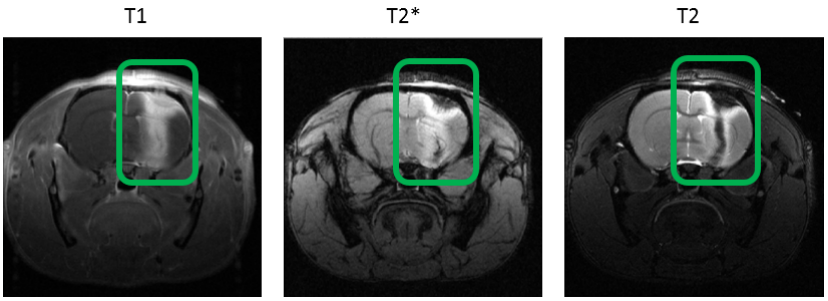


Figure 11.10 – *Observation d'un cerveau de rat porteur de tumeur F98 par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection d'1 mL d'agent de contraste au Gadolinium (Dotarem) -observation in vivo. La zone sombre visible en T2 provient probablement du phénomène de "sursignal".*

La figure 11.10 illustre le cas pour lequel l'ouverture de la BHE a bien fonctionné. On observe bien la masse tumorale ainsi que la zone cylindrique perméabilisée par l'interaction entre les microbulles et les ultrasons qui traverse le cerveau de haut en bas. Le tir ultra-son a cette fois bien été aligné avec la tumeur. En T2, la zone occupée par le Gd semble "opaque". Il s'agit probablement encore d'un cas de "sursignal". Ce fait est encourageant, et il sera important de comparer les valeurs de concentration de Gd atteintes dans cette zone à celles obtenues dans la tumeur par l'injection

2. 80 keV représente un bon compromis entre une énergie assez basse pour espérer observer un bénéfice thérapeutique (bien que déjà très haute pour le Fer) et une énergie assez haute pour que les photons puissent atteindre la tumeur

d'1 mL de Dotarem sans ouverture de la BHE préalable. Deux animaux témoins porteurs de gliome F98 ont ainsi été injectés et sacrifiés. Il serait possible d'analyser par exemple des ponctions des zones clef par ICP-MS afin de comparer les masses de Gd accumulé avec ou sans ouverture de la BHE.

Conclusion sur le transfert de cette méthode à l'accumulation des AC Gd dans la tumeur

Ces résultats sont encourageants : l'ouverture de la BHE pourrait permettre d'accumuler de grandes quantités d'agent de contraste dans la zone tumorale, augmentant ainsi le bénéfice thérapeutique de la radiothérapie combinée à la "photoactivation" du Gd. Cependant, il est aussi important de prendre en compte les possibles fuites de Gd hors de cette zone perméable. En effet, si la petite taille des molécules d'agent de contraste favorise leur accumulation, elle peut aussi rendre très éphémère cette concentration d'agent dans la tumeur. Il est nécessaire que la concentration en Gd soit importante dans l'optique d'une application thérapeutique, mais il faudrait auparavant aussi étudier la cinétique relative à cette accumulation. Est-ce que l'agent reste au sein de la tumeur suffisamment longtemps pour permettre un traitement ? est-ce que cette forte accumulation d'agent de contraste n'est au contraire valable que quelques minutes, avant que l'agent ne se diffuse à nouveau dans les tissus adjacents ? Il serait en effet surprenant que ces molécules s'accumulent dans la tumeur pour y rester longuement. La nature n'aimant pas les déséquilibres, il semblerait plus probable que l'agent ait tendance à diffuser ensuite pour rétablir une homogénéité relative dans le tissu cérébral. Les molécules de Dotarem étant de faible taille, leur vitesse de diffusion est accrue.

Des solutions peuvent être trouvées à cette problématique : par exemple, lors des essais cliniques de phase I sur la ligne ID-17 (traitement de métastases cérébrales par radiothérapie synchrotron couplée à l'accumulation d'agents de contraste iodés dans les tumeurs), le protocole d'injection consistait en un bolus de 40 mL d'Ioméron 400 (400 mg(I)/mL) injecté à 4 mL/s, puis une infusion plus lente de 60 à 210 mL d'Ioméron à 0.5 mL/s. Les irradiations SSRT ont été réalisées juste après l'infusion lente : la concentration d'iode intratumorale après la seconde injection reste en effet plutôt stable pendant 20 minutes avec une variation de $\pm$ 10% par rapport à la moyenne (1.94 $\pm$ 0.12 mg/mL) [Obei 14].

11.5 Conclusion et perspectives

Les expériences décrites dans ce chapitre visaient à fournir une première tentative d'ouverture de la BHE grâce aux interactions entre les ultrasons et les micro-bulles. Elles ont permis de prouver qu'il était possible d'ouvrir cette barrière, à la fois chez le rat sain et chez le rat porteur de gliome F98. De plus, les images IRM suggèrent que ces zones perméabilisées permettraient d'accumuler des NPs Fe ou des agents de contraste au Gd (Dotarem). Une analyse histologique des coupes permettra de confirmer cette observation et d'apporter de nouvelles informations à ce sujet.

Nous avions vu dans la section 3.1.3.1 qu'il était possible de rendre la BHE perméable grâce à des composés chimiques, notamment le Mannitol. L'intérêt de la méthode impliquant les micro-bulles et les ultrasons réside dans le ciblage de l'ouverture de la barrière : plutôt que de rendre perméables toutes les zones autour des vaisseaux sanguins du cerveau, ce protocole permet de n'ouvrir la BHE que de manière localisée. Ainsi, certains effets secondaires observés avec le Mannitol seraient potentiellement plus limités (passage de composés toxiques dans le cerveau, migration plus aisée des cellules métastatiques, ...). De plus, en étudiant les différents paramètres du protocole, il pourrait

être possible de maîtriser l'ouverture de la BHE avec la méthode des ultrasons (*e.g.* perméabilisation faible ou forte, durée de cette perméabilisation).

Par la suite, si ces expériences se poursuivent dans le but d'une étude plus approfondie de la méthode, **il serait intéressant d'étudier les cinétiques suivantes** :

- d'une part, la cinétique relative à l'ouverture de la BHE : combien de temps reste-t-elle ouverte ? Quelle taille d'objet laisse-elle passer et pendant combien de temps ? Park *et al.* montrent qu'avec leurs paramètres de sonication, la BHE se referme de manière exponentielle en fonction du temps, avec un temps caractéristique de 2.22 h [Park 12].
- d'autre part, la cinétique relative à l'injection de NPs (ou d'agent de contraste) suite à l'ouverture de la BHE. A quel moment après l'envoi de la salve d'ultrasons faut-il injecter les NPs ? Combien de temps faut-il attendre pour atteindre le pic maximal de distribution des NPs dans la tumeur ? En combien de temps la zone perméabilisé se "vide"-t-elle des NPs ? Sera-t-il nécessaire, dans la logique d'un traitement fractionné, de renouveler l'injection de NPs couplée à l'ouverture de la BHE, ou les NPs restent-elles suffisamment longtemps dans tumeur pour éviter de répéter le traitement ? Il est toutefois notable que cette ouverture de la BHE semble rester moins lourde pour le patient qu'une injection intra-tumorale de NPs.

Ces résultats ne suffisent évidemment pas à conclure quoi que ce soit sur l'utilisation de cette méthode, mais ils se sont révélés très encourageants. L'analyse du reste des données disponibles (histologie des cerveaux de rat et ICP-MS) devrait apporter des résultats complémentaires à cette étude. En outre, le protocole d'ouverture de la BHE permettra par la suite, grâce à son optimisation par l'équipe du GIN, de minimiser les effets secondaires et de gagner en fiabilité. Cela permettra de renouveler ces essais et d'approfondir leur étude.

11.6 Le Chapitre 11 en quelques mots

Le problème de la répartition des NPs Fe dans la tumeur est une question centrale dans la mise au point de la radiothérapie renforcée par la présence d'éléments à haut Z dans la tumeur. La première méthode étudiée dans cette thèse, utilisant des cellules immunitaires comme Chevaux de Troie, ne semble pas pouvoir apporter de solution dans les conditions expérimentales testées (voir chapitre précédent). La méthode présentée dans ce chapitre a pour objectif de perméabiliser localement la BHE au niveau de la tumeur par un processus mécanique : des micro-bulles, excitées par une salve d'ultrasons, "écartent" les cellules tapissant les parois des vaisseaux sanguins. Ces premières expériences eurent lieu dans le cadre d'une collaboration avec une équipe du GIN (Vasile Stupar, Nora Collomb, Emmanuel Barbier) et de l'Université d'Orléans (Anthony Delalande).

- Une première partie des expériences a eu lieu chez le rat sain : l'ouverture de la BHE a été réalisée, suivie ou non d'une injection de NPs Fe ou d'1 mL de Gd AC. Ces expériences montrent que l'ouverture de la BHE permet bien la perméabilisation d'une zone dans le cerveau de l'animal, dans laquelle les composés injectés semblent s'accumuler.
- Une seconde partie des expériences a eu lieu chez le rat porteur de tumeur. L'ouverture de la BHE a été réalisée, suivie d'une injection de NPs Fe ou d'1 mL de Gd AC. Il est parfois difficile de distinguer le tir de la tumeur, et dans de nombreux cas, le tir n'est pas superposé à la tumeur. Cependant, ces expériences montrent qu'à la fois la tumeur et la zone perméabilisée semblent accumuler les composés, bien que les données produites ne permettent pas de dire quelle est la zone en accumulant le plus.

Il reste encore un travail d'analyse des coupes de cerveau en histologie et/ou par ICP-MS qui pourrait apporter des informations complémentaires aux images IRM. Cependant, ces premières expériences sont encourageantes pour la suite. Elles permettent aussi de soulever de nombreuses questions : il serait notamment intéressant d'étudier la dynamique de l'ouverture et de la fermeture de la BHE engendrée par cette technique. D'autre part, les expériences ont montré qu'il était complexe de "viser" la tumeur avec précision, mais des développements sont en cours pour réaliser le tir pendant l'imagerie (installation d'un *set-up* compatible avec l'IRM).

Quatrième partie

Bilan général, conclusion et perspectives

Discussion générale

Ces travaux de thèse portant sur la radiothérapie synchrotron se sont centrés sur l'utilisation de NPs de fer comme composé permettant de renforcer le dépôt de dose. La problématique était double. D'une part, ces travaux avaient pour objectif de confirmer le potentiel des NPs Fe pour augmenter la dose au sein des tissus tumoraux. D'autre part, ces travaux avaient pour ambition d'étudier un moyen novateur de distribution des NPs dans les gliomes : la vectorisation par des cellules immunitaires, les monocytes-macrophages, attirés par les zones inflammées.

Cette discussion générale a pour vocation de dresser un bilan de ces travaux en liant entre eux les différents chapitres dans lesquels les résultats ont déjà été discutés. Elle sera suivie par une conclusion synthétique ouvrant sur plusieurs perspectives.

Les NPs comme outil pour renforcer le dépôt de dose en SSRT

Le fer n'était *a priori* pas l'élément le plus prometteur pour augmenter la dose déposée dans les tissus tumoraux. De "faible" numéro atomique (Z_{Fe}=26) en comparaison aux autres éléments habituellement étudiés dans ce contexte (Z_{Au}=79, Z_{Gd}=64 , Z_{Ag}=47), le fer est moins propice à absorber les photons pour une même concentration dans les tissus aux énergies considérées (de 30 à 80 keV). Cette section revient sur ce choix et tente d'apporter quelques éléments de réponse sur l'intérêt et les inconvénients d'utiliser des NPs Fe pour cette méthode thérapeutique.

Intérêts des NPs Fe pour la photoactivation

L'un des premiers intérêts d'utiliser les NPs Fe de l'équipe coréenne réside dans leur **capacité à s'accumuler de façon remarquable dans les cellules**. La masse de fer totale internalisée par les cellules exposées aux NPs Fe coréennes est telle qu'à ces concentrations, l'effet théorique attendu avec le fer devient supérieur à celui attendu avec l'iode ou le gadolinium pris à des concentrations représentatives de qu'il est possible d'obtenir *in vivo* (entre 30 et 50 keV, le DEF obtenu avec le fer concentré à 100 mg/mL est supérieur à 3, contre 1.38 pour 5 mg(Gd)/mL et 1.32 pour 2 mg(I)/mL). D'autre part, lorsqu'elles sont internalisées, les NPs Fe sont proches des zones vitales de la cellule (ADN ou mitochondries par exemple). Les électrons secondaires seront donc susceptibles de générer davantage de dommages létaux pour les cellules.

Si, à une même concentration de composé dans les tissus, le fer n'est pas un candidat avantageux, sa propension à s'accumuler dans les cellules tumorales représente un argument en faveur de son utilisation. La taille et le *coating* des NPs jouent aussi un rôle dans l'internalisation de ces NPs : l'accumulation de ces NPs Fe dans les cellules n'est probablement pas uniquement due au fait que les NPs contiennent du fer.

L'accumulation des NPs Fe est aussi vérifiée dans les monocytes/macrophages de lignée. Cette observation nous conforte donc pour l'application de la méthode "Cheval de Troie". Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier le potentiel des cellules saines à internaliser ces NPs (par exemple, des astrocytes sains). Si les cellules tumorales internalisent préférentiellement les NPs Fe par rapport aux cellules saines, cela permettrait au traitement de gagner en spécificité, atteignant seulement les cellules tumorales.

De plus, le "faible" numéro atomique du fer peut constituer un avantage si l'on considère les **probabilités de relaxation non-radiatives** (voir Fig. 11.11) : alors que les atomes lourds subissent à plus de 80% une relaxation radiative (émission d'un photon de fluorescence), les atomes de fer se relaxent dans environ 65% des cas *via* l'émission d'électrons de relaxation (Auger, Cöster-Krönig, super Cöster-Krönig).

Les recherches actuelles ne permettent pas de statuer sur qui, des photoélectrons ou des électrons Auger, est responsable en majorité des dommages aux cellules. Les simulations de McMahon *et al.* semblent prouver que la contribution des électrons Auger est dominante tandis que celles de Douglass *et al.* montrent que cette contribution est insignifiante. Ces deux équipes ont pourtant utilisé le même code de simulation Geant4 [Reti 15]. Dans tous les cas, la relaxation préférentielle des atomes de fer *via* l'émission d'électrons reste un atout par rapport à une relaxation radiative. Il faut toutefois mettre en perspective ces statistiques : si les atomes lourds ne subissent que très peu de relaxations non radiatives, ils absorbent toutefois plus de photons par effet photoélectrique que le fer et émettent donc plus de photoélectrons pour une même concentration.

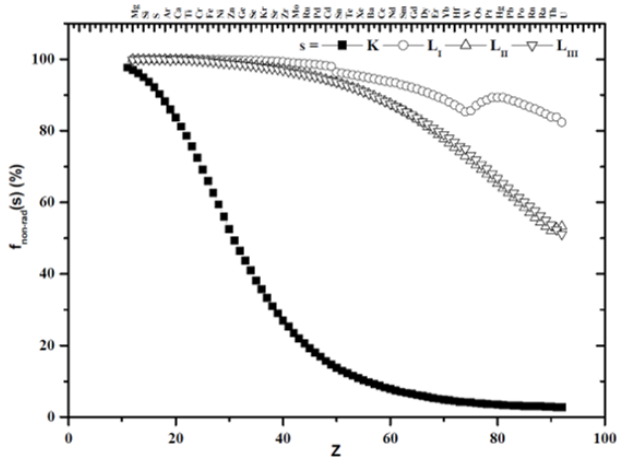


Figure 11.11 – *Probabilité de relaxation non radiative selon le numéro atomique de l'élément considéré. D'après les calculs de Krause et al. [Krau 79].*

Les simulations réalisées pendant ces travaux suggèrent que les électrons de relaxation déposent principalement leur énergie entre 300 et 700 nm autour de la NP. Aux hautes énergies d'irradiation, les électrons Compton ajoutent aussi une dose supplémentaire à cette échelle. Selon l'énergie d'irradiation, les photoélectrons déposeront leur énergie à des endroits différents. A des énergies d'irradiation proches du K-edge, les photoélectrons K de l'oxygène (et du fer, le cas échéant) ainsi que les photoélectrons L du fer ne déposent leur énergie que localement autour de la NP. Aux énergies d'irradiation plus élevées (30 à 80 keV), les photoélectrons ont un libre parcours moyen plus élevé et déposeraient donc leur énergie à plusieurs dizaines de µm de la NP. Enfin, les photons de fluorescence pourraient aussi contribuer à l'augmentation du dépôt de doses à des échelles allant

de la centaine de µm à quelques mm (voir Fig. 11.12).

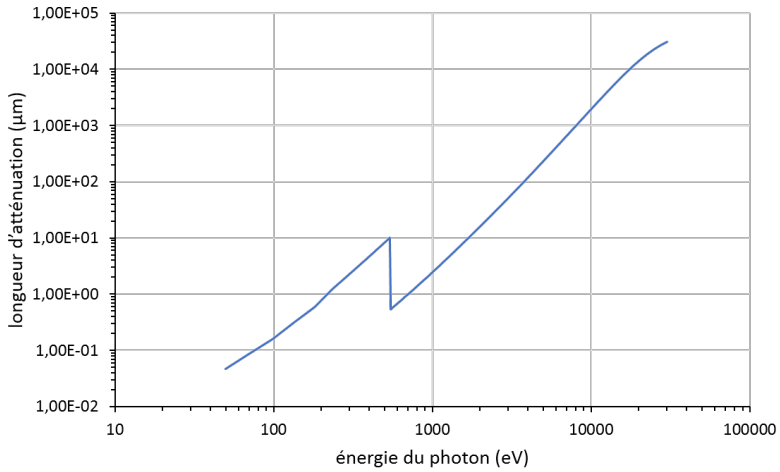


Figure 11.12 – *Longueur d'atténuation des photons X dans l'eau en fonction de leur énergie (longueur pour laquelle l'intensité du faisceau est atténuée de 1/e de sa valeur à la surface). D'après http ://henke.lbl.gov/optical_constants/.*

Les NPs Fe de l'équipe collaboratrice coréenne possèdent d'autres intérêts du fait de leur **composition (Fe_3O_4)** : elles sont indirectement détectables par IRM. Leurs propriétés magnétiques peuvent aussi s'appliquer à d'autres stratégies thérapeutiques (couplage à un champ électromagnétique pour générer de la chaleur dans la tumeur, guidage par gradients IRM [Muth 15], ...).

Limites de la méthode et questionnement

Energie optimale d'irradiation

Les simulations réalisées pendant ces travaux ont permis de définir la **valeur optimale de l'énergie d'irradiation** pour laquelle l'effet d'augmentation de dose est maximal pour une concentration donnée. Cette énergie se situe entre 30 et 45 keV. Les résultats obtenus *in vitro* ont confirmé la valeur de cet optimum de l'énergie d'irradiation. Les meilleurs résultats que nous ayons obtenu pendant ces travaux en exposant des F98 aux NPs Fe préalablement à l'irradiation (concentration dans le milieu de culture : 0.06 mg(Fe)/mL) montrent l'existence d'un effet significatif à 30 keV (SER : 1.76 ± 0.30, p<0.0001, ANOVA à deux facteurs) et à 51 keV (SER : 1.42 ± 0.44, p=0.0048, ANOVA à deux facteurs). Cet effet est moindre à 80 keV (SER : 1.14 ± 0.11, non significatif, ANOVA à deux facteurs, p=0.9494). L'étude préclinique réalisée à la fin de ces travaux de thèse, présentée dans le chapitre 8, montre un effet tout juste significatif de l'injection préalable des NPs Fe par voie intraveineuse sur la survie d'animaux porteurs de gliomes irradiés à 35 keV en comparaison à la survie des animaux ayant reçu uniquement la radiothérapie (%ILS=73 % et 59%, respectivement (*Log-rank* test, p= 0.07). Les animaux ayant reçu les injections CED couplées à la radiothérapie n'ont pas vu leur survie significativement augmentée par rapport à la survie des animaux irradiés seulement (%ILS=64 % et 59%, respectivement (*Log-rank* test, p=0.24). Une étude similaire a été conduite avec une irradiation des animaux à 100 keV. La radiothérapie couplée à l'injection préalable des NPs Fe par CED n'a pas permis d'augmenter significativement la survie des animaux par rapport à la radiothérapie seule (données non montrées).

L'essai clinique conduit à l'ESRF porte sur l'optimisation de la radiothérapie des métastases cérébrales par accumulation d'agent de contraste iodé dans la tumeur. Le protocole de traitement consiste en une injection d'iode par voie intraveineuse couplée à une irradiation de la tumeur à 80 keV. Cette énergie d'irradiation permet en effet d'obtenir un bon compromis entre l'efficacité des interactions photoélectriques sur les atomes d'iode et une pénétration suffisante du rayonnement pour atteindre une tumeur cérébrale. En revanche, il n'est pas envisageable de traiter une tumeur cérébrale avec un rayonnement de 30 keV. En effet, les photons seraient rapidement absorbés par l'os et les tissus et n'atteindraient pas la tumeur. Selon les données du NIST, un faisceau de 30 keV a une longueur d'atténuation de 2.6 cm dans l'eau, ce qui est insuffisant pour espérer traiter un gliome. L'utilisation d'une méthode type Intrabeam semble lourde et complexe à mettre en œuvre, surtout dans le cadre d'une radiothérapie effectuée au synchrotron.

Une autre solution parfois discutée dans les publications [Reti 15] serait de trouver un phénomène physique permettant de générer des photons de plus basse énergie à partir d'un faisceau de photons d'énergie supérieure à 80 keV. La diffusion Compton, par exemple, pourrait ici nous être bénéfique : les photons Compton diffusés par l'eau pour une irradiation de 1.25 MeV ont, en majorité, une énergie comprise entre 20 keV et 1.25 MeV environ. La composante de photons de plus basse énergie pourrait nous être favorable. Cependant, les photons de 1.25 MeV interagissent peu avec les tissus et seulement une petite fraction des photons diffusés sera susceptible d'interagir avec les NPs Fe. De plus, sur les photons diffusés d'énergie autour de 30 keV, peu interagiront en pratique avec les NPs Fe. Il semble donc très peu probable que ce seul phénomène physique permette d'augmenter la dose dans la tumeur.

Une alternative pourrait être l'utilisation couplée des NPs avec des sources de brachythérapie [Cho 09]. Cho *et al.* ont réalisé une étude par simulations Monte-Carlo en 2009 montrant que l'augmentation de dose par accumulation de NPs d'or dans la tumeur pouvait théoriquement être réalisée avec des sources utilisées en brachythérapie comme l'iode 125 (émetteur γ, raie principale : 35.5 keV, et X, raie principale : 27.4 keV). Ils montrent qu'une augmentation de dose macroscopique significative est atteinte dans la tumeur (*e.g.* >40%) grâce au couplage des deux stratégies thérapeutiques. Des augmentations de dose de 116% et 68% sont obtenues pour des concentrations respectives d'or dans la tumeur de 7 mg/g et 18 mg/g. L'auteur juge ces concentrations intratumorales réalistes par rapport à ce qu'il est possible d'obtenir *in vivo* et précise que les sources de radiation considérées dans cette étude sont disponibles. Ces simulations ont été transférées à une première étude *in vitro* par Ngwa *et al.* en 2013. Ils montrent que l'incubation préalable des cellules HeLa avec des NPs d'or (concentration : 0.2 mg/mL) permet d'augmenter les effets de l'irradiation avec une source d'iode 125 de 70 % à 130 % [Ngwa 13]. L'énergie des raies principales d'émission de l'iode 125 suggère que cette source serait adaptée à l'utilisation combinée avec des NPs Fe, d'après les simulations et les études *in vitro* réalisées dans ces travaux de thèse.

Enfin, une dernière solution consisterait à changer de cible pour le traitement : en effet, s'il semble complexe d'exploiter l'augmentation de dose provoquée par le fer pour le traitement du gliome, il serait plus aisé de l'appliquer au traitement de tumeurs superficielles ou peu profondes. Ces tumeurs seraient plus accessibles, vascularisés et la BHE ne serait plus un obstacle. L'injection du fer pourrait être réalisée par voie systémique ou locale sans opération trop invasive pour le patient dans les deux cas.

Conséquences biologiques de l'internalisation des NPs Fe

Nos études *in vitro* ont montré que l'internalisation des NPs Fe de l'équipe coréenne engendrait un **blocage en phase S des cellules** et une induction de l'apoptose. Dans le contexte de nos recherches, le blocage en phase S est un inconvénient car cette phase est la phase la plus radiorésistante du cycle cellulaire. L'exposition des cellules aux NPs Fe sans irradiation peut donc avoir des répercussions sur la survie des cellules après irradiation autres que l'augmentation de dose provoquée par l'accumulation du fer. Cet aspect a été abordé dans ces travaux de thèse mais il serait intéressant de le poursuivre. Une analyse immuno-histologique (Annexin, Apoptag, Ki-67) de lames de cellules traitées aux NPs Fe et/ou irradiées permettra d'apporter quelques informations supplémentaires sur les conséquences biologiques de ces traitements (arrêt du cycle, apoptose, prolifération, nécrose...). Les résultats de l'étude *in vitro* suggèrent d'ailleurs que cette toxicité serait provoquée par la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les sondes DCFH-DE permettraient de mesurer la production de ces ROS, avec et sans irradiation. Une analyse H2AX ou 53BP1 en complément permettrait de quantifier les dommages à l'ADN selon les conditions d'exposition aux NPs, et aiderait ainsi à déterminer les mécanismes en cause de la toxicité et leurs conséquences.

D'autre part, il est probable que la production de ROS soit déclenchée par la dégradation des NPs Fe dans les lyososomes. Il est aussi possible que l'irradiation détruise en partie le *coating* des NPs Fe, laissant une surface hautement réactive disponible pour catalyser la réaction Haber-Weiss [Klei 12a]. Une étude de l'état du fer présent dans les cellules (nature des ions, nanoparticules) permettrait d'apporter quelques éléments de réponses (exemple : expériences sur FAME, ESRF, Grenoble).

Stabilité de la solution de NPs Fe

Enfin, le point le plus limitant rencontré lors de ces travaux de thèse réside dans l'instabilité de la solution de NPs. Les expériences ont montré que les NPs Fe tendaient à s'agglomérer de telle sorte que, malgré les efforts déployés dans ce sens, les caractéristiques des NPs Fe utilisées lors des expériences *in vitro* et *in vivo* étaient variables. Les résultats des expériences ne sont donc pas reproductibles : les cellules internalisent plus ou moins de NPs selon la taille des amas et ce, en dépit de la concentration d'exposition. Cette problématique n'est pas spécifique à ces NPs Fe : elle est retrouvée dans de nombreuses autres études au sujet de NPs diverses.

La taille des agglomérats pourrait être un obstacle à la fois pour la CED et pour l'injection intraveineuse : les amas sont probablement trop importants pour passer la BHE et s'accumuler efficacement dans la tumeur. En CED, une taille importante des NPs pourrait freiner la diffusion des NPs dans les tissus tumoraux en périphérie des zones atteintes par l'injection. Les études de Tong *et al.* soulignent l'intérêt des NPs Fe d'un diamètre inférieur à 50 nm : cette taille permettrait une meilleure pénétration dans les tissus, une meilleure rétention dans la tumeur, une plus longue demie-vie dans le sang et une surface d'échange plus élevée en proportion [Tong 16].

D'autre part, une taille trop importante des NPs Fe pourrait desservir l'augmentation de dose, comme nous avons pu le discuter dans le chapitre 7. A l'origine, les NPs ont été étudiées pour dépasser la limite des agents de contraste. Ces composés, très petits, ont une propension bien moins grande de s'accumuler dans les cellules. Or, une concentration intracellulaire trop faible limite théoriquement l'augmentation de dose que l'on peut espérer obtenir. C'est pourquoi les NPs se sont révélées intéressantes. Celles-ci ont en effet la caractéristique de s'accumuler en grande quantité dans les cellules. La concentration intracellulaire qui en résulte permet théoriquement d'obtenir un

effet thérapeutique significatif. Cependant, comme l'illustre la figure 11.13, un électron Auger émis au centre d'une NP d'oxyde de fer de 300 nm de diamètre aura peu de probabilité de sortir de la NP. Au contraire, le nombre de photoélectrons sortants ne semble pas dépendre de la taille de la NP, bien que leur spectre énergétique en soit affecté. Ces résultats étant obtenus par l'irradiation d'une NP avec une source ponctuelle la traversant en son centre, l'influence de la taille de la NP est maximale car les atomes externes de la NP ne sont pas irradiés. Il serait intéressant de poursuivre cette étude en irradiant toute la NP.

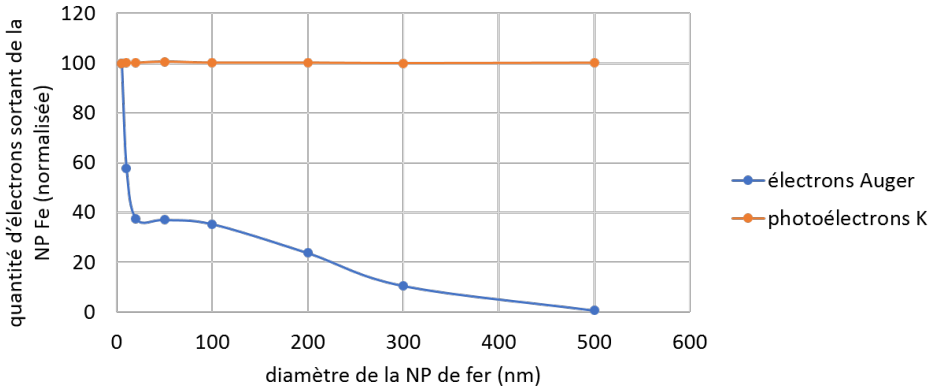


Figure 11.13 – *Quantité (normalisée par rapport à une NP de 5 nm) d'électrons Auger et de photoélectrons issus de la couche K sortant d'une NP Fe selon le rayon de cette NP.* ***La NP a été irradiée par une source ponctuelle en son centre : cette courbe n'est donc pas indicative des conséquences de l'irradiation d'une NP entière.***

La caractérisation des NPs Fe réalisée pendant cette thèse indique la nécessité d'optimiser la stabilité et le mode de conservation de ces NPs de manière à obtenir une solution plus reproductible. De plus, la mise au point d'une méthode de caractérisation systématique permettrait de contrôler la solution avant injection afin de s'assurer que les NPs possèdent bien les paramètres requis. Il serait peut-être possible de remédier à l'agglomération des NPs en solution pendant leur conservation en travaillant avec des flacons de NPs lyophilisées, qui ne seraient reconstituées que quelques minutes avant l'expérience.

Transport des NPs Fe jusqu'à la tumeur

Discussion suite à ces travaux

Dans le cadre du traitement du glioblastome, la distribution des NPs est un point critique. On peut disposer de la molécule ou des nanoparticules les plus efficaces, le traitement sera un échec si le composé ne recouvre pas la globalité de la tumeur, voire si elles n'atteignent pas toutes les cellules tumorales. Il a été montré dans le cas du modèle F98 que la présence de seulement cent cellules tumorales conduit au décès de l'animal [Bart 09]. Le succès de la thérapie dépend donc grandement de ce paramètre. Un recouvrement imparfait de la tumeur est synonyme d'une efficacité limitée, comme le suggèrent les travaux de thèse précédents ainsi que l'essai préclinique présenté dans le chapitre 8 (absence d'effet significative pour la stratégie CED+X). Différents protocoles ont été abordés au cours de ces travaux de thèse pour tenter d'atteindre la tumeur de façon plus efficace. Ils sont ici récapitulés et brièvement discutés.

Injection des NPs par voie intraveineuse

Lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse, les NPs Fe s'accumulent dans la tumeur de façon passive (effet EPR). Il serait intéressant d'étudier la cinétique de la biodistribution des NPs suite à une injection par voie veineuse, de façon à déterminer à quel moment la distribution du fer dans la tumeur atteint son optimum par rapport aux tissus sains environnants. La distribution des NPs dans d'autres organes (*e.g.* reins, foie) pourrait être observée, donnant des indications sur les voies d'excrétion. De plus, la mesure de la demie-vie de ces NPs dans le sang renseignera sur la possibilité de distribution des NPs Fe dans les gliomes : une longue demie-vie favorise l'accumulation passive des NPs Fe dans la tumeur, ajoutant peu à peu de nouvelles NPs au cours de leur circulation dans les vaisseaux sanguins.

L'équipe coréenne avec laquelle nous collaborons atteste dans ses travaux que le ratio d'accumulation des NPs dans les gliomes (modèle C6) par rapport aux tissus sains atteint son maximum après 24h après l'injection [Seo 13]. Ils attribuent cette observation à la migration des cellules immunitaires qui internaliseraient le fer présent dans les vaisseaux sanguins et le transporteraient au fur et à mesure jusque dans la tumeur.

CED

La CED a été utilisée dans l'expérience préclinique présentée dans le chapitre 8. Même si les NPs Fe sont directement injectées dans la tumeur, la distribution peut évoluer dans le temps et une étude cinétique permettrait de connaître le moment optimal après injection des NPs Fe pour irradier. En effet, il est possible que ces NPs diffusent peu à peu dans les tissus autour de leur point injection. Bien que cela soit peu plausible au vu de leur taille, il reste aussi possible que les NPs soient évacuées de la tumeur et retournent dans la circulation sanguine. Si c'est le cas, l'irradiation devra probablement se faire peu de temps après l'injection. Les NPs peuvent aussi diffuser ou être internalisées par des cellules immunitaires puis transportées dans les tissus tumoraux. Le recouvrement maximal de la tumeur pourra donc éventuellement être atteint un ou plusieurs jours après injection.

Le choix de la technique d'injection et son optimisation est un large domaine d'études. La CED et les injections par voie veineuse ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients. La CED est un moyen efficace pour contourner la barrière hémato-encéphalique et permet d'atteindre des concentrations élevées de composés dans la tumeur. Cependant, la distribution est limitée à l'endroit de l'injection et la méthode est invasive. L'injection par voie veineuse est quant à elle grandement limitée par la BHE, mais cible naturellement la tumeur en s'accumulant dans le lit tumoral là où la barrière est lésée. Les travaux de Smilowitz *et al.* illustrent ce compromis en rapportant dans leurs travaux que l'injection intraveineuse de NPs d'or (AuroVist 15 nm, 200 mg Au/mL ; Nanoprobes, Inc, Yaphank, NY, USA) recouvre plus efficacement le volume d'un gliome F98 que l'injection par CED [Smil 18]. Dans cette étude, si l'injection par CED permit d'accumuler les NPs d'or dans la masse tumorale principale, seule l'injection intraveineuse permit d'atteindre à la fois la masse principale, les cellules infiltrées et l'oedème tumoral.

Méthode "Cheval de Troie"

La méthode du "Cheval de Troie" repose sur l'utilisation de cellules immunitaires comme "transporteurs" des NPs : ces cellules immunitaires, attirées par la zone tumorale, ont en plus la capacité de s'infiltrer à travers la BHE. L'expérimentation de cette méthode au cours de ces travaux de thèse n'a pas permis d'obtenir une infiltration suffisante des monocytes/macrophages dans la tumeur lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse. Le nombre de cellules ayant migré dans le modèle de gliome n'aurait pas permis d'obtenir un bénéfice thérapeutique dû au fer lors de la ra-

diothérapie. D'autre part, l'injection intratumorale de monocytes/macrophages chargés en NPs Fe a été étudiée comme alternative possible. La distribution en fer dans la tumeur qui en résulte ne recouvre pas la totalité de la zone tumorale. Cette distribution n'a toutefois pas été comparée avec l'injection par CED de NPs seules.

Les paramètres expérimentaux utilisés ont été choisis en comparaison avec les protocoles de la littérature. Une optimisation du protocole *via* des études de cinétique permettrait peut-être d'obtenir des résultats plus encourageants. En effet, d'autres équipes sont parvenus à faire fonctionner cette méthode avec succès [Vala 07, Kioi 10, Mads 15]. D'autre part, une stratégie identique est menée en phase d'essais cliniques avec l'utilisation de cellules souches neurales pour acheminer des virus oncolytiques dans les gliomes (NCT 03072134).

Ultrasons focalisés

La méthode d'ouverture locale de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons a prouvé son potentiel lors d'études préliminaires : l'injection de NPs Fe juste après l'ouverture de la BHE chez le rat Fischer semble induire une accumulation de fer dans la zone perméabilisée (les NPs Fe_3O_4 sont alors détectées de manière indirecte dans les images T2* en IRM). Les travaux présentés dans cette thèse constituent une étude pilote. Les développements techniques engagés par l'équipe du GIN pour améliorer le ciblage de la zone tumorale sous imagerie RMN sont très prometteurs et il serait intéressant de poursuivre ces travaux.

La pression interstitielle : un autre obstacle

En pratique, qu'elles contournent ou non la barrière hémato-encéphalique, toutes ces méthodes se confrontent à un même problème : la **pression interstitielle** au sein de la tumeur. En effet, les tissus tumoraux sont des tissus denses, comprimés par la croissance de la tumeur. Cette "densité" est incompatible avec une distribution optimale des NPs dans la tumeur. Si elles sont injectées par voie intraveineuse, les NPs n'ont en effet aucune raison de se diffuser dans un tissu adjacent bien plus dense. Si elles sont injectées par voie intratumorale, la pression interstitielle freinera la diffusion des NPs dans les tissus tumoraux, empêchant ainsi un recouvrement de la tumeur. Il serait donc intéressant de développer une méthode permettant de réduire cette pression interstitielle, de façon à faciliter la diffusion des NPs dans la tumeur.

Accumulation de fer dans la tumeur : avantage ou inconvénient ?

L'accumulation de fer dans la tumeur sur le plus long terme est-elle un avantage ou un inconvénient ? Si les NPs de fer restent dans la tumeur, cela peut être un avantage du point de vue du traitement radiothérapeutique fractionné : il ne serait peut-être pas nécessaire de ré-injecter les NPs pour chaque fraction de dose délivrée. De plus, les études de Zanganeh *et al.* montrent que l'injection intraveineuse de NPs Fe (Ferumoxytol) permet d'inhiber significativement la croissance tumorale de tumeurs sous-cutanées chez la souris. Des études histopathologiques et *in vitro* supplémentaires leur ont permis de montrer que le Ferumoxytol induisait une polarisation M1 des macrophages (polarisation pro-inflammatoire) [Zang 16]. D'autre part, Ahamed *et al.* montrent les capacités de NPs Fe_3O_4 (23 nm de diamètre) à induire l'apoptose sélectivement dans les cellules cancéreuses (A549 et HepG2) tandis qu'elles n'ont aucun effet toxique sur les cellules saines (IMR-90 et hépatocytes de rats) [Aham 13]. Ces éléments sont plutôt favorables à l'utilisation des NPs Fe pour le traitement des tumeurs.

Cependant, la présence de fer dans une tumeur peut aussi avoir un effet délétère : Torti *et al.* montrent que le récepteur TFR1 est très exprimé dans les cellules cancéreuses, dont les cellules de gliomes [Tort 13]. L'apport de fer dans la tumeur pourrait initier puis encourager le développement de celle-ci : les recherches récentes présentées dans leur article de revue montrent que le métabolisme

du fer pourrait être un aspect central de la survie d'une tumeur. De plus, la présence de NPs Fe (magnétite) dans le cerveau peut participer au déclenchement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [Haut 03, Mahe 16]. Maher *et al.* suggèrent que les NPs de magnétite (< 200 nm) issues de la pollution atmosphérique peuvent pénétrer dans le cerveau après avoir été respirées et ainsi nuire à la santé. La toxicité des NPs d'oxyde de fer *in vivo* reste à étudier avant un passage en clinique si des résultats précliniques encourageants sont obtenus.

Les NPs étant un outil développé assez récemment, nous n'avons pour le moment pas assez de recul pour déterminer les conséquences de l'exposition d'un être vivant à ces composés. Il est possible que les NPs causent une toxicité et des effets secondaires plus ou moins délétères, mais les médicaments chimiothérapeutiques sont aussi toxiques : il faudra par la suite déterminer quel est le gain apporté par la présence de NPs Fe dans la tumeur lors de l'irradiation par rapport aux risques que cela engendre pour le patient.

Vers une optimisation des NPs

L'évolution de la taille des NPs Fe au cours du temps représente un frein considérable pour la reproductibilité et la compréhension des résultats expérimentaux. D'autre part, l'utilisation de ces NPs Fe semble causer une toxicité cellulaire. Ces deux limites peuvent être résolues par l'optimisation de ces NPs par des chimistes spécialisés.

Tout d'abord, le choix et l'optimisation du *coating* représentent un point clef pour l'application des NPs Fe en biologie : les NPs Fe utilisées en clinique sont *coatées* de manière à améliorer leur biocompatibilité et leur distribution dans les tissus. Différents *coatings* existent, comme le silicone, le dextran, le citrate et le PEG. Le *coating* peut aussi participer à une meilleure diffusion des NPs dans les tissus tumoraux ainsi qu'aider au franchissement de la BHE. Enfin, la présence d'un *coating* limite l'agrégation des NPs et diminue la toxicité induite par leur internalisation dans les cellules.

De plus, il est possible de fonctionnaliser la surface des NPs. Cette fonctionnalisation augmente la spécificité des NPs Fe, permettant ainsi une distribution préférentielle dans certains organes du corps et ciblant les cellules tumorales. Les NPs peuvent être conçues pour se lier à des molécules comme les anticorps, les peptides ou les hormones. L'optimisation "chimique" de ces NPs Fe pourra probablement constituer un point d'intérêt pour faire évoluer les recherches à ce sujet.

Il y a en fait très peu de NPs sur le marché, conséquence probable des difficultés de créer une production à grande échelle avec la caractérisation adaptée et les grands coûts de ces processus. Coulter *et al.* soulignent d'ailleurs la différence entre la quantité de données précliniques affirmant que les NPs à grand Z sont des composés efficaces pour favoriser l'augmentation de dose, contre le faible nombre d'études cliniques les concernant [Coul 13]. A ce jour, seulement deux essais cliniques concernent l'application de NPs à l'augmentation de dose et à la radiosensibilisation des tumeurs : des NPs de Gd sont utilisées dans le cadre de métastases cérébales (AGuiX, NCT03308604 ; taille : inférieure à 5 nm) [Deta 15] et des NPs d'oxyde d'hafnium (taille : 50 nm) pour améliorer le traitement des sarcomes des tissus mous [Bonv 17].

Conclusion et perspectives

La radiothérapie est une méthode de traitement utilisée dans plus de la moitié des cas de cancer. Elle repose sur les propriétés ionisantes des rayons X, qui induisent directement ou indirectement des lésions à l'ADN des cellules, bloquant ainsi leur prolifération. L'une des principales limites de la radiothérapie réside dans son incapacité à cibler la tumeur. Les dommages induits par les rayons X sont en effet répartis le long du trajet du faisceau et touchent à la fois les tissus sains et les tissus tumoraux. Cette limite est particulièrement contraignante dans le cas du traitement des gliomes, pour lesquels la dose délivrée est donc limitée par la tolérance du cerveau sain. L'utilisation d'éléments lourds permettrait de repousser cette limite en augmentant préférentiellement la déposition de l'énergie dans la tumeur. Cette stratégie est étudiée depuis plus de vingt ans dans l'équipe RSRM et repose sur l'accumulation d'atomes lourds, historiquement des agents de contraste iodés, dans les tissus tumoraux. Lors de l'irradiation, ces atomes lourds interagissent avec les rayons X : les électrons secondaires issus de ces interactions déposent ensuite leur énergie localement, augmentant ainsi le dépôt de dose dans un périmètre restreint.

Les expériences précliniques combinant une injection d'iode et une irradiation monochromatique (50 keV) ont montré l'efficacité de ce protocole. Celui-ci fait actuellement l'objet d'études cliniques en phases I et II (principal investigateur : Pr. J. Balosso). En parallèle de ces études, les travaux de l'équipe RSRM visent à développer de nouveaux composés qui permettraient d'augmenter cet effet différentiel. L'efficacité des NPs métalliques pour répondre à cet objectif a été montrée dans de nombreuses études de la littérature *in vitro* et *in vivo* [Hain 04, Reti 15, Brun 16]. Les précédents doctorants de l'équipe RSRM dans ce domaine ont étudié plusieurs types de NPs composées d'éléments variés (gadolinium, or, platine, fer). Les nanoparticules de fer, fournies dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe coréenne de J.-K. Kim, ont prouvé leur intérêt thérapeutique dans la thèse de Paul Gimenez [Gime 15] et ses travaux ont été poursuivis au cours de la thèse présentée dans ce manuscrit.

Bien que les mécanismes responsables de l'effet thérapeutique obtenu avec les NPs ne soient pas encore complètement connus, certains résultats font maintenant l'unanimité. Parmi eux, il est généralement accepté que l'effet thérapeutique dépend de la concentration en atomes lourds atteinte dans la tumeur. Un recouvrement total de la tumeur semble être un point critique pour l'obtention d'un effet thérapeutique significatif. Diverses stratégies sont donc mises en place pour améliorer la distribution de ces composés malgré la présence de la barrière hémato-encéphalique. Nous pouvons citer par exemple l'injection directement dans la tumeur par infusion contrôlée (*Convection-Enhanced Delivery*) ou par infusion très lente réalisée par pompe osmotique, la fonctionnalisation et le *coating* des nanoparticules et l'ouverture mécanique ou osmotique de la barrière hémato-encéphalique.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit avaient deux objectifs : d'une part, confirmer le potentiel des NPs Fe pour renforcer les effets de la radiothérapie dans la tumeur, et d'autre part,

étudier la possibilité d'utiliser les monocytes/macrophages pour transporter les NPs Fe jusque dans la tumeur.

Les NPs Fe pour augmenter la dose dans la tumeur

Une première partie de ces travaux a été consacrée à l'étude du potentiel des NPs Fe pour augmenter la dose déposée dans la tumeur.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux conséquences de l'exposition des cellules de gliome F98 aux NPs Fe sans irradiation. Les cellules de gliome internalisent efficacement les NPs Fe. Celles-ci sont localisées dans des vacuoles du cytoplasme. La masse de fer internalisée par cellule justifie par ailleurs l'utilisation des NPs Fe car les concentrations atteintes sont suffisamment élevées pour espérer obtenir un effet thérapeutique selon les simulations. Cette internalisation a cependant un impact sur le métabolisme des cellules, particulièrement à des concentrations supérieures à 0.06 mg(Fe)/mL. A ces concentrations, le cycle cellulaire se bloque alors en phase S, la phase la plus radiorésistante, et les cellules semblent entrer en apoptose. Une des pistes envisagées pour expliquer ce phénomène est la dégradation des NPs Fe entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène par catalyse de la réaction d'Haber-Weiss.

Le potentiel des NPs Fe pour augmenter la dose délivrée à la tumeur a ensuite été étudié lors d'expériences *in vitro*. Un effet sur la survie cellulaire a été mesuré pour une irradiation monochromatique à 30 keV. Cet effet s'est révélé dépendant de la concentration de NPs Fe dans le milieu de culture. L'effet diminue ensuite pour une irradiation à 51 keV, jusqu'à devenir indétectable à 80 keV. Ces observations concordent avec les simulations Monte Carlo : les interactions photoélectriques sont plus probables à basse énergie, et ce gain devient minime pour le fer à des énergies supérieures à 80 keV. Ces expériences montrent en outre l'absence d'effet "biologique" aux énergies supérieures à 30 keV. Le fait que le bénéfice thérapeutique ne soit obtenu que pour des énergies voisines de 30 keV est la principale limite de l'utilisation des NPs Fe pour renforcer le dépôt de dose dans le cadre du traitement du glioblastome par radiothérapie externe. En effet, un faisceau de 30 keV est rapidement atténué par les tissus (en quelques cm) et ne permettrait pas d'atteindre les tumeurs profondes comme les glioblastomes. L'irradiation par brachythérapie avec des sources d'iode 125 émettant à 35 keV pourrait être une piste intéressante à étudier. Cette application thérapeutique des NPs Fe pourrait par contre être transférée au traitement d'autres types de tumeurs accessibles avec un faisceau de 30 keV, comme les tumeurs superficielles ou peu profondes.

D'autre part, l'utilisation des NPs Fe nous a confrontés à des difficultés expérimentales. La caractérisation de ces NPs a montré le manque de reproductibilité de cet outil de travail. Les NPs individuelles ont une forte propension à s'agglomérer en amas, impactant la stabilité de la solution dans le temps. La sonication, dans les conditions étudiées, permet de remédier légèrement à ce problème mais cette méthode s'est révélée insuffisante pour obtenir des conditions expérimentales fiables. Les expériences *in vitro*, de ce fait, ont été peu reproductibles car une même concentration de NPs Fe dans le milieu de culture menait à des réponses cellulaires et une masse de fer internalisée variables. La survie cellulaire, directement dépendante de la masse de fer internalisée dans les cellules, a donc été différemment affectée d'une expérience à une autre. Il serait intéressant, dans l'optique d'approfondir cette étude, de travailler sur la conception des NPs Fe de façon à rendre les différents lots plus stables et reproductibles.

Transport et distribution des NPs Fe dans la tumeur

Une seconde partie de ces travaux a été dédiée à l'étude d'une méthode novatrice pour transporter les NPs Fe dans la tumeur et obtenir une distribution optimale de ce composé dans les tissus. Cette méthode repose sur l'utilisation de cellules immunitaires, les monocytes et les macrophages : celles-ci sont chargées en NPs *ex vivo* puis injectées par voie intraveineuse. Attirés par les messages chimiques envoyés par les tissus tumoraux, les monocytes/macrophages s'infiltrent à travers la BHE et se répartissent dans la tumeur. Cette partie a été réalisée en collaboration avec Mélanie Flaender, alors en post-doctorat dans l'équipe.

Une première étude *in vitro* a montré la possibilité de charger les monocytes/macrophages de lignée avec les NPs Fe FerInject. Ces NPs sont alors internalisées dans des vésicules du cytoplasme des cellules.

Par la suite, cette stratégie a été expérimentée *in vivo* dans un modèle de gliome chez le rat. Après une première irradiation de la tumeur visant à accroître le potentiel attractif de la tumeur pour les cellules immunitaires, des monocytes/macrophages de lignée marqués ont été injectés par voie intraveineuse. Après plusieurs jours pendant lesquels les cellules ont migré dans les tissus, les animaux ont été sacrifiés et les coupes de cerveau analysées au microscope de façon à y retrouver les cellules injectées. Aucun monocyte/macrophage de lignée n'a pu être retrouvé dans les tissus tumoraux. La même expérience a été répétée avec des monocytes/macrophages primaires dérivés de la moëlle osseuse de rats donneurs. Cette fois, quelques cellules ont bien migré dans la tumeur, mais en nombre insuffisant pour espérer obtenir un effet thérapeutique avec le fer.

Enfin, une injection intratumorale de monocytes/macrophages primaires a été réalisée dans l'objectif de tester cette méthode comme alternative à l'injection en CED de NPs Fe seules. Les cellules ont bien migré autour de leur point d'injection mais ne se sont pas réparties suffisamment pour recouvrir la majorité du volume tumoral. Il serait intéressant d'étudier la cinétique de la distribution cellulaire et de comparer cette distribution à celle qui pourrait être obtenue par CED.

L'injection intra-tumorale directe impliquant un protocole lourd pour le patient, il serait préférable de trouver un moyen moins invasif pour distribuer les NPs Fe dans la tumeur. Une autre stratégie a été abordée au cours de cette thèse : l'ouverture locale de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons. Cette méthode est actuellement en cours de développement dans l'équipe d'Emmanuel Barbier avec Vasile Stupar *et al.* (Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble). En collaboration avec cette équipe, des NPs Fe ont été injectées après ouverture de la BHE chez le rat sain ou porteur de gliome F98. L'analyse des images IRM montre une accumulation de fer dans les zones ainsi perméabilisées (chute du signal IRM dans ces zones). Ces études préliminaires ont donné des résultats prometteurs et il serait intéressant d'approfondir ces travaux après optimisation du système de façon à réaliser des tirs reproductibles ciblant la tumeur (développements en cours au GIN).

Perspectives

Les expériences *in vitro* réalisées pendant ces travaux de thèse montrent que la présence des NPs Fe dans les cellules de gliome F98 peut induire un effet thérapeutique suite une irradiation à 30 keV, si la quantité de fer accumulée dans les cellules est suffisante. A des énergies supérieures à 50 keV, cet effet devient moindre et n'est pas ou peu détectable. La première expérience préclinique sur des rats porteurs de gliome F98 a permis de mettre en évidence une très petite augmentation de

survie après injection intraveineuse des NPs Fe et irradiation à 20 Gy par rapport aux irradiations seules (%ILS 73% contre 59%, respectivement (*Log-Rank test*, p=0.07)). Après injection CED et radiothérapie, la survie n'est pas significativement différente de la survie après radiothérapie seule (%ILS = 64%, p=0.24). Ces observations sont comparables aux résultats obtenus par Bobyk *et al.* avec les NPs d'or : un petit effet additionnel était observé avec l'injection des NPs de 15 nm [Boby 10]. Aucun survivant à long terme n'avait été observé. Si les NPs utilisées dans cette thèse sont différentes de celles de Bobyk, la conclusion reste donc identique : des effets intéressants sont observés *in vitro* et sur des modèles de tumeurs sous-cutanées [Choi 12a, Hain 04] mais le traitement du gliome reste bien plus complexe.

La problématique commune à ces différentes expériences est celle de la **distribution des NPs dans la tumeur**. Une injection intratumorale directe par CED permet d'atteindre des concentrations élevées dans la tumeur et de limiter la toxicité générale aux autres organes en contournant la barrière hemato-encéphalique. Cependant, cette méthode d'injection permet difficilement d'obtenir un recouvrement de la totalité du volume tumoral. L'injection par voie intraveineuse entraîne une distribution plus homogène des composés dans la tumeur mais les concentrations atteintes sont insuffisantes pour obtenir un effet thérapeutique. De plus, l'injection de grandes quantités de composés pourrait induire une toxicité aux autres tissus du corps, notamment aux organes ayant une fonction de filtration du sang.

Dans ces travaux de thèse, une première stratégie novatrice de distribution intracérébrale des NPs a été envisagée, reposant sur l'utilisation de cellules immunitaires comme Chevaux de Troie. Cette stratégie n'a pas fonctionné avec nos conditions expérimentales. Cependant, il doit être possible d'optimiser ces conditions de façon à ce que cette stratégie fonctionne car d'autres équipes ont réussi à prouver la migration de cellules immunitaires dans des tumeurs cérébrales après les avoir injectées par voie intraveineuse [Choi 12d, Vala 07, Kioi 10]. Une autre stratégie a alors été abordée dans le cadre d'une collaboration (Emmanuel Barbier, Vasile Stupar *et al*, GIN, Grenoble). L'ouverture mécanique de la BHE par ultrasons a permis d'obtenir des résultats encourageants. Cette méthode permettrait d'atteindre également des zones périphériques de la tumeur dans lesquelles les cellules tumorales sont infiltrées. Cet avantage est toutefois à double tranchant car la présence de NPs Fe dans le tissu sain peut aussi causer des dommages par radionécrose dans les tissus initialement non ciblés par la thérapie.

L'efficacité du traitement est démontrée *in vitro* selon l'énergie d'irradiation et les résultats sont encourageants pour de nombreux composés. La transposition de ces résultats aux études précliniques du traitement du glioblastome reste complexe. Toutes les expériences utilisant les NPs se heurtent aux mêmes difficultés. La barrière hémato-encéphalique n'est pas le seul frein à une répartition optimale des NPs dans les tissus. La pression tumorale interstitielle, supérieure à la pression intravasculaire, limite aussi la pénétration des composés au sein de la masse tumorale. Une réduction de cette pression pourrait aussi contribuer à une meilleure distribution des composés dans la tumeur. Il semble maintenant essentiel d'unir les efforts pour construire un protocole de distribution des NPs dans la tumeur.

Un deuxième aspect qui, je l'espère, découlera de cette thèse concerne la fiabilité des outils permettant d'étudier et d'approfondir les connaissances actuelles sur les mécanismes mis en jeu. Comme le soulignent plusieurs autres articles, il semble nécessaire de mettre au point une **méthodologie systématique** pour étudier l'effet des NPs lors de l'irradiation. Si chacun appliquait cette même méthodologie, il serait plus aisé de comparer différents éléments ou différentes NPs, afin d'affiner les choix des composés pour optimiser la méthode thérapeutique. Cette méthodologie passerait idéalement par l'utilisation de NPs reproductibles. Enfin, il paraît essentiel d'optimiser la concep-

tion chimique des NPs et leur stabilité dans le temps afin de rendre les différents lots comparables et permettre des études de pharmacocinétique et de toxicologie. Le développement d'une stratégie de fonctionnalisation des nanoparticules permettrait de faciliter leur infiltration dans les tissus et ou le ciblage des cellules tumorales.

Les capacités de radiosensibilisation et/ou d'augmentation de dose des NPs appliquées à la radiothérapie des tumeurs font l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, et deux composés sont portés à ce jour en phases d'essais cliniques (NPs d'hafnium (NBTXR3, phases II et III, NCT02379845) et NPs de Gd (AGuIX, phase I, NCT02820454). Par ailleurs, de nouvelles stratégies sont développées pour améliorer la répartition de ces composés dans les tumeurs cérébrales. L'alliance de ces deux facettes (développement de la NP d'une part, et transport des NPs d'autre part) permet de nourrir la perspective qu'un composé fonctionnel permettra à l'avenir d'améliorer le protocole de radiothérapie pour les gliomes. Si, par la suite, le fer ne se révèle pas être le composé optimal, bien d'autres éléments permettent aujourd'hui d'obtenir des résultats encourageants tels que l'hafnium, l'argent ou le gadolinium.

Annexe A

Matériel expérimental

Sommaire

A.1 Nanoparticules 266
A.1.1 Le FerInject® 266
A.1.2 Les NPs Fe de l'équipe coréenne 267
A.2 Culture cellulaire 268
A.2.1 Cellules tumorales de rat 268
A.2.2 Monocytes et macrophages 269
A.3 Agents de contraste 272
A.4 Modèles tumoraux 274
A.4.1 Rôle des modèles animaux pour l'étude des tumeurs 274
A.4.2 Le modèle tumoral F98 275
A.4.3 Le modèle tumoral 9L 275
A.4.4 Le modèle tumoral C6 276
A.5 Sources de rayons X disponibles 277
A.5.1 Tube à rayons X conventionnel 277
A.5.2 L'ESRF, source de rayonnement synchrotron 278

Ces travaux de thèse ont nécessité l'utilisation d'outils variés. D'un chapitre à l'autre, les composés ou les lignées cellulaires peuvent varier. Bien que cela puisse être plus pesant à lire pour le lecteur, le choix a été fait de décrire le matériel dans ce chapitre à part. Ce choix a été motivé par la volonté de souligner les caractéristiques de chaque outil et leurs différences, tentant ainsi de tisser le lien entre les travaux effectués et d'y apporter un peu plus de recul.

A.1 Nanoparticules

Principalement deux types de nanoparticules de fer ont été utilisées au cours de cette thèse : les NPs "FerInject", disposant d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), et les NPs Fe synthétisées et utilisées par une équipe coréenne, qui nous sont délivrées gracieusement dans le cadre d'une collaboration avec cette équipe (J.K. Kim *et al.*). Une nanoparticule comporte plusieurs éléments : un coeur (métallique dans notre cas), un *coating* enrobant en partie ou en totalité le coeur de la particule, et éventuellement des fonctionnalisations fixées autour de la particule. De nombreuses propriétés vont dépendre de ces éléments : les interactions physiques avec le rayonnement seront surtout liées à la nature du coeur métallique, tandis que les interactions biologiques vont plutôt découler de la nature du *coating* et des fonctionnalisations.

A.1.1 Le FerInject®

Le FerInject® est un composé médical permettant de traiter les patients souffrant d'anémie liée à une carence martiale en fer. La carence martiale peut être déclenchée par diverses pathologies (*e.g.* maladies inflammatoires, pathologies gynécologiques, cancers) ou apparaître dans des situations variées (*e.g.* insuffisance rénale chronique sévère, transfusion autologue, anémie post-opératoire). Elle conduit à une altération de la qualité de vie du patient.

Le FerInject® est utilisé lorsque le traitement par voie orale est impossible ou peu efficace. Il est injecté par voie intraveineuse et traite plus rapidement la carence en fer que le fer administrée par voie orale. Ce composé est constitué de nanoparticules d'oxyde de fer possédant un coeur métallique d'akaganéite (β-FeOOH) [Neis 15]. Ce coeur métallique est enrobée d'un *coating* de carboxymaltose. Le diamètre hydrodynamique des NPs est de 23 nm [Jahn 11]. Une fois injecté, le FerInject® est rapidement internalisé dans le foie, la rate et à 80% dans la moëlle osseuse par les macrophages du système réticulo-endothélial [Lyse 09]. Son temps de demie-vie dans le sang est compris entre 7 et 12 h [Geis 11] et l'élimination rénale est négligeable.

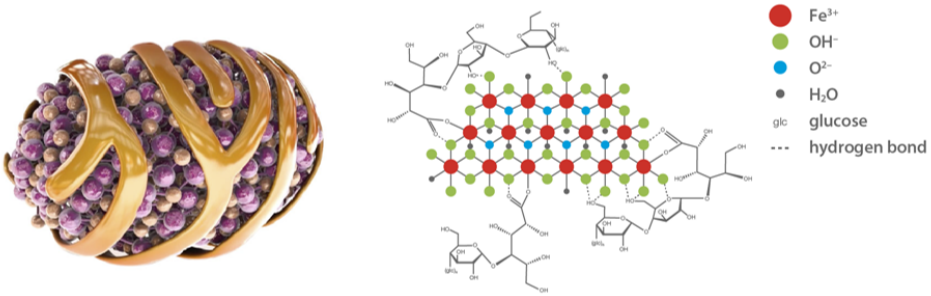


Figure A.1 – *Structure et composition du FerInject® : le coeur métallique, de structure akaganéite, est enrobé de carboxymaltose. Illustrations provenant du site officiel du FerInject®.*

Le FerInject® permet une vitesse d'infusion bien plus grande que d'autres composés existants comme le fer sucrose (15 min pour 1 g de fer [Kuln 08] pour le FerInject®, contre 210 min pour 500 mg de fer pour le fer sucrose). Des études de toxicité, de pharmacologie et de tolérance ont été conduites sur plusieurs modèles animaux. De plus, trois études de phase I ont été menées, concluant que le FerInject® était stable et efficace pour des injections de 500 mg réparties sur plusieurs jours ou une injection unique de 1 g une fois par semaine. Deux études de phase II et trois études de phase III ont permis de confirmer que ce composé était efficace et bien toléré, et ne causait *a priori* pas de problème de sécurité (d'après la Haute Autorité de Santé, 2015).

Le FerInject® n'apporte pas d'amélioration thérapeutique pour ce type de pathologie comparé aux autres alternatives par voie veineuse mais son rapport efficacité/effets indésirables le rend intéressant. **Les effets secondaires les plus fréquents** (1 à 10%) suite à l'injection de FerInject® comprennent l'élévation de la pression artérielle, des nausées, des vertiges et des céphalées, ainsi qu'une réaction au site d'injection. De plus, il est connu qu'une injection en intraveineuse de préparation à base de fer peut, dans quelques rares cas, déclencher une réaction immédiate d'hypersensibilité. C'est pourquoi ce procédé n'est réalisé qu'en présence de médecins pouvant contrôler l'état du patient. Toutefois, il est possible que cette réaction soit due au *coating* en dextran de certains composés. Le FerInject, enrobé de carboxymaltose, ne contient pas de dextran.

Motivations à travailler avec le FerInject® : pour notre application (Cheval de Troie et augmentation de dose lors de la radiothérapie), le FerInject® a l'intérêt d'être capté préférentiellement par les macrophages du système réticulo-endoplasmique (ce qui permet de corriger les carences en fer). Il est donc possible que les monocytes/macrophages puissent en internaliser en grande quantité, ce qui constitue un avantage conséquent pour l'approche Cheval de Troie. Un autre intérêt primordial dans l'utilisation du FerInject® réside dans l'autorisation de mise sur le marché du composé : ceci implique que la solution est stable *in vivo* et donc *a priori* aussi *in vitro*, que la toxicité à ces concentrations est nulle et que les différents lots sont très similaires (ce qui rend les expériences reproductibles). L'AMM facilite de plus l'éventuel passage de la méthode développée vers la clinique.

A.1.2 Les NPs Fe de l'équipe coréenne

Les NPs de fer de l'équipe coréenne collaboratrice sont des NPs d'oxyde de fer Fe_3O_4 (magnétite). Elles mesurent individuellement 15 nm de diamètre et possèdent un *coating* en alginate [Choi 12a]. Elles ont été utilisées dans nombre de leurs études, *in vitro* mais surtout *in vivo* [Kim 10a, Choi 12a, Seo 13, Jeon 16], ainsi que dans la thèse de Paul Gimenez qui précédait les travaux présentés ici. Plus de détails concernant la caractérisation de ces NPs Fe sont exposés dans le chapitre 5.

Ces NPs Fe sont concentrées à 25 mg (Fe_3O_4)/mL dans la solution mère et sont synthétisées par sonication. Le **protocole de synthèse**, explicité dans les publications de l'équipe collaboratrice, est le suivant : 1,72 g de FeCl2·4H2O et 4,70 g de FeCl 3·6H2O (8,65 mmol Fe^{2+} /17,30 mmol Fe^{3+}) sont dissous dans 80 mL d'eau distillée. Un précipité magnétique noir est obtenu en chauffant la solution à 80°C sous atmosphère d'argon, tout en augmentant le pH à 10 par ajout d'hydroxyde d'ammonium à 30% dans l'eau, et en soumettant le tout à des ultrasons pendant une heure (20 kHz, 140 W). L'alginate utilisé pour enrober la surface des nanoparticules est ajouté dans un second temps : 2 g des NPs précédemment obtenues sont diluées dans 60 mL d'eau salée et 25 mL d'acide alginique par chauffage de la solution à 80°C. La solution est continument agitée grâce à un barreau magnétique puis est soniquée à 50 W pendant 30 minutes sous atmosphère d'azote. Les NPFe sont ensuite purifiées par lavage avec de l'eau salée alors qu'elles sont attirées par un aimant intense en

néodyme (densité de champ magnétique Br = 11000 Gauss). Un ferrofluide est finalement obtenu, à la concentration de 25 mg/mL de NPs Fe.

L'équipe coréenne utilise ces NPs Fe dans un but thérapeutique couplées à la radiothérapie afin d'augmenter localement le dépôt de dose [Choi 12a]. Plus récemment, ils se sont orientés vers l'utilisation de ces NPs en hadronthérapie, notamment car celles-ci permettraient de produire l'effet PIXE (*particle-induced x-ray emission*) [Kim 10a] : ces NPs seraient capables d'émettre des rayons X de basse énergie lorsqu'elles sont excitées par un faisceau de protons à haute énergie. En plus d'être utilisées dans un contexte similaire au nôtre, ces NPs Fe ont l'avantage de posséder un coeur en Fe_3O_4, ce qui leur permet d'être détectées en IRM -ce qui n'est pas le cas pour le FerInject.

A.2 Culture cellulaire

A.2.1 Cellules tumorales de rat

L'étude de nouvelles thérapies anticancéreuses requiert constamment la mise en place de modèles de cellules tumorales permettant de tester *in vitro* l'efficacité des traitements et d'en optimiser les différents paramètres. Il est ensuite important que ces mêmes cultures cellulaires puissent former des tumeurs cérébrales chez l'animal afin de pouvoir confirmer, dans un second temps, l'efficacité du traitement *in vivo* [Bart 09]. Les modèles de tumeurs cérébrales de rat ont été introduits dans les années 1970. Il a alors été montré qu'il était possible d'induire des tumeurs cérébrales chez le rat par des injections intraveineuses d'agents mutagènes. Les deux agents les plus couramment utilisés furent le *N*-Méthyl-*N*-nitrosourée (NMU), injecté de manière hebdomadaire chez les rats adultes, et le *N*-nitroso-*N*-éthylurée (ENU), affectant plus particulièrement les gamètes.

Ce travail de thèse implique trois cultures cellulaires de gliome de rat, les lignées C6, 9L et F98, et plus particulièrement les F98 et les 9L. Ces cellules sont toutes cultivées en adhérence. Le tableau de la figure A.2 récapitule leurs principales caractéristiques ainsi qu'une observation au microscope de ces cellules en culture. Les trois lignées ont un temps de doublement plutôt rapide, un peu moins d'une journée.

La lignée cellulaire F98 a été isolée par Weschler *et al.* après une injection intraveineuse d'ENU à des rattes Fischer gestantes, causant ainsi le développement de tumeurs spontanées chez les ratons. Cette lignée est aujourd'hui disponible sur ATCC. Les cellules en culture se présentent le plus souvent comme des cellules fusiformes ou de forme triangulaire. Elles mesurent 10 µm de diamètre environ en suspension [Taup 13].

La lignée cellulaire 9L a été établie par Benda *et al.* en injectant de manière répétée de la NMU par voie intraveineuses à des rats Fischer adultes. La lignée 9L utilisée sur la ligne biomédicale ID-17 de l'ESRF a été apportée en 1997 par Géraldine Le Duc, qui l'a obtenue du *Brookhaven National Laboratory* de New York [Bouc 12]. Les cellules 9L sont dites dérivées d'un "gliosarcome" : il s'agit bien d'une tumeur originaire de la glie, tout comme les gliomes, mais celle-ci, par sa croissance, va déclencher des propriétés néoplasiques chez d'autres éléments du tissu de soutien alentour (les méninges par exemple). Les cellules 9L en culture sont des cellules effilées, un peu plus grandes en moyenne que les F98, bien que nous utiliserons aussi la valeur de 10 µm de diamètre.

La lignée C6 a été établie par Benda et Schmidek en déclenchant des tumeurs spontanées chez le rat Wistar adulte par exposition répétée à la NMU [Grob 02]. Les cellules tumorales C6 proviennent de ATCC. Une fois en culture, elles présentent une morphologie variable selon les condi-

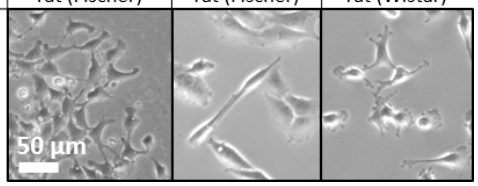
	F98	9L	C6
type de cellule	glioblastome	gliosarcome	gliome
animal	rat (Fischer)	rat (Fischer)	rat (Wistar)
observation caractéristique			

Figure A.2 – *Tableau récapitulatif des cellules tumorales utilisées. Les images ont toutes été prises avec le microscope du laboratoire.*

tions auxquelles elles sont exposées [Bart 09]. Elles sont plutôt allongées et possèdent fréquemment plusieurs pseudopodes. Les cellules C6 disposeraient de certaines capacités de cellules souches cancéreuses, comme l'auto-renouvellement ou la différenciation en d'autres types cellulaires plus matures *in vitro* [Bart 09].

A.2.2 Monocytes et macrophages

Il existe principalement deux méthodes pour étudier le comportement ou les spécificités d'un type cellulaire dans une situation donnée. La première solution consiste à utiliser des lignées immortalisées du type cellulaire correspondant, par exemple les lignées commerciales d'ATCC (*American Type Culture Collection*), que l'on peut cultiver aisément pendant de nombreux cycles cellulaires. La deuxième solution repose sur la mise en place d'une culture de cellules primaires, c'est-à-dire issues de tissus provenant d'animaux ou de biopsies par exemple. Les deux méthodes ont toutes deux leurs avantages et leurs inconvénients, et leur emploi dépend de ce que l'on souhaite montrer au cours des expériences.

A.2.2.1 Lignées commerciales

Nous avons, dans un premier temps, étudié le comportement des lignées commerciales de monocytes-macrophages. En effet, la mise en place de ce type de culture est généralement assez aisée et permet d'obtenir des populations relativement homogènes "à l'infini" (pendant plusieurs dizaines de cycles cellulaires au minimum). Ces lignées expriment *in vitro* des propriétés semblables à leur analogue *in vivo*, dont le chimiotactisme [1], la phagocytose, l'activité d'enzymes ou encore la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps [2] [Snyd 77]. Il est aussi possible d'ajouter ou retirer artificiellement certains attributs à ces lignées pour étudier leur influence au cours des processus biologiques.

Des quatre lignées de monocytes-macrophages utilisées, trois sont issues de lymphomes ou de leucémies. Les lymphomes et les leucémies sont des cancers initiés par les lymphoblastes, c'est-à-dire des cellules encore dans un stade de développement intermédiaire mais pouvant notamment se différencier en globules blancs. Ces cellules peu différenciées se mettent alors à proliférer de

1. Le chimiotactisme représente la capacité d'une cellule à se déplacer en direction (ou à l'opposé) d'une substance ou d'une cellule cible.

2. La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ou ADCC, de l'anglais *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) permet aux cellules immunitaires de lyser, c'est-à-dire détruire, des cellules cibles porteuses de marqueurs spécifiques sur leur membrane.

manière anarchique, tout en conservant certaines propriétés qui leur étaient spécifiques : c'est en cela que réside leur intérêt, car elles permettent ainsi l'étude de certaines propriétés communes aux monocytes-macrophages tout en bénéficiant d'une lignée "immortalisée".

Cependant, ces différentes lignées de monocytes-macrophages n'expriment pas de façon homogène les mêmes spécificités que leurs homologues *in vivo* : par exemple, si certaines sont capables de chimiotactisme comme les globules blancs *in vivo*, d'autres lignées seront au contraire incapables de migrer. Il est important d'être conscient de ce caractère "dénaturé" des cellules de lignée : selon ce que l'on souhaite étudier dans les expériences *in vitro*, certaines lignées seront donc à proscrire. Le tableau de la figure A.3 résume les caractéristiques principales des quatre lignées utilisées.

La lignée J774A.1 est la lignée cellulaire la plus utilisée dans cette thèse. Elle est issue d'un lymphome osseux chez la souris.

La lignée RAW 264.7 est une lignée murine provenant d'une leucémie induite par un virus, le virus de la leucémie murine d'Abelson, qui contamine les cellules lymphoïdes.

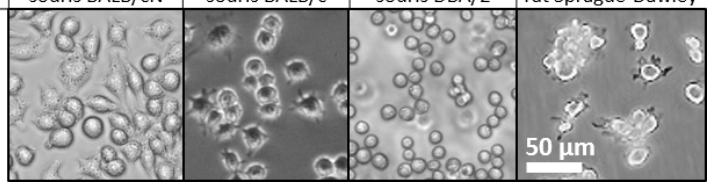
	J774A.1	RAW264.7	P388D1	NR8383
type de cellule	majoritairement macrophage	monocyte - macrophage	majoritairement monocyte	macrophage alévolaire
animal	souris BALB/cN	souris BALB/c	souris DBA/2	rat Sprague-Dawley
observation caractéristique				

Figure A.3 – *Tableau récapitulatif des monocytes/macrophages de lignée utilisés. Les cellules sont toutes issues d'ATCC. Les images ont toutes été prises avec le microscope du laboratoire à l'exception de celle des NR8383 (obtenue sur le site de ATCC).*

Dans une de leurs études, Chamberlain *et al.* comparent les lignées J774A.1 et RAW264.7 avec des monocytes-macrophages murins primaires cultivés à partir de la moëlle osseuse des tibias et fémurs et différenciés pendant 7 jours. Ils observent que les cellules de lignée sont plus petites et plus rondes et présentent moins d'extensions cytoplasmiques [Cham 09]. Elles semblent donc être sous une forme moins mature que les cellules primaires après différenciation, qui sont plus étalées et comportent des pseudopodes. Cette observation est confirmée par la caractérisation des marqueurs de surface des cellules : tandis que le marqueur F4/80 se retrouve plutôt sur les macrophages très différenciés, le marqueur CD14 et le récepteur Fc sont eux plutôt caractéristiques de cellules moins différenciées. Grâce à cette étude, Chamberlain et son équipe affirment que les cellules au stade le plus différencié sont les macrophages primaires, puis les J774A.1, et enfin les RAW 264.7 qui se révèlent être les moins matures. Ils soulignent aussi que, pour les RAW 264.7, l'exposition au LPS n'engendre pas de régulation positive de l'interleukine IL-6 (une cytokine pro-inflammatoire) : cette lignée n'est donc *a priori* pas adaptée pour l'étude de l'inflammation.

La lignée P388D1 (lignée ATCC CCL-46) a été créée dans les années 1970 à partir de lymphoblastoïdes murins issus d'un lymphome. Valable et son équipe ont montré que ces cellules étaient capables de chimiotactisme et d'internalisation du fer [Vala 07]. Une sous-lignée des CCL-46, les ATCC TIB-63, a été bien plus exploitée que la lignée CCL-46. L'équipe de Snyderman a d'ailleurs comparé cette sous-lignée à des macrophages primaires péritonéaux. Ces études ont révélé que la lignée P388D1 TIB-63 ne montrait pas de capacité de migration aléatoire ou d'activité de chimio-

tactisme significatif face aux substances testées -qui ont pourtant attiré les macrophages primaires. De plus, cette lignée est peu capable de phagocytose. Par contre, leur cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps est active et fonctionnelle [Snyd 77]. Il n'est toutefois pas certain que ces résultats soient transposables aux CCL-46, bien que les TIB-63 en soient issues.

Au contraire de ces trois lignées issues d'une maladie menant les cellules à proliférer anarchiquement, **les NR-8383** sont issus de tissus sains. Il s'agit d'une culture de macrophages avéolaires de rats. Malgré nos efforts, nous ne sommes pas parvenus à faire proliférer activement cette lignée.

Dans son étude, Helmke *et al.* compare les NR-8383 avec des macrophages alvéolaires primaires et conclut que l'utilisation de la lignée permet d'obtenir des résultats plus reproductibles et de modéliser *in vitro* de nombreuses activités spécifiques des macrophages. Cette lignée est, de plus, capable de phagocytose et exprime le récepteur Fc [Helm 89].

Les différentes cellules de lignées de monocyte-macrophages présentent une importante hétérogénéité d'activités biologiques. Si aucune ne semble adaptée pour modéliser le comportement d'un monocyte ou d'un macrophage primaire *in vivo*, chacune peut se révéler utile pour comprendre les paramètres associés à une ou plusieurs fonctions spécifiques des macrophages [Snyd 77]. De plus, chez un être vivant, les macrophages exposent aussi une très grande hétérogénéité de propriétés selon le tissu dans lequel ils ont été recrutés.

A.2.2.2 Monocytes / macrophages primaires

Les Mo/Ma primaires utilisés lors de ces travaux de thèse sont issus de la moëlle osseuse des tibias et fémurs des rats donneurs. Les monocytes indifférenciés ainsi prélevés sont ensuite cultivés dans du milieu de culture complet (voir section B.6.2) contenant du surnageant de culture de cellules tumorales L929. L'exposition des monocytes aux molécules provenant des L929 va provoquer leur différenciation en macrophages. En effet, les cellules tumorales L929 en culture produisent du M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor* en anglais) [Weis 08], une cytokine déclenchant la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en macrophages (ou en d'autres types cellulaires liés). Ce phénomène est quelque peu similaire à la différenciation d'un monocyte causée par les signaux envoyés par les tissus dans lesquels il a été recruté. La figure A.4 illustre le procédé de culture de macrophages primaires.

La figure A.5 représente l'évolution de la maturation des monocytes sur six jours. Les cellules, initialement peu différenciées, sont suspension lors des premiers jours, puis adhèrent peu à peu au cours de leur maturation. Toutes les cellules ne se différencient pas de manière simultanée : ainsi, à chaque moment, les flasques contiennent des cellules à différents stades d'évolution. Les macrophages ainsi différenciés sont dits "polarisés M0". Pour les spécialiser M1 ou M2, il faut ensuite les exposer à un autre milieu conditionné (contenant par exemple du LPS pour le type M1, et de l'IL4 pour le type M2).

Le mélange de cellules injecté contient donc à la fois des monocytes, en suspension, et des macrophages à différents stades de maturation, adhérents dans la flasque de culture. Ceci n'est pas gênant du point de vue de notre expérience de Cheval de Troie car les monocytes et les macrophages ont chacun des propriétés intéressantes. Il faut bien noter que, chez un être vivant, les cellules circulant dans le sang et migrant à travers les vaisseaux sanguins sont les monocytes, c'est-à-dire des cellules encore indifférenciées. C'est seulement une fois dans les tissus que les monocytes se différencient en macrophages. Injecter des monocytes permet d'exploiter leurs capacités de migration : en effet, nous ne savons pas si un macrophage très différencié sera encore capable de migrer à travers la

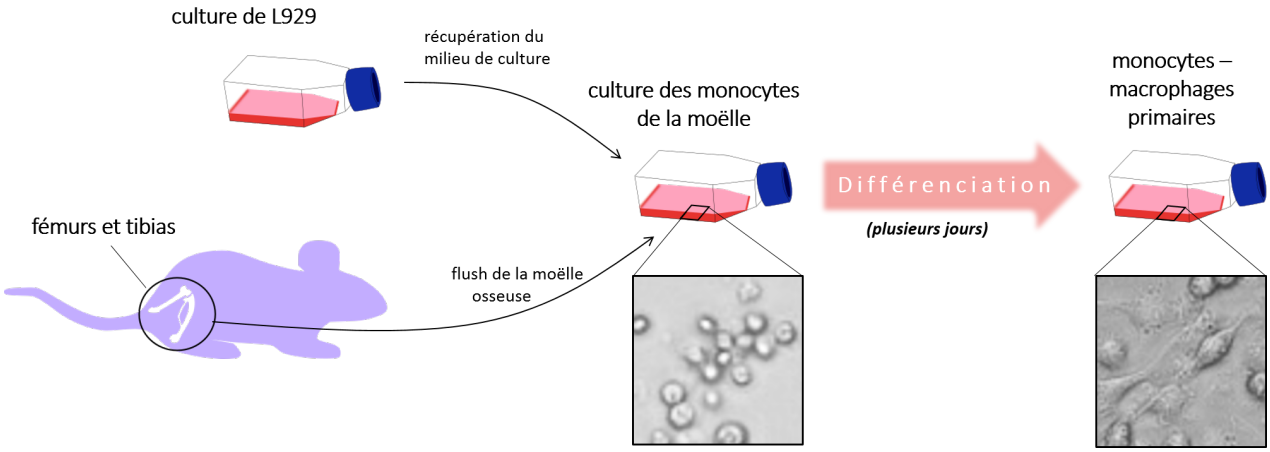


Figure A.4 – *Schéma représentant la méthode de culture des monocytes-macrophages primaires issus de la moëlle osseuse retirée des tibias et fémurs de rats donneurs. Les monocytes sont différenciés pendant plusieurs jours par la culture en milieu conditionné de surnageant de culture de L929.*

BHE aussi efficacement qu'un monocyte. D'un autre côte, un monocyte peu différencié ne pourra peut-être pas internaliser une masse de fer suffisante pour obtenir un effet thérapeutique, tandis que les macrophages sont connus pour leurs capacités évoluées de phagocytose.

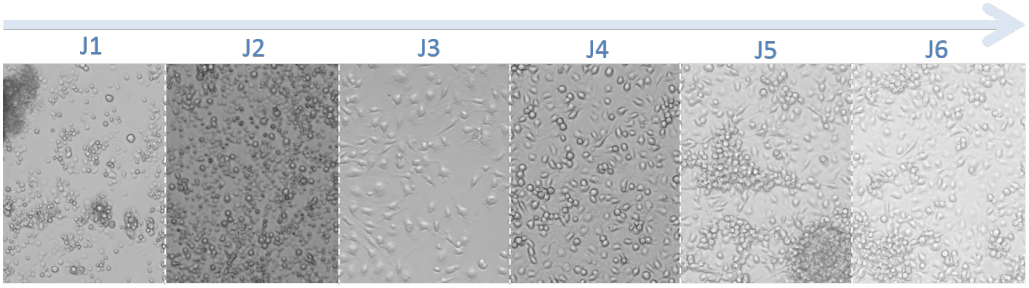


Figure A.5 – *Suivi de la maturation des Mo/Ma primaires de rats sur 6 jours au microscope optique du laboratoire (x20). En suspension lors des premiers jours, les cellules deviennent peu à peu adhérentes au cours de leur maturation.*

A.3 Agents de contraste

Les agents de contraste ont pour objectif d'augmenter le contraste de certaines structures biologiques ou des fluides lors d'une imagerie médicale de façon à les rendre plus visibles. Ils mettent ainsi en valeur certaines zones qui se confondraient sinon avec le reste des tissus. Leur principe de fonctionnement varie selon la modalité d'imagerie. Les agents de contraste utilisés en radiographie, fréquemment à base d'iode, absorbent fortement les rayons X et créent ainsi un contraste avec les tissus. Les agents de contraste en IRM, souvent à base de gadolinium, sont choisis pour leurs propriétés magnétiques. En quelques mots, l'IRM fonctionne grâce aux interactions entre les protons des atomes d'hydrogène présents dans le corps (majoritairement dans l'eau) et un champ magnétique intense délivré par un puissant aimant couplé à une onde radiofréquence. Le signal IRM renvoyé par les tissus est propre à la nature du tissu (structure organisée ou non, solide ou

liquide, ...). L'agent de contraste injecté modifie les caractéristiques magnétiques des tissus et donc leur comportement en IRM, donnant ainsi un signal plus fort et changeant les zones de contraste de l'image.

Les agents de contraste au Gd, communément utilisés en IRM, sont bien plus petits que les NPs Fe que nous avons utilisées : ils contiennent un unique atome de Gd par molécule. Les atomes de Gd libres ne sont pas directement injectés comme agent de contraste à cause de la toxicité inhérente de l'ion Gd^{3+}. Le fait que le rayon ionique du Gd^{3+} soit proche de celui du Ca^{2+} peut expliquer en partie sa toxicité. Le Gd libre entre donc en compétition avec le Ca^{2+} dans les processus physiologiques qui impliquent ce dernier et peut prendre sa place, inhibant l'activité de certaines enzymes par exemple [Rogo 16]. Ces troubles sont à l'origine de phénomènes biologiques nuisibles pour l'être vivant et peuvent engendrer une toxicité. Pour remédier à ce problème, tous les agents de contraste au Gd utilisent un ligand pour envelopper l'ion libre, empêchant ainsi les interactions avec les composés biologiques.

Structurellement, les agents de contraste au Gd peuvent être divisés en deux groupes selon le type de ligand qui entoure l'atome de Gd libre. On différencie les agents linéaires des agents macrocycliques. Les agents linéaires ont un ligand moléculaire organique allongé qui s'enroule autour de l'ion un peu de la manière dont un serpent s'enroulerait autour de sa proie. Les agents macrocycliques forment une structure de cage où l'ion se retrouve piégé dans la cavité centrale.

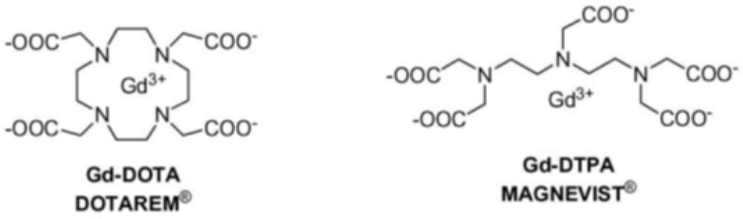


Figure A.6 – *Différences entre les structures des agents de contraste Magnevist et Dotarem, d'après [Aime 06].*

A présent, une dizaines d'agents de contraste au Gd sont commercialisés aux Etats-Unis, en Europe et au Japon. Ils sont tous non spécifiques et se distribuent principalement dans l'espace interstitiel extracellulaire, à l'exception de l'Eovist qui se concentre dans le foie.

Le Magnevist, ou acide gadopentétique, possède un ligand linéaire de type DTPA (cf Fig. A.6). Il s'agit du premier agent de contraste au Gd à avoir été commercialisé dans le monde entier. Il a été approuvé par la FDA (la *Food and Drug Administration*, Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) en 1988, ce qui explique en partie que l'expérience clinique de ce composé soit si développée.

Le Dotarem, ou acide gadotérique, possède un ligand macrocyclique de type DOTA. Il est diffusé en Europe depuis 1989 mais son entrée aux Etats-Unis est plus récente (2013). Il possède la constante d'équilibre la plus élevée des sept agents commercialisés : en d'autres mots, il s'agit du composé pour lequel l'atome de Gd est le plus fortement lié à son ligand [Bell 08].

Ces deux agents de contrastes ont la même concentration de Gd dans la solution injectable : 78.5 mg (Gd)/mL. Une fois injectés, ils ne sont en théorie pas métabolisés et sont éliminés par filtration rénale, avec un temps de demie-vie caractéristique de 10 minutes pour le Magnevist contre 9h au moins pour le Dotarem [Bell 08]. Aujourd'hui, c'est surtout le Dotarem, plus stable, qui est utilisé. Les lots de Magnevist sont d'ailleurs officiellement rappelés depuis le 15 janvier 2018, en même temps que l'Omniscan, suite à la fin des AMM pour ces produits. Ces agents linéaires sont

suspendus ou restreints à cause de leur propension jugée trop importante à libérer le Gd, source de toxicité.

A.4 Modèles tumoraux

A.4.1 Rôle des modèles animaux pour l'étude des tumeurs

L'étude *in vitro* de l'influence d'un traitement sur des lignées tumorales permet déjà de donner quelques informations concernant la potentielle efficacité de ce traitement et de construire les premières hypothèses quant aux mécanismes en jeu. Cependant, un modèle cellulaire *in vitro* ne peut pas rendre compte de la totalité des phénomènes engendrés par ce traitement chez les futurs patients. En effet, celui-ci ne peut pas reproduire les interactions ayant lieu *in vivo* entre les cellules tumorales et les tissus adjacents : ainsi, la contribution du micro-environnement tumoral, les conséquences de l'infiltration des cellules dans les tissus sains, l'angiogénèse ou la réponse inflammatoire ne sont alors pas pris en compte [Sime 14].

Le rôle premier d'un modèle animal est de reproduire autant que possible les causes et les caractéristiques biologiques de la maladie humaine correspondante afin de comprendre les mécanismes de son développement et d'identifier les traitements efficaces [Sime 14]. Idéalement, appliqué au cas des gliomes, un modèle animal comporterait les éléments suivants :

- les cellules tumorales sont dérivées de cellules gliales, ayant ainsi la même origine que les gliomes humains. La localisation anatomique du modèle tumoral est identique à celle du gliome humain.
- les caractéristiques histologiques du modèle tumoral sont semblables à celles des gliomes humains : le modèle tumoral impacte la BHE et possède une architecture hétérogène avec mise en place d'une néovascularisation, les cellules sont très invasives et les tumeurs ne sont pas ou peu immunogéniques [Bart 09].
- le modèle permet l'étude des thérapies (ce qui suppose une survie des animaux porteurs de tumeur suffisamment longue pour permettre l'étude), et la réponse des animaux à un traitement permet de prédire la réponse de ce traitement chez l'homme.

Au cours de cette thèse, les modèles tumoraux choisis furent des modèles orthotopiques [3] de gliome chez le rat. De plus, il s'agit de modèles syngéniques : pour chaque modèle, la lignée de cellules tumorales est suffisamment proche génétiquement de l'animal pour ne pas déclencher de réaction immunitaire suite à leur injection -comme cela peut être le cas lors d'un rejet dans le cas d'une greffe. Si le modèle n'était pas syngénique, la tumeur serait alors attaquée par le système immunitaire de l'animal, ce qui fausserait la transposition à l'homme car le gliome humain est rarement immunogénique. Les trois modèles tumoraux utilisés sont répertoriés dans le tableau de la figure A.7.

Il y a plusieurs avantages à travailler sur les modèles de rats pour l'étude des tumeurs cérébrales. Les publications référençant l'étude d'un modèle animal de gliome sont bien plus nombreuses chez le rat que chez la souris. De plus, la taille d'un cerveau de rat étant supérieure à celle d'un cerveau de souris, l'implantation de la tumeur est plus précise [Bart 09]. Cependant, les expériences impliquant des rats sont plus coûteuses pour un même nombre d'animaux que les expériences impliquant des souris. De plus, les études en immuno-histologie sont plus limitées chez le rat car il existe moins

3. "Orthotopique" signifie que les cellules tumorales sont injectées à l'emplacement anatomique de la tumeur à l'origine de ces cellules. Il s'agit donc d'un modèle pour lequel des cellules de gliome sont injectées dans le cerveau.

d'anticorps monoclonaux contre les marqueurs de surface et les chemokines des cellules de rat disponibles chez les fournisseurs par rapport à la souris.

Le protocole précis d'implantation est décrit rapidement dans la section B.6.1. Rapidement, il s'agit d'implanter des cellules de gliome dans le cerveau de l'animal anesthésié, par le biais d'une aiguille et d'un cadre stéréotaxique permettant de régler avec précision les coordonnées exactes de l'injection des cellules. Les cellules tumorales doivent être déposées au même endroit pour tous les rats de façon à obtenir un modèle le plus reproductible possible. Toutes les expériences impliquant des animaux au cours de cette thèse ont été approuvées par le comité d'éthique de l'ESRF.

A.4.2 Le modèle tumoral F98

L'un des deux modèles les plus fréquemment utilisés dans ces travaux de thèse est le modèle de gliome F98 chez le rat Fischer. Selon les expériences, 1000 à 5000 cellules tumorales sont implantées dans le noyau caudé du rat. Le gliome en résultant est une tumeur très infiltrante capable de créer des néovaisseaux sanguins. Les cellules tumorales envahissent massivement les tissus sains voisins, et il est possible de trouver des îlots de cellules tumorales à des distances variées de la masse tumorale principale. Habituellement, le coeur de la tumeur devient peu à peu nécrotique au cours de son développement et se compose alors de cellules tumorales fantômes, plus grandes que la normale et dont le noyau a disparu [Bart 09]. Le fait que le modèle F98 soit à la fois faiblement immunogénique et infiltrant le rend comparable aux gliomes humains. Il est complexe à traiter car l'injection de 100 cellules dans le noyau caudé du rat suffit pour entraîner la mort de 100% des animaux [Bart 09]. Dans le cas d'un traitement des animaux par radiothérapie, l'existence de quelques cellules infiltrées vivantes en dehors de la zone irradiée suffit pour que la tumeur rechute à ce nouvel endroit du cerveau [Math 07].

A.4.3 Le modèle tumoral 9L

Un autre modèle reviendra souvent au cours de cette étude : il s'agit du gliome 9L chez le rat Fischer. Le gliome 9L est le modèle le plus communément utilisé dans la littérature pour étudier les tumeurs cérébrales chez le rongeur [Bart 09]. 10^4 cellules 9L en suspension dans 1 µl de milieu de culture sont injectées dans le noyau caudé du rat, pour une irradiation prévue 10 jours après l'implantation. La tumeur ainsi formée a été caractérisée par Audrey Bouchet pendant sa thèse [Bouc 12], et le protocole a été optimisé dans ses travaux de façon à rendre ce modèle reproductible et stable dans le temps (le modèle n'a pas évolué sur 2 à 3 ans).

Les modèles 9L montrent des signes de réponse inflammatoire et sont très vascularisés. Leur croissance est exponentielle, et leurs capacités d'infiltration semblent varier selon les protocoles. En effet, dans le *review* de Barth, le modèle 9L est qualifié de peu infiltrant : la tumeur aurait une délimitation nette et peu de cellules envahiraient les tissus sains périphériques [Bart 09]. Cependant, l'étude immunohistologique du **modèle 9L de la ligne ID-17** montre l'infiltration du tissu sain périphérique par des cellules proliférantes. Des îlots de cellules tumorales se développeraient aussi hors de la zone tumorale principale [Bouc 12]. Enfin, malgré la réaction inflammatoire qu'elle peut provoquer, la progression tumorale de ce modèle est telle que, malgré les réactions immunitaires visant à détruire la tumeur, aucune régression tumorale spontanée n'a été observée [Bouc 12] -ce qui est contraire à l'observation d'autres auteurs.

A.4.4 Le modèle tumoral C6

Le modèle tumoral C6 chez le rat Wistar sera aussi utilisé dans ces travaux de thèse lors d'études pilote. Le modèle C6 a largement été utilisé en neuro-oncologie pour tester différents types de traitements (*e.g.* chimiothérapie, radiothérapie, thérapie photodynamique) [Bart 09]. Lors de l'implantation, 100 000 cellules dans 5 µL de milieu sont injectées dans le noyau caudé de l'animal [Grob 02]. La tumeur ainsi contractée possède des néovaisseaux sanguins intratumoraux et les cellules néoplasiques infiltrent les tissus sains adjacents à la masse tumorale principale. Une fois le stade de croissance assez avancé, la tumeur peut présenter plusieurs foyers de nécrose épars. Toutefois, le modèle C6 reste peu représentatif du gliome humain : ses capacités invasives restent restreintes et le modèle ne montre pas la même hétérogénéité que son homologue humain. De plus, les tumeurs C6 sont immunogéniques même chez le rat Wistar (dont sont issues les cellules néoplasiques), ce qui constitue une limite selon les études que l'on souhaite aborder sur ce modèle.

type de tumeur	mode d'induction de la tumeur à l'origine	nombre minimum de cellules à inoculer	immunogénicité	type de croissance
F98	ENU	10^1-10^2	faible	infiltrante
9L	NMU	10^4	fort	peu infiltrante
C6	NMU	10^4	fort	peu infiltrante
9L -ID17	NMU	10^4	moyenne	infiltrante

Figure A.7 – *Tableau comparatif des modèles tumoraux utilisés. D'après [Bart 09] et [Bouc 12]. En pratique, les propriétés d'un même modèle peuvent varier d'un laboratoire à l'autre : les caractéristiques des modèles F98, 9L et C6 présentées ici sont relatives aux modèles de l'équipe de Barth. Le modèle 9L de l'équipe RSRM (implantée sur la ligne ID-17) a été caractérisé par Audrey Bouchet et ne possède pas les mêmes propriétés que le modèle 9L de Barth et al..*

Quel est alors le modèle idéal ? Il est important de comprendre les avantages et les limites de chaque modèle. Par exemple, l'utilisation de modèles immunogéniques chez le rat immunocompétent pour modéliser le gliome humain est discutable. Le concept de modèle idéal reste vague et semble plutôt dépendre du contexte. Ceci est bien illustré par la comparaison des éléments définissant un modèle idéal présentés d'un côté par [Sime 14] et d'un autre côté par [Bart 09]. Dans un premier cas, le modèle idéal est défini comme représentatif de l'hétérogénéité entre les différentes tumeurs des différents patients. Dans un second cas, le modèle idéal permet au contraire d'obtenir des croissances tumorales reproductibles et prévisibles. La définition du modèle idéal semble donc plutôt liée au type d'étude que l'on souhaite mener avec le modèle. De façon très schématique, on pourrait le décrire ainsi : s'il s'agit de discriminer significativement entre plusieurs conditions de traitement sans sacrifier de très nombreux animaux, un modèle plutôt homogène semble indiqué, comme le 9L. Si l'on souhaite finaliser une étude de faisabilité d'un traitement pour un futur transfert à l'homme, un modèle hétérogène semble plus recommandé, comme le F98. Néanmoins, il est certain qu'un modèle reste un modèle : ce n'est pas parce qu'un traitement est efficace chez le rat qu'il le sera nécessairement chez chez l'homme et avec la même intensité. Toutefois, s'il n'est pas ou peu efficace chez le rat, il y a peu de chance qu'il le soit chez l'homme.

A.5 Sources de rayons X disponibles

Plusieurs sources de rayons X ont été utilisées au cours de cette thèse. Il s'agissait, d'une part, d'employer les rayons X à des fins thérapeutiques : dans le cadre de notre projet, les expériences ayant pour objectif de tester le potentiel des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose dans la tumeur lors d'une radiothérapie ont eu lieu sur la ligne ID-17 de l'ESRF, en utilisant soit le générateur de rayons X, soit le faisceau synchrotron. D'autre part, le rayonnement X synchrotron a aussi été exploité pour imager cellules et animaux : ces expériences ont eu lieu sur les lignes ID-17 et ID-16.

Le générateur de rayons X et le synchrotron reposent tous deux sur le même phénomène physique : le rayonnement continu de freinage, ou pertes *Bremsstrahlung*. D'après les équations de Maxwell, **toute particule chargée dont la vitesse varie produit un rayonnement électromagnétique**. Par "vitesse", on entend "vecteur vitesse", c'est-à-dire à la fois la norme (la "valeur" de la vitesse que l'on utilise communément) et la direction de cette vitesse. En conséquence, dévier une particule chargée causera l'émission d'un rayonnement électromagnétique et donc une perte d'énergie de la particule. Ce rayonnement électromagnétique est composé, dans le cas qui nous intéresse, de rayons X et est émis de manière tangentielle à la trajectoire des électrons.

A.5.1 Tube à rayons X conventionnel

Un générateur de rayons X est le plus souvent composé d'un tube à rayons X, d'un générateur haute tension et d'un système de refroidissement pour l'anode. Les premiers générateurs de rayons X utilisés fournissaient des rayons X de basse énergie (énergie maximale : 200 keV). Les énergies moyennes (énergies maximales : 200 keV à 1 MeV) sont apparues dans les années 1930 et ont été très largement employées pour les traitements superficiels. Aujourd'hui, les faisceaux les plus couramment utilisés sont les faisceaux à haute énergie (énergies maximales : 6 à 10 MeV), qui permettent le traitement des tumeurs d'une profondeur supérieure à 2 cm [Reti 15].

Le **principe de fonctionnement du tube à rayons X** est le suivant : les électrons sont libérés de la cathode chauffée puis accélérés dans le vide par un champ électrique. Ils sont projetés vers une pièce de métal cible, l'anode. Les électrons interagissent alors dans le métal : les collisions engendrent une émission de chaleur et de rayons X par pertes Bremsstrahlung. Le spectre qui en résulte est un spectre de rayons X continu, causé par le rayonnement de feinage, couplé à des pics étroits à certaines énergies spécifiques qui sont caractéristiques du métal de la cible. Le spectre s'arrête abruptement pour une longueur d'onde minimale ; cette limite liée à l'énergie maximale des électrons. Par exemple, prenons le cas d'un tube à rayons X accélérant des électrons grâce à un champ électrique de 200 kV. L'électron acquiert donc une énergie cinétique de 200 keV. Lorsqu'il entre en collision avec la cible, il peut être dévié par les noyaux des atomes de la cible (chargés positivement) et émettre ainsi un ou des photons Bremsstrahlung. L'énergie maximale des photons sera de 200 keV, ce qui correspond au cas où l'électron s'arrête et cède toute son énergie à un unique photon (conservation de l'énergie). Les photons émis ont donc une énergie inférieure ou égale à 200 keV, ce qui correspond à une longueur d'onde d'au minimum 6.2 nm [4]. En réalité, un électron va habituellement émettre plusieurs photons, chacun ayant donc une énergie inférieure à 200 keV pour respecter la conservation de l'énergie. C'est pourquoi le spectre est polychromatique. On considère en général que l'énergie moyenne se situe à environ 2/3 de l'énergie maximale. Le générateur de rayons X de la ligne ID-17 possède un spectre polychromatique de photons allant de 10 à 200 keV,

4. D'après la relation de Planck-Einstein, $E = hc/\lambda$, avec E l'énergie du photon en J, h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide et λ la longueur d'onde du photon

illustré dans la figure A.10. Il est possible, en utilisant la filtration appropriée, de fixer l'énergie moyenne des photons à 50 keV, même si le spectre reste polychromatique.

Dans la littérature, on trouve des **unités variées permettant de caractériser le spectre des photons émis** grâce aux propriétés de la machine. Comme vu précédemment, la tension (en V) est directement reliée à l'énergie cinétique des électrons, et donc à l'énergie maximale des photons émis. Il est ainsi commode de se représenter l'énergie des photons en électron volt (eV), 1 eV étant l'énergie gagnée par un électron accéléré dans un potentiel de 1 V. De plus, si l'on souhaite travailler en longueur d'onde, l'énergie d'un photon y est reliée par la relation de Planck-Enstein décrite précédemment en note de bas de page. Enfin, certaines publications utilisent l'unité du kVp (de *peak kilovoltage*), qui fait référence aux équipements plus anciens dans lesquels la tension n'était pas délivrée de façon continue et variait périodiquement. Le kVp indiquait alors la tension maximale appliquée au tube à rayons X. Il est donc lié à la plus haute énergie cinétique des électrons frappant la cible, et donc à l'énergie maximale du spectre des photons émis. Les générateurs plus modernes appliquant un potentiel constant : dans ce cas, le kVp et la tension continue délivrée kV sont identiques.

Le générateur de rayons X de la ligne ID-17 permet de réaliser des expériences préliminaires à basses énergies et en rayonnement polychromatique. De plus, son accès pour les expériences est plus aisé que le faisceau synchrotron, pour lequel où il faut candidater à un temps de faisceau. Dans le cadre de nos études, nous travaillons, avec le synchrotron, à des énergies bien plus basses que les énergies des photons utilisés en cliniques.

A.5.2 L'ESRF, source de rayonnement synchrotron

Dans le domaine de la physique des accélérateurs de particules, l'émission Bremsstrahlung a longtemps été considérée comme un phénomène parasite : en effet, l'heure était à la création d'accélérateurs de plus en plus puissants. L'énergie délivrée par mètre d'accélérateur étant techniquement limitée, les énergies records ne pouvaient être atteintes qu'en construisant des accélérateurs de plus en plus longs, ou en faisant "boucler" ces accélérateurs, d'où la naissance des accélérateurs ciculaires. Cependant, d'après les lois de Maxwell, une particule chargée effectuant un mouvement circulaire émet un rayonnement Bremsstrahlung, dit "rayonnement de freinage" : la particule perd ainsi de l'énergie. Ce n'est qu'un peu plus tard que des physiciens se sont intéressés aux propriétés de ce rayonnement et ont greffé des expériences sur les accélérateurs pour étudier ce phénomène. Depuis les années 1980, des machines consacrées à la production du rayonnement Bremsstrahlung sont construites : ce sont les synchrotrons. Le rayonnement électromagnétique de très grande intensité émis par ces sources possède un spectre continu allant de l'infrarouge aux rayons X durs.

A.5.2.1 Production du rayonnement synchrotron

L'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) est une installation européenne établie à Grenoble qui fut inaugurée en 1994. Sa gouvernance internationale comporte 22 états partenaires et ses collaborations s'étendent bien au-delà de l'Europe, impliquant aussi récemment la Russie et l'Inde. De nombreux laboratoires demandent des temps d'accès au rayonnement et ce sont 9000 scientifiques venant du monde entier qui sont accueillis sur le site par année (*esrf.eu*).

L'ESRF est un synchrotron de troisième génération, évoluant vers la quatrième génération depuis le lancement en 2009 d'un programme d'amélioration des performances. La génération d'un synchrotron est liée à l'énergie maximale atteinte par les électrons, dont dépend la brillance, une

des grandeurs permettant de rendre compte de la qualité de la source. Schématiquement, plus les électrons sont accélérés, plus le spectre émis contiendra des composantes hautement énergétiques : par exemple, des électrons accélérés à 6 GeV (comme pour la troisième génération de synchrotron) permettent d'obtenir une composante de rayons X "durs" ("hautement" énergétiques) dans le spectre émis. La brillance décrit le nombre de photons émis par seconde, par mm^2, par mrad^2 (divergence angulaire) et pour une bande passante d'énergie égale à 0.1% de l'énergie considérée (c'est-à-dire concernant les photons dont l'énergie est comprise dans un intervalle ayant pour centre la valeur de l'énergie considérée et pour largeur 0.1% de cette énergie). En d'autres termes : plus la brillance est grande, et plus il y a de photons d'une longueur d'onde et d'une direction donnée concentrés en un point par unité de temps.

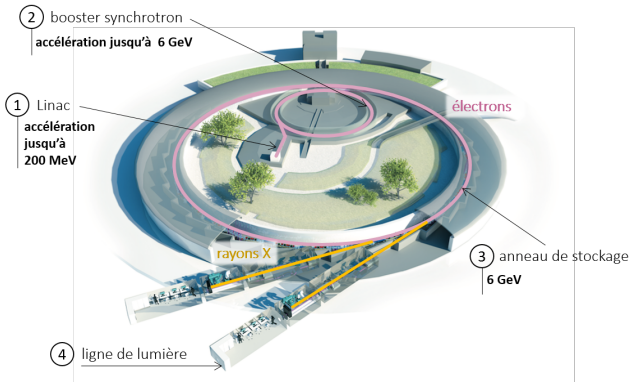


Figure A.8 – *Principe de fonctionnement du synchrotron (d'après une image provenant de esrf.eu). Après avoir été accélérés jusqu'à 200 MeV dans le Linac, les électrons sont acheminés dans le booster synchrotron où ils sont à nouveau accélérés jusqu'à 6 GeV. Ceux-ci rejoignent ensuite l'anneau de stockage où ils sont maintenus à 6 GeV.*

L'ESRF, comme tout synchrotron, est composé de plusieurs éléments, principalement : le Linac, le booster synchrotron et l'anneau de stockage (cf Fig. A.8). Les électrons de l'ESRF sont émis par un canon à électrons, puis accélérés dans **le Linac**, un accélérateur linéraire de 16 m de long, jusqu'à 200 MeV. Les électrons sont ensuite injectés dans le booster où ils sont accélérés jusqu'à leur énergie maximale de 6 GeV. **Le booster** mesure 300 m de circonférence et contient de nombreuses cavités radiofréquence permettant d'accélérer les électrons. Les électrons ayant atteint 6 GeV sont injectés dans l'anneau de stockage, où ils circulent dans le vide (10^{-9} mbar) à une vitesse proche de celle de la lumière. Lorsque les électrons sont déviés par les aimants de courbure ou par les éléments d'insertion, ils perdent peu à peu leur énergie en émettant le rayonnement de freinage Bremsstrahlung. **L'anneau de stockage** contient donc 6 cavités radiofréquence qui redonnent de l'énergie aux électrons afin de compenser ce qu'ils ont perdu par les pertes Bremmstrahlung. Toutefois, lorsque leur énergie devient trop basse, de nouveaux électrons accélérés à 6 GeV par le booster sont injectés. C'est ce que l'on appelle le "*refill*".

Les électrons qui circulent dans l'anneau de stockage peuvent être vus comme des charges qui se déplacent : il y a donc création d'un courant, appelé le ***courant de la machine***. De là en découle l'intensité maximale du faisceau de photons. Le courant varie en fonction du "mode de remplissage" dans lequel la machine est utilisée, c'est-à-dire du nombre de paquets d'électrons circulant dans l'anneau et de la manière dont ils disposés les uns par rapport aux autres (*i.e.* le *4* ou *16-bunch filling mode* dans lequel 4 ou 16 paquets d'électrons sont répartis dans l'anneau, ou encore le *Uniform filling mode* dans lequel 992 paquets d'électrons sont uniformément répartis). La valeur maximale du courant de la machine varie classiquement entre 20 et 200 mA selon le mode

de remplissage.

L'anneau de stockage mesure 844 m de circonférence et n'est pas à proprement parler "circulaire". Il s'agit plutôt d'un polygone comprenant 32 sections rectilignes et 32 sections courbes. Dans chaque section rectiligne, des aimants de focalisation contraignent les électrons à rester groupés autour de leur trajectoire optimale. Dans chaque section courbe, un **aimant de courbure** dévie les électrons de façon à les orienter vers la section suivante. Pour cela, les aimants de courbure génèrent un champ magnétique perpendiculaire à la trajectoire des électrons : les électrons sont ainsi déviés par la force de Lorentz et émettent un rayonnement dirigé de façon tangentielle à la courbure (comme illustré la figure A.9 A). Les initiales BM, pour *Bending Magnet* ("aimant de courbure") désignent aussi les lignes de lumière utilisant le rayonnement produit par les électrons lorsqu'ils sont déviés par les aimants de courbure. Ces sources, bien que moins intenses que celles décrites par la suite, délivrent toutefois des faisceaux de photons qui peuvent bénéficier à de nombreuses expériences avec les systèmes optiques appropriés.

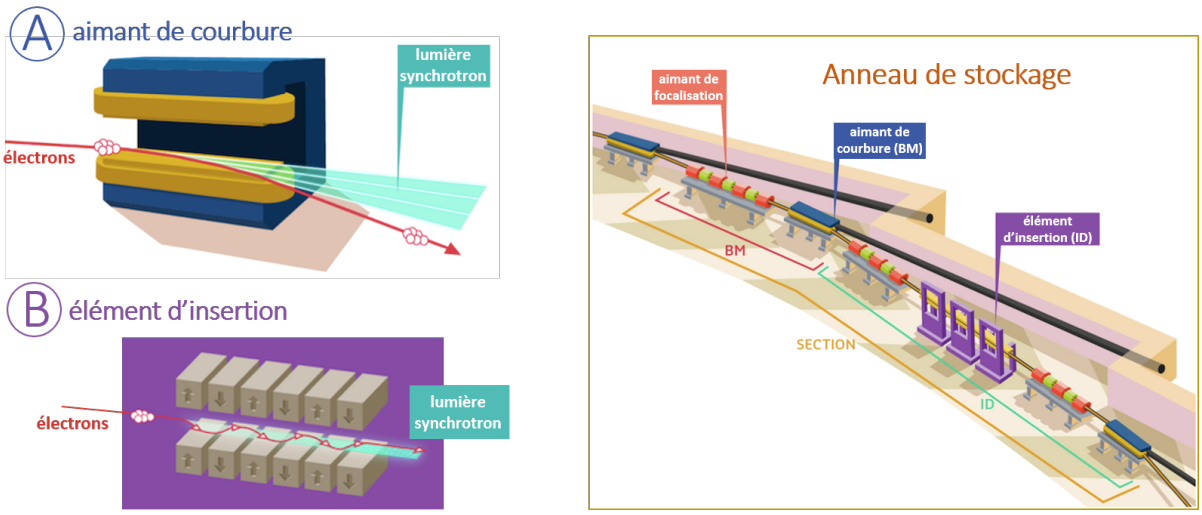


Figure A.9 – *Principe de fonctionnement de l'anneau de stockage du synchrotron et de ses éléments (d'après des images provenant de* esrf.eu*). Les électrons sont maintenu dans la trajectoire de l'anneau grâce aux aimants de courbure (A), tandis que les éléments d'insertion (B) permettent d'augmenter la brillance de la machine.*

La grande brillance des synchrotrons de troisième génération réside dans la présence d'"éléments d'insertion" dans l'anneau de stockage. Ces **éléments d'insertion** (ou ID pour *Insertion Device*) se situent dans les sections rectilignes et forcent les électrons à osciller pour accroître la production du rayonnement. Il existe deux sortes d'éléments d'insertion dans l'anneau de stockage de l'ESRF : les *wiggler* et les onduleurs. Dans les deux cas, ces systèmes sont composés d'une succession de petits aimants de polarité alternée. Lorsqu'ils s'y engagent, les électrons effectuent des oscillations de courte période autour de leur trajectoire, ce qui provoque l'émission tangentielle de rayons X (Fig. A.9 B). La différence entre les *wiggler* et les onduleurs réside dans la périodicité des aimants. Dans le cas des *wiggler*, les cônes de rayonnement émis à chaque oscillation se superposent et l'intensité est sommée. Le spectre obtenu est continu. Au contraire, les cônes de rayonnement produits par les onduleurs sont très fins et leur superposition mène à un phénomène d'interférence : le rayonnement qui en résulte ne contient que quelques longueurs d'onde précises, mais la brillance à ces longueurs d'onde est conséquente (quatre ordres de grandeur au-dessus de celle produite par les aimants de courbure). La longueur d'onde des rayons X émis peut être finement réglée en jouant

sur l'écartement des deux structures qui portent les aimants (*gap*). Le rayonnement synchrotron est intéressant de par ses propriétés de cohérence et de très faible divergence et par sa grande intensité. Le spectre d'émission est large et l'ESRF est spécialisé dans les rayons X "durs" (10 keV - 250 keV).

Enfin, le rayonnement X produit est conduit vers **la ligne de lumière** correspondante. Une ligne de lumière contient classiquement trois parties :

- **la cabine optique,** où le faisceau est calibré et optimisé avant son utilisation pour les expériences. Il peut être focalisé, collimaté ou passé dans des monochromateurs afin de sélectionner une ou des longueurs d'onde particulières.
- **la cabine expérimentale**, dans laquelle les échantillons sont imagés ou traités, contenant aussi éventuellement les capteurs et les détecteurs.
- **la cabine de contrôle**, d'où le déroulement des expériences est orchestré. Les chercheurs sont protégés du rayonnement X provenant du synchrotron par des cabines plombées appelées *hutch*.

L'ESRF comporte 44 lignes de lumière, dont les noms sont indicatifs de la source qu'ils utilisent (élément d'insertion ou aimant de courbure) ainsi que de leur localisation géographique. Par exemple, le rayonnement utilisé par la ligne ID-17 est issu de l'élément d'insertion 17 (deux *wigglers* en l'occurence). Chacune de ces lignes est spécialisée dans une technique et/ou un domaine précis ; les domaines étudiés couvrent un large spectre allant de la chimie à la physique fondamentale en passant par l'imagerie médicale, la science des matériaux ou encore la paléoanthropologie.

A noter que, par rapport au générateur de rayons X, un des avantages du synchrotron réside dans la très grande intensité de flux de photons : cela permet de sélectionner une seule longueur d'onde précise de photons tout en gardant une intensité de faisceau considérable. Si l'on réalisait la même chose avec un générateur de rayons X, il n'y aurait plus qu'un faible flux de photons après "filtration" des longueurs d'onde. Irradier un échantillon en rayonnement monochromatique prendrait alors un temps considérable et rendrait les expériences irréalisables.

A.5.2.2 La ligne biomédicale ID-17

La ligne biomédicale ID-17 de l'ESRF est spécialisée dans les nouvelles méthodes d'imagerie médicales (contraste de phases, tomographie bi-énergie, tomographie par soustraction au K-edge...) et les traitements innovants (SSRT et MRT) [Taup 13]. La ligne comporte deux cabines expérimentales : l'une, située à environ 40 m de la source, est consacrée à la MRT. Le faisceau utilisé en MRT est un "faisceau rose" (*pink beam*) : il s'agit du faisceau blanc filtré duquel les plus basses énergies ont été retirées. Ce faisceau est très intense, de petite dimension et est fractionné spatialement en microfaisceaux. L'autre cabine se trouve à 150 m de la source, ce qui permet d'utiliser un faisceau d'environ 150 x 20 mm^2 en bénéficiant de la divergence naturelle du faisceau. Des plaques de tungstène permettent d'ajuster les dimensions du faisceau. Cette cabine est spécialisée dans la SSRT et l'imagerie médicale [Elle 99]. Les deux cabines utilisant le même faisceau, celles-ci ne peuvent fonctionner simultanément.

Le rayonnement produit par le *wiggler* d'ID-17 est supérieur par 5 ordres de grandeur à celui d'un générateur de rayons X classique A.10. Ceci permet de sélectionner une bande passante très fine de longueurs d'onde tout en conservant un faisceau très intense, d'une irradiance de l'ordre de 10^{12} ph/s/cm^2. La ligne ID-17 permet de travailler à des énergies comprises entre 30 et 200 keV environ. Comme dit précédemment, le faisceau blanc est rendu monochromatique grâce un

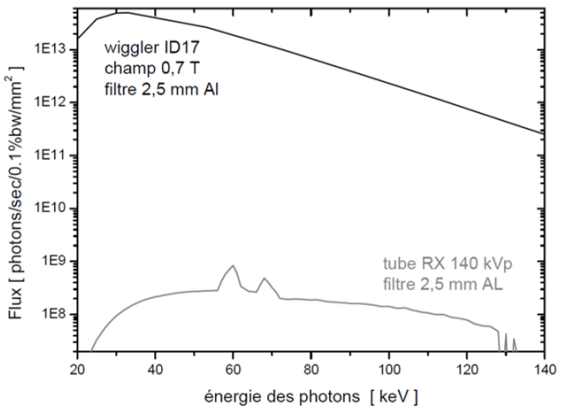


Figure A.10 – *Différences entre les spectres issus du Wiggler d'ID-17 et d'un générateur X conventionnel, à 1m de la source. D'après [Boud 06].*

dispositif appelé *monochromateur*, qui sélectionne une longueur d'onde particulière à partir d'un spectre large. La ligne ID-17 possède deux monochromateurs :

- le monochromateur "d'angiographie" permet d'obtenir deux faisceaux séparés de 300 eV et de 150 eV de bande passante autour du K-edge d'un élément (I, Gd, ...). Il permet de réaliser des soustractions de K-edge de deux images acquises simultanément et est surtout utilisé pour la tomographie à deux énergies.
- le monochromateur '*fixed exit*" permet de sélectionner une longueur d'onde comprise entre 25 et 150 keV avec une bande passante d'une dizaine d'eV ($\Delta E/E = 0.1\%$). Ce monochromateur est utilisé en tomographie classique et pour l'irradiation des échantillons. Il est composé de deux cristaux de silicium taillés 111 montés en géométrie de Laue. Cette configuration permet d'obtenir un faisceau monochromatique à la même hauteur quelle que soit l'énergie d'irradiation utilisée, et de direction horizontale par rapport au faisceau blanc d'entrée.

Dans la cabine expérimentale, un détecteur au germanium haute pureté est situé face au faisceau, au fond de la salle. Il est monté sur un système de translation pour pouvoir l'aligner avec précision lors des expériences. Les échantillons à irradier ou à imager sont placés sur la chaise motorisée face au faisceau, ce qui permet de les faire entrer en rotation de manière à les irradier selon plusieurs incidences ou à obtenir une image tomographique.

A.5.2.3 La ligne d'imagerie ID-16

La ligne ID-16 est une ligne de lumière de l'ESRF dédiée à l'imagerie. Elle est composée de deux parties, les lignes ID-16 A ([Vill 18]) et ID-16 B ([Mart 16]), pouvant fonctionner simultanément.

La **ligne ID-16 A** permet d'imager des échantillons de 20 à 50 µm d'épaisseur avec une très grande résolution. Le nanofocus se situe entre 15 et 30 nm. Pour pouvoir obtenir ces performances uniques, l'installation a été hautement optimisée : l'environnement est un environnement contraint sous vide, le montage est figé et seulement deux énergies d'excitation sont disponibles (17 keV et 33.6 keV). Du fait de l'optimisation de la plateforme, ses applications sont limitées à deux types d'imagerie : l'imagerie en fluorescence X et l'imagerie en contraste de phase 2D et 3D. Les échantillons peuvent être imagés à température ambiante ou en conditions cryogéniques. L'imagerie de phase 3D à l'échelle nanométrique est généralement utilisée pour étudier des structures biologiques comme des échantillons d'os, de parties du cerveau ou des cellules, mais aussi des matériaux ou encore des

polymères conducteurs. Du fait de l'exceptionnelle résolution atteinte, ce type d'imagerie est en quelque sorte un intermédiaire entre la microscopie optique et la microscopie électronique. D'autre part, la tomographie à fluorescence X permet d'obtenir des images 2D ou 3D des échantillons et de construire des cartes de répartition des éléments dans un échantillon. Cette méthode a été utilisée pendant ces travaux de thèse à une énergie d'excitation de 17 keV.

La **ligne ID-16 B** a un nanofocus situé entre 40 et 50 nm. Au contraire de la ligne ID-16 A dont l'environnement a été contraint et optimisé pour obtenir une résolution considérable, la ligne ID-16 B permet un travail dans l'air et les montages sont très flexibles. Il est donc possible d'y installer des dispositifs variés (four, cryostat, ...), ce qui fait d'elle la station "multimodale" d'ID-16. Les méthodes qui y sont appliquées sont très diversifiées et comprennent par exemple la diffraction, la spectrométrie et la fluorescence. Les énergies du faisceau peuvent être choisies entre 6 et 50 MeV, en monochromatique ou en polychromatique. La ligne ID-16 B est utilisée dans des domaines si variés qu'il est complexe d'en donner l'étendue. Les échantillons peuvent être relatifs à l'environnement, la biologie, la médecine ou encore, par exemple, l'héritage culturel.

Annexe B

Méthodes

Sommaire

B.1 Nanoparticules . . . 286
B.1.1 Mesure de la taille des NPs par TEM . . . 286
B.1.2 Mesure de la taille par *Dynamic Light Scattering* . . . 287
B.1.3 Mesure de la concentration par tomographie X synchrotron . . . 291
B.1.4 Sonication . . . 291
B.2 Culture cellulaire . . . 292
B.2.1 Repiquage des cellules . . . 292
B.2.2 Congélation des cellules . . . 292
B.2.3 Décongélation des cellules . . . 293
B.3 Etude de la survie cellulaire . . . 293
B.3.1 Irradiation au générateur de rayons X . . . 293
B.3.2 Test ATP-lite . . . 293
B.3.3 Test MTT . . . 294
B.3.4 Impact de l'exposition des NPs Fe sur les cellules . . . 294
B.3.5 *Live cell imaging* . . . 294
B.3.6 Etude du cycle cellulaire . . . 295
B.4 Mesures de la masse de fer internalisée par ICP-MS . . . 296
B.5 Echantillons pour imagerie . . . 298
B.5.1 Imagerie SR-XRF sur la ligne ID-16 . . . 298
B.5.2 Localisation des NPs par TEM dans les cellules . . . 301
B.5.3 Coloration au Bleu de Prusse . . . 301
B.6 Expérimentation animale . . . 302
B.6.1 Modèle orthotopique de gliome . . . 302
B.6.2 Culture des macrophages primaires . . . 302
B.6.3 Coloration des macrophages primaires . . . 303
B.6.4 Ouverture de la BHE par ultrasons . . . 305

B.1 Nanoparticules

B.1.1 Mesure de la taille des NPs par TEM

Un microscope optique est composé de deux parties principales : l'objectif est placé devant l'objet à observé et permet de former une image agrandie de cet objet si ce dernier est placé à la bonne distance de l'objectif. L'autre partie est appelée oculaire, et est placée du côté de l'oeil de l'observateur (ou du capteur). L'oculaire "récupère" l'image agrandie formée par l'objectif et la place dans le plan focal de l'oeil, ce qui permet à l'observateur d'observer sans accommoder (c'est-à-dire sans faire d'effort musculaire pour assurer la netteté de l'image observée).

La limite de résolution d'un microscope photonique classique est d'environ 0.2 µ. Certains paramètres peuvent jouer sur cette limite comme la qualité du capteur ou les imperfections des lentilles, mais il existe aussi une limite fondamentale à la résolution. Cette limite fondamentale est imposée par la diffraction de la lumière. En effet, à cause de ce phénomène, l'image d'un point n'est pas un point, mais une tache, appelée Tache d'Airy. L'image de deux points distincts sera donc constituée de deux taches. Plus les points seront voisins, et plus les taches se rapprocheront. Si les points à imager sont trop proches l'un de l'autre, l'image observée sera constituée de deux taches en partie superposée. Il n'est alors plus possible de distinguer un point de l'autre et la limite de résolution du microscope est atteinte.

0.2 µm de résolution ne suffisent pas pour observer des NPs mesurant 15 nm de diamètre ou de petits agglomérats d'une centaine de nm. La théorie d'Abbe explique que la limite de résolution d d'un microscope peut s'exprimer de la sorte : $d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$, λ étant la longueur d'onde de la source d'illumination, n l'indice de réfraction en sortie d'objectif et *alpha* le demi-angle du cône de lumière maximum accessible (au-delà de cet angle, les rayons ne rentrent plus dans l'objectif, ils sont réfléchis). Il y a donc deux solutions pour baisser cette limite de résolution : augmenter n, en utilisant des objectifs à huile par exemple, ou diminuer λ. La théorie de De Broglie en 1923 affirme qu'il est possible d'attribuer une longueur d'onde aux particules (dont les électrons). Cette longueur d'onde est reliée à la quantité de mouvement de la particule. La longueur d'onde d'un électron, par exemple, est beaucoup plus petite que celle d'un photon de lumière visible.

Les microscopes électroniques sont nés de cette théorie : la lumière est remplacée par un faisceau d'électrons et les lentilles par des champs magnétiques ou électrostatiques. Lorsque le faisceau d'électrons accélérés atteint la cible, certains passent à travers et d'autres sont dispersés, donnant ainsi donne une information sur la structure de l'échantillon. **La limite de résolution d'un microscope électronique est d'environ 2 nm**, ce qui permet d'observer les NPs Fe de manière individuelle. Nous utiliserons un microscope électronique à transmission, qui analysera donc le signal transmis par les électrons ayant traversé l'échantillon.

La plupart des matériaux "biologiques" sont très "transparents" aux électrons. Au contraire, les métaux lourds absorbent les électrons, donnant du contraste à l'image. L'observation au TEM ne nous informera donc pas sur l'ensemble des couches composant les NPs Fe mais seulement le coeur métallique.

Protocole : Les NPs ont été imagées en TEM après avoir été déposées sur des supports spécifiques (grilles pour TEM en cuivre, Electron Microscopy Science FF100-Cu, *Square Mesh Copper Grid*). Brièvement, 10 µL de dilution de NPs (1/100, 1/500, 1/1000) sont déposés sur la grille côté "membrane". La membrane est ensuite laissée à l'horizontal pendant 5 minutes durant lesquelles les NPs Fe se déposent. Le surplus de liquide est aspiré par capillarité. La membrane est enfin rincée par passage successif dans trois gouttes d'eau de 30 µL déposées sur un parafilm.

B.1.2 Mesure de la taille par *Dynamic Light Scattering*

La diffusion dynamique de la lumière, ou DLS, est une méthode permettant de mesurer la taille d'objets en suspension dans un liquide (particules, polymères, etc). Elle ne rend pas compte de la forme en trois dimensions des objets mais construit un **modèle sphérique équivalent de la NP**. Si l'on considère un objet irrégulier (une particule ou une molécule par exemple), il est possible de construire différentes "sphères équivalentes" selon le paramètre étudié (Fig. B.1) : une sphère équivalente en "taille maximale" dont le rayon serait égal à la plus grande dimension de l'objet, une sphère équivalente en "volume" dont le volume serait égal au volume de l'objet, ou encore une sphère équivalente en "coefficient de diffusion moyen", qui se diffuserait à la même vitesse que l'objet.

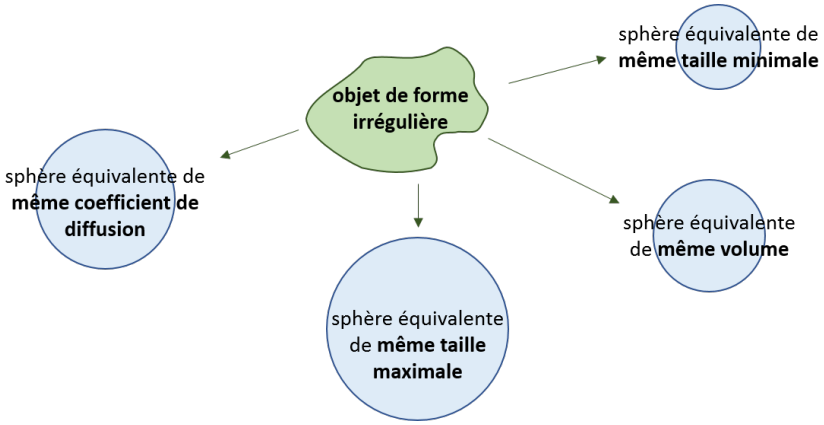


Figure B.1 – *Exemples de sphères équivalentes représentatives de différentes propriétés d'un objet 3D irrégulier. Figure adaptée du manuel du ZetaSizer Nano ZS, Malvern.*

En DLS, la mesure est fondée sur le fait que les particules en solution ont un mouvement aléatoire causé par les collisions avec les molécules du solvant autour d'elles. On appelle ce mouvement **le mouvement brownien**. La vitesse de ce mouvement dépend de nombreux paramètres dont la taille dH de la particule, la viscosité η de la solution et la température T. Elle est décrite par le coefficient translationnel de diffusion D qui est lié à tous ces paramètres par l'équation de Stokes-Einstein (avec k_B la constante de Boltzmann) : $dH = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$. On observe que plus la température est élevée et plus le mouvement brownien est rapide. De plus, plus la particule est petite est plus rapide elle est. **En DLS, on va construire des sphères équivalentes de même coefficient translationnel de diffusion D. Le diamètre de cette sphère équivalente sera considéré comme étant le diamètre mesuré de la particule.**

La taille de nanoparticule que l'on va obtenir avec cette équation n'est pas égale à celle mesurée par TEM. Il s'agit de la **taille hydrodynamique**, c'est-à-dire de la taille qu'aurait une sphère solide si son mouvement brownien avait la même vitesse que celle de notre nanoparticule. Cette taille ne dépend donc pas uniquement de la taille du coeur métallique de la NP, elle dépend aussi de toute modification de la structure de surface de la NP qui pourrait changer sa vitesse de diffusion. Par exemple, la présence de polymères à la surface de la NP (que ce soit volontairement, pour cibler un type cellulaire, ou non voulu, par exemple à cause l'adsorption de protéines du milieu) va "freiner" la diffusion de la NP. Sa vitesse ayant diminué, la taille mesurée sera donc plus grande.

En pratique, la mesure de taille est réalisée avec un Zetasizer Nano ZS (Malvern), au CEA de Grenoble (Liten), grâce à l'aide de Olivier Renard et Pierrick Lambert. Le protocole spécifique aux

NPs m'a été montré par Marie Dorier (CIBEST, CEA, Grenoble). L'opération se déroule comme suit : des NPs sont diluées dans de l'eau (ou du milieu de culture) dans une cuvette transparente. Usuellement, 2 µL de NPs Fe diluées dans 1 mL d'eau permettent d'obtenir des résultats exploitables. Lors de la mesure, un laser traverse la solution. Lorsque les NPs "rencontrent" un photon émis par le laser, le cortège électronique des atomes qui la compose sera déformé et va se mettre à osciller par rapport au noyau. Grâce à ces oscillations, l'énergie absorbée sera ré-émise sous forme d'un rayonnement de même longueur d'onde que celui du laser, et ce dans toutes les directions. Puis la particule revient à l'équilibre. **Un capteur va enregistrer l'intensité relative à la lumière ré-émise par les particules selon un angle de 175 degrés par rapport à l'émission du laser** (comme illustré dans la figure B.2). Il sera ensuite possible de relier l'intensité mesurée à la taille des NPs. En effet, les petites NPs vont avoir un mouvement brownien rapide, donc l'intensité mesurée va subir des fluctuations rapides. A l'inverse, de grandes NPs vont avoir un mouvement brownien plus lent, et l'intensité mesurée va évoluer avec des temps caractéristiques plus grands.

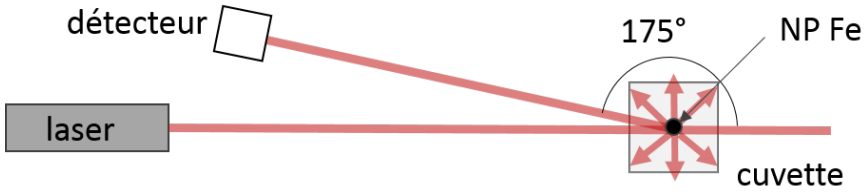


Figure B.2 – *Set-up de mesure de la taille d'une NP avec le Zetasiser Nano ZS. Figure adaptée du manuel du ZetaSizer Nano ZS, Malvern.*

L'intensité est donc enregistrée sur une durée définie (par exemple, 80 secondes dans notre cas). Suite à cela, la fonction d'autocorrélation en temps de l'intensité mesurée est calculée. Cela signifie, en d'autres termes, que l'on va regarder si le signal à l'instant t est similaire à celui de l'instant t + 1, puis à l'instant t + 2, et ainsi de suite. Comme le montre la courbe Fig. B.3, cette fonction d'autocorrélation est décroissante. En effet, la figure de diffraction évolue peu pendant les premiers instants : les particules sont encore proches des positions d'origine, donc l'intensité enregistrée n'évolue presque pas. Puis, au cours du temps, les particules bougent et l'intensité lumineuse qu'elles ré-émettent change petit à petit. Le signal enregistré devient donc de plus en plus "différent" de celui enregistré initialement : le coefficient de corrélation diminue.

On modélise la fonction de corrélation avec l'expression suivante :

$G(\tau) = B + A\sum(\exp(-2q^2D\tau))$

qui contient le coefficient D à introduire dans l'équation de Stokes-Einstein. Pour obtenir la valeur de ce coefficient D, et donc la taille des NPs, la fonction de corrélation est ajustée avec un algorithme approprié (d'après le Manuel du Zetasizer Nano ZS). Ensuite, deux méthodes d'analyse sont réalisées, permettant toutes deux de donner des informations différentes sur la taille des NPs (Fig. B.4) :

Première solution : "Cumulants analysis" : l'*analyse des cumulants*[1] donne la taille

1. En quelques mots, la fonction d'autocorrélation champ-champ (déduite de la fonction d'autocorrélation intensité-intensité) et son logarithme sont reliées à des fonctions caractéristiques de statistique : la génératrice des moments et la fonction caractéristique [Fris 01], d'où sont déduites l'espérance et la variance, menant à la mesure de la taille moyenne et de l'indice de polydispersion.

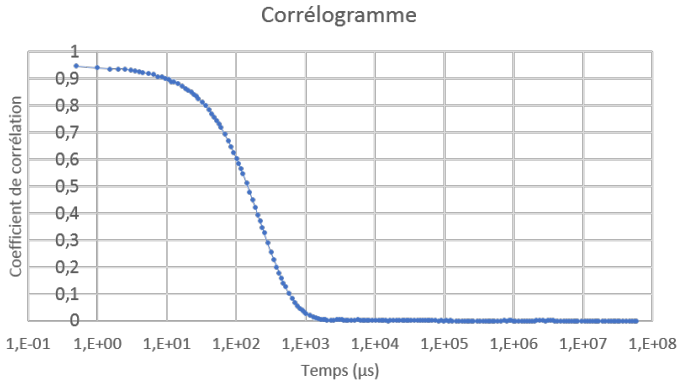


Figure B.3 – *Exemple de courbe de corrélation. Le coefficient de corrélation devrait toujours décroître avec le temps. S'il ne décroit pas, comme c'est le cas à la fin de l'enregistrement par exemple, c'est le signe que d'autres phénomènes interviennent comme la sédimentation ou la convection (dans le cas où la température change au cours de l'expérience). Au début de l'enregistrement, le coefficient est stable. Le moment auquel le coefficient commence à décroître est indicateur de la taille moyenne des NPs. Le gradient de décroissance indique lui la polydispersité de l'échantillon.*

moyenne des particules en solution (**Z-average**) et une estimation de la largeur de la distribution (**indice de polydispersion**). L'indice de polydispersité est compris entre 0 et 1, 1 correspondant à une distribution trop large pour que la mesure Z-average ait un réel sens. Il est habituellement supérieur à 0.05 et compris entre 0.08 et 0.7)

Pour cette analyse, il suffit de connaître l'indice de réfraction et la viscosité du solvant. La taille moyenne mesurée est le diamètre "**pondéré en intensité**" dérivé de l'analyse des cumulants. Or, l'intensité lumineuse ré-émise par une grande molécule va être bien supérieure à celle d'une petite molécule. Considérons une solution contenant le même nombre de particules de 500 nm et 15 nm. La variation de l'intensité lumineuse sera majoritairement due à la présence des particules de 500 nm, et la contribution des NPs de 15 nm sera moindre, bien qu'elles soient en nombre identique dans la solution. Cette mesure est donc très sensible à la présence d'agrégats et de contaminants larges (d'après le Manuel du ZetaSizer Nano ZS).

Deuxième solution : il existe aussi une autre analyse qui mène à l'obtention d'une **distribution de la taille des NPs**. Différents types d'algorithmes pour réaliser le fit sont disponibles dans le logiciels et sont fondés sur l'analyse des moindres carrés non linéaires. Il en découle trois distributions distinctes de la taille des NPs : pondérée en intensité, pondérée en volume ou pondérée en nombre (comme on peut le voir sur la figure B.4).

La première, la distribution pondérée en **intensité**, est le premier résultat que l'on obtient d'une mesure DLS. Cette mesure est basée sur l'intensité de la lumière diffusée par les particules. Comme expliqué précédemment, cette mesure est sensible à la présence de grosses particules, d'agrégats ou de poussière. Pour cette analyse, il suffit de connaître l'indice de réfraction et la viscosité du solvant.

Pour passer de la distribution en intensité aux distributions pondérées **en volume ou en nombre**, il faut vérifier les hypothèses suivantes : les particules sont sphériques, toutes les particules ont une densité homogène et équivalente, les propriétés optiques des NPs sont connues (absorption, indice de réfraction).

Ces algorithmes sont basés sur la modélisation du phénomène physique de diffusion.

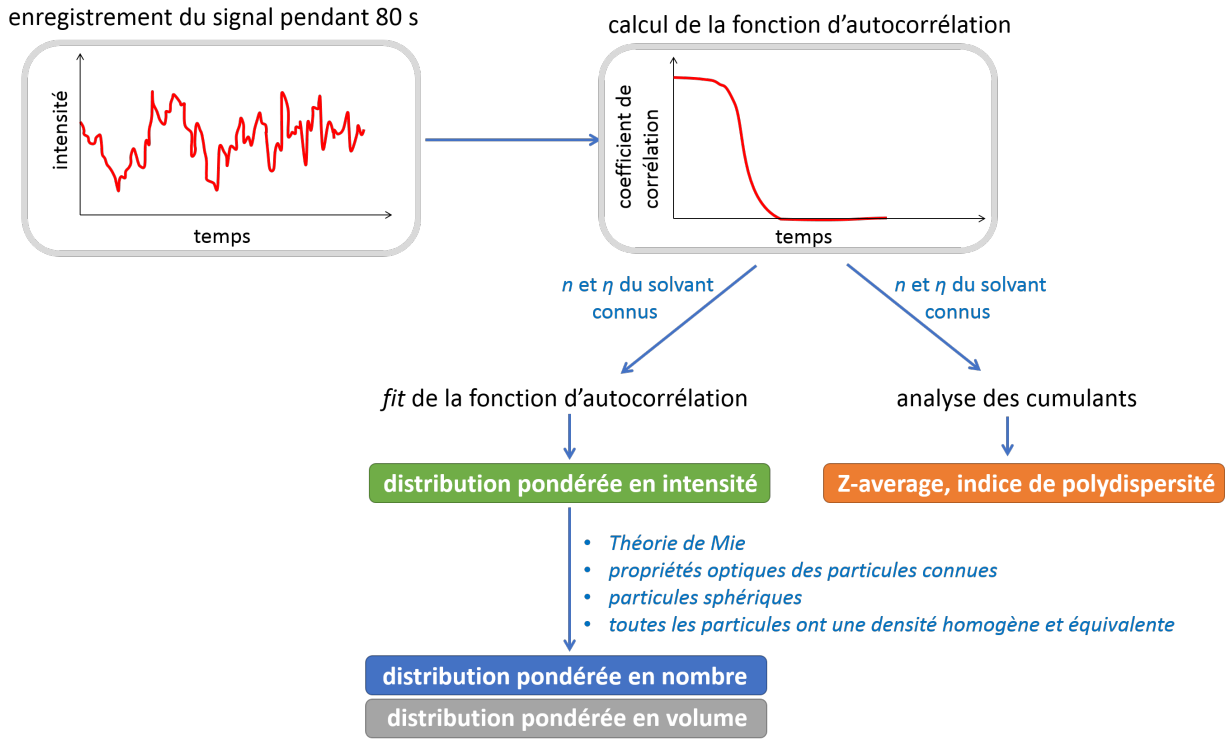


Figure B.4 – *Principe de fonctionnement de l'analyse par DLS. Les hypothèses effectuées pour chaque mesure sont indiquées en italique. Schéma explicatif d'après les explications du manuel du Zetasizer Nano ZS.*

Pour les petites particules, c'est-à-dire celles qui mesurent moins d'un dixième de la longueur d'onde du laser (633 nm pour le laser He-Ne du Zetasizer, donc des particules de moins de 60 nm), la diffusion produite est isotropique et l'intensité de la lumière produite est proportionnelle à d^6 où d est le diamètre de la particule. C'est la **théorie de Rayleigh**. Mais dans le cas où les particules sont plus grandes, la diffusion n'est plus isotrope. La **théorie de Mie** indique dans quelles directions la diffusion de la lumière sera la plus intense (par exemple, un lobe plus intense dans la direction de l'onde incidente). Elle décrit exactement comment les particules sphériques de toutes tailles et toutes propriétés optiques diffusent la lumière. Par défaut, le Zetasizer NanoZS utilise la théorie de Mie pour convertir la distribution de taille pondérées en intensité en distributions pondérées en volume et en nombre.

Limites : les mouvements autres que le mouvement brownien, comme la sédimentation et les courants de convections faussent les mesures. Il faut donc que la température soit bien maîtrisée. De plus, la taille hydrodynamique peut être modifiée en fonction du type et de la concentration des ions dans le milieu. Enfin, **la DLS tend à surestimer la largeur des pics dans la distribution** et cet effet peut être encore renforcé pour la transformation en volume ou en nombre. Selon le constructeur, les distributions en volume et en nombre devraient seulement être utilisées pour estimer la quantité relative de matériel dans chaque pic séparé, car les valeurs moyennes de la taille des pics et particulièrement leurs largeurs sont moins fiables.

B.1.3 Mesure de la concentration par tomographie X synchrotron

La concentration de NPs, en mg (Fe)/mL, a été mesurée grâce au set up de tomographie X-synchrotron (ID-17). Plusieurs tubes Eppendorf contenant chacun un échantillon de solution mère de NPs Fe ont été imagés par tomographie synchrotron.

Le coefficient d'atténuation massique (μ/ρ) (en cm^2/g) pour un matériau est relié aux coefficients d'atténuation massique pour chaque composé M_i par la relation suivante [Taup 13] :

$$(\mu/\rho)_{mix} = \sum_{i=1}^{n} (\mu/\rho)_{M_i} \cdot \frac{m_{M_i}}{m_{tot}} \tag{B.1}$$

avec m_{M_i} la masse du composé M_i et m_{tot} la masse totale du mélange.

Les coefficients d'atténuation linéiques μ (en cm^{-1}) sont aussi liés par une équation similaire :

$$\mu_{mix} = \sum_{i=1}^{n} \mu_{M_i} \cdot \frac{v_{M_i}}{v_{tot}} = \sum_{i=1}^{n} \mu_{M_i} \cdot f_{M_i} \tag{B.2}$$

v_{M_i} étant le volume du composé M_i et v_{tot} étant le volume du mélange. f_{M_i} est la fraction volumique du composé M_i.

Le coefficient d'atténuation linéique peut être mesuré directement sur une image de tomographie enregistrée avec un faisceau mono-énergétique.

De plus, si l'hypothèse d'un mélange "idéal" (mélange pour lequel les propriétés de chaque composé est conservée) est vérifié, une deuxième équation peut être écrite :

$$\sum_{i=1}^{n} f_{M_i} = 1 \tag{B.3}$$

Dans notre cas, le mélange est composé d'eau et de fer et est supposé parfait. Les coefficients d'atténuation linéiques pour chaque composé sont connus et listés en fonction de l'énergie d'irradiation dans le site du NIST. D'où le système à résoudre :

$$\begin{cases} \mu_{mix} = \mu_{eau} \cdot f_{eau} + \mu_{Fe} \cdot f_{Fe} \\ f_{Fe} + f_{eau} = 1 \end{cases} \tag{B.4}$$

Connaissant μ_{mix} et les coefficients d'atténuation linéiques Le système est résolu pour trouver f_{Fe} et f_{eau}. Ensuite, il est possible de trouver la concentration de fer C_{Fe} comme $C_{Fe} = m_{Fe}/v_{tot} = (v_{Fe}/v_{tot}) \cdot (m_{Fe}/v_{Fe}) = f_{Fe} \cdot \rho_{Fe}$.

De plus, comme l'atténuation massique des coefficients dépend de l'énergie, il pourrait être possible d'éviter de faire l'hypothèse du mélange parfait si deux énergies étaient utilisés pour enregistrer deux images. On aurait alors un système avec deux équations similaires à la première, avec un μ_{mix} pour chaque énergie d'irradiation.

B.1.4 Sonication

Après avoir allumé la station (VCX 750, Sonics & Materials, Inc.) et attendu que la température de l'eau circulant dans le circuit atteigne 4°, un tube Falcon de 15 mL contenant 2 mL de solution

mère de NPs Fe est fixé de telle manière à maintenir le culot du tube au plus profond de la cupule de sonication (sans la toucher). La sonication est ensuite démarrée. Le protocole utilisé dans les expériences consiste à soniquer les NPs pendant 15 min à 600 W (fréquence : 20 kHz). Le refroidissement des NPs est crucial car la sonication mène à la production de chaleur, qui elle-même favorise l'agrégation des NPs.

B.2 Culture cellulaire

Le passage maximal utilisé pour les cellules de lignées a été fixé à p+10 pour les macrophages et p+15 pour les cellules tumorales. Les cellules sont cultivées à 37°, 5% de CO_2 et d'environ 80 à 85 % humidité. Les milieux de culture utilisés selon les lignées sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Lignée	**Milieu utilisé**	**Ajout ?**	**Type de culture**	**Récupération** des cellules
F98	DMEM Glutamax	10% SVF et 5% PS	adhérentes	trypsine
9L	DMEM Glutamax Glutamax pyruvate+ pyruvate-	10% SVF et 5% PS	adhérentes	trypsine
C6	DMEM Glutamax	10% SVF et 5% PS	adhérentes	trypsine
L929	DMEM Glutamax Glutamax pyruvate+	10% SVF et 5% PS	adhérentes	trypsine
NR8383	DMEM Glutamax Glutamax pyruvate+	10% SVF et 5% PS	adhérentes	trypsine
CCL-46	Ham's F12K medium	L-glutamine, 10% SVF et 5% PS	adhérentes et suspension	grattoire
J774A.1	DMEM Glutamax Glutamax pyruvate+	10% SVF et 5% PS	suspension	-
RAW264.7	DMEM Glutamax Glutamax pyruvate+	10% SVF et 5% PS	adhérentes	grattoire
	DMEM Glutamax	10% SVF et 5% PS	adhérentes et suspension	grattoire

B.2.1 Repiquage des cellules

Le milieu de culture est tout d'abord retiré de la flasque. Celle-ci est aussitôt rincée au PBS. Les cellules sont ensuite décollées de leur support, soit par ajout de trypsine (500 µL pour les T25, 2 mL pour les T75) suivi d'une incubation de 5 minutes à 37°, soit par "grattage" des cellules. Une fois les cellules en suspension, du milieu de culture complet est éventuellement ajouté, notamment dans le cas d'une utilisation de la trypsine (de façon à inactiver la trypsine). 20 µL de solution sont prélevés pour comptage sur un hématimètre de Neubauer. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm, puis reprises dans du milieu complet et ré-ensemencées dans de nouvelles boîtes de culture à la concentration désirée (dilution habituelle entre 1/3 et 1/6).

B.2.2 Congélation des cellules

Après avoir été décollées de leur support et mises en suspension, les cellules sont comptées puis centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm. Le culot est ensuite repris dans du milieu complet contenant

5 ou 10% de DMSO selon le type cellulaire (voir tableau ci-dessous), dans un volume permettant d'obtenir une concentration de 3 à 6 millions de cellules par mL. 1 mL de cette solution est alors transférée par cryotube. Les cryotubes sont placés dans une boîte Mr. Frosty contenant un volume suffisant d'alcool isopropylique 100%. Cette boîte est placée à -80°C pendant au moins 12h, puis les cryotubes sont transférés et conservés dans un dewar.

Lignée	% de DMSO dans le milieu de congélation
F98	10%
9L	10%
C6	10%
L929	10%
NR8383	5%
CD36	5%
J774A.1	5%
RAW264.7	5%

Table B.1 – *Conditions de congélation utilisées selon la lignée cellulaire.*

B.2.3 Décongélation des cellules

Le cryotube est décongelé au bain-marie à 37°et son contenu est aussitôt dilué dans 9 mL de milieu complet préchauffé à 37°. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. Le surnageant est retiré et le culot cellulaire est repris dans du milieu complet puis ensemencé dans une flasque de culture (adaptée au type cellulaire).

B.3 Etude de la survie cellulaire

B.3.1 Irradiation au générateur de rayons X

Après avoir ouvert le circuit de refroidissement, le générateur de rayons X est allumé et laissé pendant 30 minutes pour préchauffage. La dosimétrie est ensuite réalisée à l'aide de plaques de *solidwater* pour se placer dans des conditions les plus proches possibles des conditions de traitement. Une chambre d'ionisation est insérée dans l'une de ces plaques (chambre TW31010 S/N 03775 Nd,$W = 2.898 \cdot 10^8 Gy/C$). A titre d'exemple, la dernière dosimétrie donnée à 5 cm du plan de travail, pour une irradiation à 200 kVp / 20 mA, a donné le débit de dose de 2.24 Gy/minute.

B.3.2 Test ATP-lite

Les puits des plaques 96 puits à analyser sont vidés, puis remplis avec 100 µL de milieu complet neuf. 50 µL de tampon de lyse sont ensuite ajoutés par puits, et les plaques sont agitées pendant 5 minutes. 50 µL de substrat sont ensuite ajoutés, puis les plaques à nouveau agitées pendant 5 minutes à l'abris de la lumière. Les plaques sont ensuite stockées pendant 10 minutes dans le noir, puis la luminescence de chaque puits est lue au lecteur de plaques pendant 1 seconde. Le kit utilisé est le kit ATPlite de Perkin Elmer.

B.3.3 Test MTT

B.3.3.1 Solution de MTT

Pour préparer 50 mL de solution stock de MTT, 250 mg de poudre (M5655-1G, Sigma Aldrich) sont pesés et dissous dans 50 mL de PBS. La solution est vortexée pendant 2 minutes puis agitée pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur de plaques. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue et d'une membrane de 20 µm et aliquotée. Les aliquots sont ensuite conservés à -20°et peuvent être décongelés jusqu'à trois fois.

B.3.3.2 Test MTT pour un temps de mesure

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits deux jours avant l'expérience. Celles-ci sont traitées la veille et exposées aux NPs pendant 24h. Pour réaliser la mesure, le milieu des puits de plaques 96 puits est totalement retiré (pipette multicanaux) et les puits sont rincées deux fois au PBS. 150 µL de solution de MTT à 0.5% sont ajoutés par puits, et les plaques sont incubées pendant 3h à l'incubateur. Une fois ce délai écoulé, le MTT est totalement retiré des plaques et les cellules sont rincées une fois au PBS. Finalement, 150 µL de DMSO (D5879, Sigma Aldrich) sont ajoutés par puits, et le tout est incubé 45 minutes à l'incubateur. Il est aussi possible de laisser les plaques à température ambiante sur un agitateur de plaques pendant une heure. L'absorbance des puits est ensuite mesurée à 560 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Victor X4, Perkin Elmer).

B.3.3.3 Suivi MTT sur 10 jours

Le test MTT décrit précédemment est réalisé chaque jour pour une des dix colonnes de chaque plaque 96 puits. Les puits périphériques (colonnes 1 et 12 et lignes A à H) sont remplis de PBS et cette opération sera répétée plusieurs fois au cours du suivi sur 10 pour compenser l'évaporation. Le DMSO est incubé pendant 45 minutes à l'incubateur pour éviter de stresser les autres cellules de la plaque. L'absorbance est mesurée au lecteur de plaque sans couvercle (la formation de buée perturbe la lecture des puits). Un grand soin est apporté pour éviter la contamination du milieu de culture. Les puits contenant du DMSO et du MTT sont ensuite vidés et remplis par du PBS. Les plaques sont enfin remises à l'incubateur. Le milieu de culture des cellules n'est jamais changé au cours des expériences.

B.3.4 Impact de l'exposition des NPs Fe sur les cellules

B.3.5 *Live cell imaging*

Des cellules de gliome F98 sont cultivées dans 500 µL de milieu de culture dans chacun des quatre quadrants d'une flasque de culture CellView 35mm dont le fond est en verre. Avant qu'elles atteignent 50% de confluence, la flasque est imagée au microscope (Jean-Philippe Kléman, plateforme d'imagerie M4B, Institut de Biologie Structurelle, Grenoble) et des régions d'intérêt sont choisies. Le milieu de culture est alors remplacé par du nouveau milieu de culture avec (0.3 mg (Fe)/mL) ou sans NPs Fe. Immédiatement après, la région d'intérêt de chacun des deux quadrants étudiés est imagée toutes les 2s pendant 1h et toutes les minutes pendant 12 h. Les deux régions sont séparées de 3.6 mm. Un microscope IX81 (Olympus) est utilisé pour cette expérience, associé à un objectif 60x à huile. Les images sont enregistrées par une caméra Zyla sCMOS.

Il est essentiel de recréer des conditions stables pour enregistrer des images représentatives du déroulement de l'exposition des cellules aux NPs Fe dans l'incubateur. Pour cela, le microscope est équipé d'un caisson Okolab (voir figureB.5 pour le set-up). La température est maintenue à 37°C et la flasque est enfermée dans un compartiment plus petit où la concentration en CO_2 est régulée. Avant d'être envoyé dans le compartiment, le gaz est mené dans un bulleur pour assurer un taux d'humidité suffisant. Des expériences en amont ont permis de montrer que la lumière du microscope n'avait aucune influence sur les cellules.

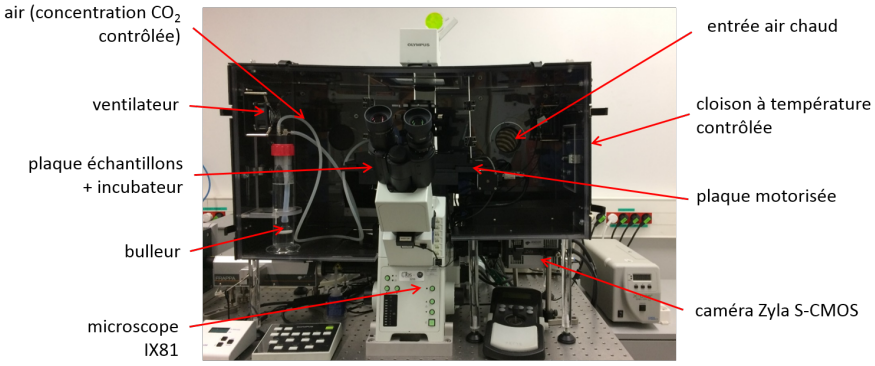


Figure B.5 – *Set-up de l'observation de la dynamique d'internalisation des NPs Fe par les cellules F98 en live imaging sur la plateforme M4D de l'IBS.*

B.3.6 Etude du cycle cellulaire

Principe :

Un cytomètre en flux est un instrument permettant de compter et trier des cellules selon leurs caractéristiques physiques ou le marquage fluorescent qu'elles possèdent (le cas échéant). Lors de l'analyse, les cellules défilent individuellement devant le faisceau d'un laser. Elles ré-émettent alors de la lumière, soit par diffusion, soit par fluorescence (notamment si elles ont été marquées au préalable par des composés fluorescents). Les cellules peuvent ensuite être classées dans plusieurs populations selon leurs propriétés (granulosité, taille, marquage fluorescent ou non, ...), et parfois triées selon la machine utilisée.

Nous avons utilisé la cytométrie en flux afin d'étudier l'influence des NPs Fe sur le cycle cellulaire. Pour cela, les cellules sont marquées à l'Iodure de Propidium (IP), un agent intercalant de l'ADN fluoresçant en rouge. En temps normal, les cellules sont réparties dans le cycle cellulaire selon la figure B.6. Les cellules en phase G1 viennent de se diviser : elles ont donc deux chromosomes homologues ("2n" sur la figure B.6). Les cellules en phase S répliquent leur ADN pour se préparer à la division : la quantité d'ADN présente dans la cellule est croissante, donc le marquage par l'IP s'intensifie. Les cellules en phases G2 et M contiennent deux fois l'information génétique initiale (donc "4n" sur la figure B.6). Le marquage par l'IP est donc deux fois plus intense qu'en phase G1.

Protocole :

Les cellules sont décollées de leur support, comptées et centrifugées. Les cellules sont fixées par ajout d'éthanol à -20°C en vortexant le mélange délicatement et en injectant l'éthanol goutte à

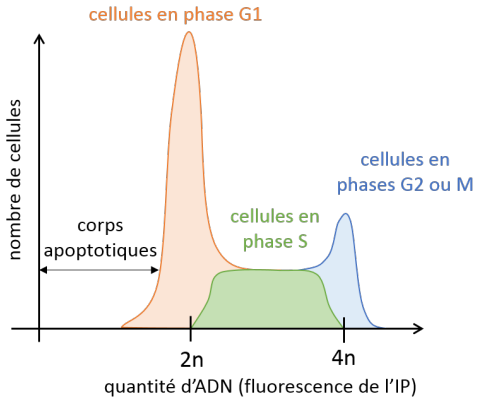


Figure B.6 – *Répartition usuelle des cellules dans le cycle cellulaire lors d'une mesure par cytométrie en flux.*

Produit	Fournisseur	Référence	Volume
ARNase	Thermofisher	PureLink 12091021	5 µL
EDTA (0.5 M)	Life Technologies AM9260G		500 µL
Iodure de Propidium	Sigma Aldrich	P4170	5 µL

goutte. Le nombre de cellules par échantillon doit être d'environ un million de cellules par réplicat (le FACS prend 20 000 cellules par échantillon pour obtenir une statistique suffisante). Les cellules sont ensuite conservées à -20°. A la sortie du congélateur, 12 mL de PBS (PBS-EDTA à 2 mM si les cellules sont adhérentes) sont ajoutés à chaque tube pour rinçage. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 1200 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé et les culots sont resuspendus dans 500 µL de PBS (PBS-EDTA si les cellules sont adhérentes) avec 5 µL d'iodure de propidium et 5 µL d'ARNase. Les tubes sont ensuite incubés pendant 30 minutes puis analysés par cytométrie en flux (plateforme de BIG, CEA Grenoble, FACSCalibur).

B.4 Mesures de la masse de fer internalisée par ICP-MS

Principe

Principe : l'ICP-MS, ou spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (en anglais : *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), est une technique d'analyse permettant de mesurer avec précision la concentration d'un élément métallique (ou, plus rarement, non métallique) dans un échantillon. Lors de l'analyse, l'échantillon est ionisé par une torche à plasma. Les atomes de l'échantillon sont alors séparés les uns des autres et se retrouvent sous forme d'ions composant un fluide désordonné. Le spectromètre sépare ensuite ces ions en fonction de leur rapport masse/charge, ce qui permet de remonter à la nature de l'élément et ainsi de quantifier les éléments à étudier.

Protocole : nous utilisons cette méthode pour mesurer la masse de fer moyenne internalisée par les cellules. Pour ce faire, les cellules en culture sont exposées pendant 24h aux NPs Fe. Chaque condition est répétée en triplicat. Après ce temps d'incubation, les cellules sont rincées deux fois au PBS, trypsinées et pour chaque réplicat. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les culots secs sont congelés. La seconde étape se passe au CHU de Grenoble, en collaboration avec Josiane Arnaud, Benoît Chovelon et Dominique André. Les échantillons sont minéralisés dans 500

µL d'acide nitrique puis sont analysés par l'ICP-MS. La mesure obtenue est une concentration de fer par échantillon. Connaissant le nombre de cellules par échantillon et le volume de minéralisation, il est alors possible de remonter à une masse de fer moyenne par cellule.

Protocole

Le protocole d'ICP-MS se déroule sur trois jours. Le premier jour, les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits (prévoir 3 puits par condition et 3 puits contrôle). Pour les F98, 250 000 cellules / puits sont ensemencées dans 3 mL de milieu, ou 500 000 cellules / puits dans 3 mL de milieu pour être à environ 80% de confluence le lendemain. Le deuxième jour, le milieu est retiré des puits et remplacé par du milieu complet avec ou sans NPs. 24h après, le milieu est retiré des puits et les cellules sont rincées deux fois au PBS puis décollées de leur support (500 µL de trypsine puis ajout de 800 µL de milieu complet ou "grattage" dans 1.3 mL de milieu). Après avoir homogénéisé la solution, 1 mL de solution de cellules en suspension est prélevé et injecté dans un tube Eppendorf. 20 µmL de la solution restante dans le puits sont prélevés pour comptage sur deux "croix" d'un hématimètre de Naubauer (comptage de 10 "carrés" au total). Les tubes Eppendorf sont centrifugés puis verticalisés délicatement de manière à vider le surnageant. Sans les retourner, les tubes sont posés à l'envers sur un papier absorbant. Une fois la totalité du liquide absorbé, les tubes sont retournés à l'endroit et fermés. Les échantillons sont conservés à -20°.

Les échantillons sont ensuite traités au CHU de Grenoble (collaboration J. Arnaud, B. Chovelon, R. André). 500 µL d'acide nitrique sont ajoutés aux culots secs pour minéralisation pendant une dizaine d'heures. Après minéralisation, le minéralisat est dilué au 1/100 dans de l'eau contenant du Ga (étalon interne à 620 nmol/L). S'il s'avère nécessaire de diluer plus, une dilution supplémentaire est réalisée dans de l'acide nitrique 1% (contenant du Ga à 620 nmol/l). Le débit d'introduction de l'échantillon est fixé à 1 mL/min ±0.2. La chambre et le nébuliseur sont standards. L'ionisation est réalisée dans un plasma d'argon (débit 13 L/min). Les interférences polyatomiques sont éliminées dans une cellule de collision (hexapole) avec un mélange H_2-He (7-93) (débit 3.5 ± 1 mL/min). Trois mesures successives du nombre d'impact aux masses 56 (Fe) et 71 (Ga) sont alors réalisées. La transformation en concentration est réalisée à l'aide d'un étalonnage de travail dans un mélange d'acide nitrique et d'un étalon interne (0-200-1000 et 2000 nmol/L de fer).

Les limites de détection de l'ICP-MS sont :
- pour le fer : 10.2 nmol/L,
- pour le zinc : 15.5 nmol/L,
- pour le cuivre : 32.7 nmol/L.

La précision varie avec la concentration et la matrice. Dans l'eau, elle est de :
- 1% pour le fer à 45 nmol/L et de 0.2% à 270 nmol/L (n=6 séries indépendantes),
- 4.9% pour le Zn à 125 nmol/L et de 1.3% à 1000 nmol/L (n=6 séries),
- 1.3% pour le Cu à 120 nmol/L et de 0.4% à 480 nmol/L (n=6 séries).

B.5 Echantillons pour imagerie

B.5.1 Imagerie SR-XRF sur la ligne ID-16

Principe et analyse des résultats

La SR-XRF (*Synchotron Radiation X-Ray Fluorescence Spectrometry*, ou spectrométrie de fluorescence de rayons X, est une méthode non destructive permettant de connaître la répartition de chaque élément dans un échantillon. Elle est réalisée sur la ligne ID-16 de l'ESRF en collaboration avec Sylvain Bohic et Murielle Salome.

L'analyse de l'échantillon consiste à scanner une cellule "pixel par pixel" aux rayons X (Fig. B.7). Les éléments présents dans ce pixel peuvent absorber les rayons X et émettre un photon de fluorescence lors de la relaxation. Ces photons de fluorescence ont une énergie propre à l'élément et sont émis de manière isotrope. Les quatre détecteurs de fluorescence détectent les photons émis par les éléments du pixel irradié. Chaque pixel de l'image contient donc l'information sur le nombre de photons de fluorescence émis à chaque énergie (spectre des photons de fluorescence). L'énergie des photons de fluorescence étant spécifique de l'élément, on peut en déduire la contribution de chaque élément au spectre de fluorescence : la taille du pic à chaque énergie caractéristique permet de déterminer si cet élément est présent ou non dans le pixel, et en quelle quantité.

Les données sont ensuite interprétées par un code créé à l'ESRF, PyMca, basé sur la méthode des moindres carrés non linéaires [Biss 16]. Ce code permet de retirer du spectre la contribution du bruit de fond et facilite notamment l'analyse en cas de pics qui se chevauchent. Ainsi, la déconvolution mathématique du spectre de fluorescence indique la composition chimique de chaque "pixel" de l'échantillon : il est donc possible d'en déduire une carte quantitative de la distribution d'un élément donné. Enfin, ces données sont normalisées par le flux de photons, variant d'un pixel à l'autre au cours de l'expérience et enregistré tout au long de l'imagerie par une diode.

Ainsi, la carte obtenue après ces étapes est une carte en g(élément)/g(cellule) de chaque élément. Il est possible d'en extraire la masse de l'élément présente dans la partie imagée de la cellule : pour cela, il faut convertir les g(élément)/g(cellule) en concentration surfacique en g(élément)/cm^2(échantillon). Il ne reste plus qu'à intégrer cette concentration surfacique sur l'aire de la cellule pour obtenir une masse totale de l'élément par cellule. Pour réaliser la conversion, nous posons l'hypothèse que la cellule est assimilable à de l'eau et que l'on connaît l'épaisseur de la cellule à chaque pixel.

Remarques :

- le résultat exact issu des données brutes est en réalité la concentration surfacique (en g/cm^2). Cependant, le *fit* avec PyMCa réalise automatiquement la conversion en g(élément)/g(cellule).
- l'épaisseur de la cellule n'est en réalité pas connue à chaque pixel. Cette mesure n'est réalisée qu'une fois pour un pixel et est appliquée ensuite à la cellule entière.

Protocole : le support des échantillons sont des membranes dont le cadre est en silicium, identiques à celles de la figure B.8. Les membranes sont stérilisées, *coatées* à la poly-L-lysine, rincées et mises à sécher pendant la nuit. Le lendemain, les membranes sont placées dans des plaques 48 puits (ou idéalement dans des plaques 4 puits). Les cellules sont ensuite déposées sur la membrane dans 10 µL de milieu complet puis incubées 20 minutes à 37°. Le nombre de cellules est à déterminer selon la lignée lors d'expériences préliminaires. Une fois les 20 minutes écoulées, les puits sont remplis délicatement avec du milieu complet. Après une nuit pendant laquelle les

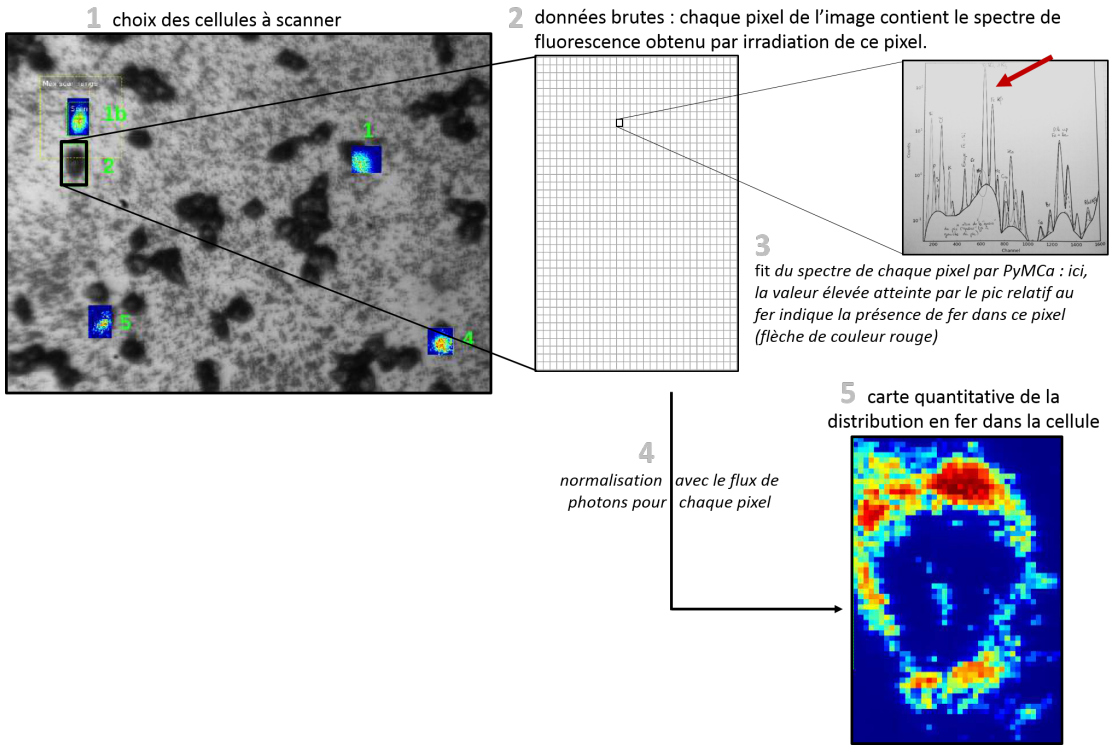


Figure B.7 – *Méthode d'analyse des échantillons par SR-XRF sur la ligne ID-16.*

cellules adhèrent au support, le milieu est changé pour un milieu contenant diverses concentrations de NPs. Une fois les 24h d'incubation achevées, les membranes sont rincées au PBS et les cellules sont fixées.

Choix de la fixation : les cellules peuvent être fixées soit chimiquement (PFA) puis lyophilisées, soit congelées. La congélation permet de mieux conserver les structures intra-cellulaires et les membranes, et donc potentiellement de mieux conserver les éléments qui se trouvent dans la cellule. Ainsi, les petites particules sont moins susceptibles de s'extraire des cellules en comparaison aux rinçages et aux temps de fixation au PFA.

Le protocole de préparation des échantillons est décrit en détail en annexe (B.5.1).

Avant l'expérience, les échantillons sont imagés au microscope pour réaliser des mosaïques de la surface de la membrane, afin de repérer par la suite les zones intéressantes à analyser. Le jour de l'expérience, les cellules à analyser sont d'abord imagées à faible résolution (taille d'un pixel : 400 nm, temps d'exposition de 100 ms par pixel). La zone à étudier est ensuite réduite au minimum, car les temps d'imagerie sont longs (de deux à cinq heures selon la taille de la cellule). Après avoir vérifié qu'il n'y avait pas de saturation du signal, l'acquisition de l'image fine est lancée. La résolution est alors de 50 nm avec une durée d'exposition de 50 ms par image.

Protocole

La préparation des échantillons pour l'imagerie sur ID-16 nécessite quatre jours de préparation.

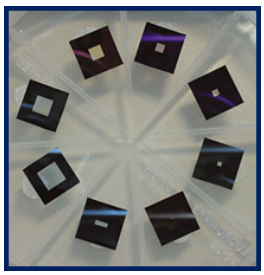


Figure B.8 – *Fixer les cellules sur des membranes spécifiques permet d'étudier la distribution élémentaire de ces échantillons sur la ligne ID-16.*

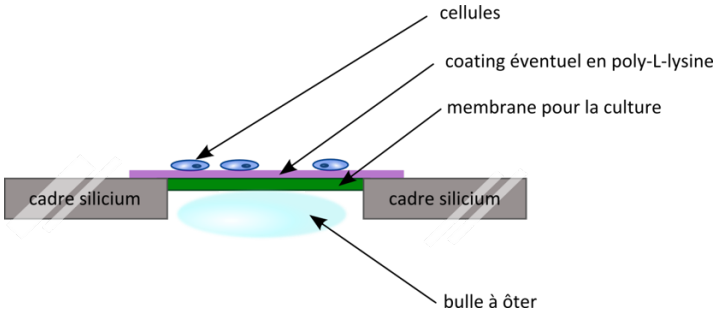


Figure B.9 – *Représentation schématique de la membrane utilisée pour les expériences sur ID16.*

Préparation des membranes : les membranes (Silton Ltd, Angleterre ; membrane Si_3N_4 de 1.5 x 1.5 mm et 500 nm d'épaisseur) sont préparées la veille de leur utilisation en culture cellulaire. Les membranes sont déposées dans une petite boîte de Pétri, côté "membrane" (côté plan) vers le haut. Elles sont stérilisées par une exposition de 20 minutes aux UVs sous le PSM. Le *coating* des membranes est ensuite réalisé : 10 µL de poly-L-lysine (Sigma, P4707 à conserver au frigo) sont déposés sur chaque membrane. Les membranes sont ensuite laissées pendant 20 minutes à l'incubateur. Une fois cette durée écoulée, les membranes sont rincées par trempe successive dans 3 puits d'une plaque 96 puits remplis par 200µL d'eau ultrapure ultratrace. Elles sont ensuite mises à sécher verticalement dans un puits vide de la plaque.

L'ensemencement des cellules est réalisé le lendemain, de préférence en fin de journée (environ 12h avant le traitement des cellules). Les membranes préparées la veille sont placées individuellement dans des puits de plaque 48 puits, face plane vers le haut. 10 µL de solution de cellules sont délicatement déposés sur chaque membrane. L'ordre de grandeur du nombre de cellules à ensemencer par membrane varie entre 3 000 et 12 000 cellules environ (à tester selon la lignée). A titre informatif, nous avons ensemencé 5000 cellules F98 diluées dans 10 µL de milieu complet. Les membranes sont ensuite placées à l'incubateur pendant 20 minutes maximum, puis 1 mL de milieu complet est ajouté par puits, en plaquant le tip de la pipette contre la paroi en plastique. Les membranes sont ensuite verticalisées dans les puits et la bulle d'air prisonnière sous la membrane est chassée avec la pince sans endommager la membrane. Finalement, la membrane est remise à l'horizontal et la plaque est placée à l'incubateur.

Le traitement des cellules est réalisé environ 12h après l'ensemencement des cellules. Le milieu des puits est retiré et remplacé par 1mL de milieu avec ou sans NPs.

Les cellules sont fixées après 24h de traitement aux NPs. Dans le cas d'une **fixation chimique**, le milieu est aspiré et les membranes sont rincées deux fois au PBS. Les cellules sont

fixées pendant 20 minutes dans du PFA ultratrace, puis rincées par trempe successive dans trois puits remplis de PBS et finalement un puits rempli d'eau ultrapure. Dans le cas d'une **fixation cryogénique**, les membranes sont rincées deux fois au PBS puis plongées pendant 5 secondes dans un bain d'Ammonium-Acétate 100 mM, ph=7.4. L'excès de tampon est ensuite drainé par un papier absorbant, de façon à n'en laisser qu'une fine couche sur l'échantillon. L'échantillon est ensuite vitrifié à -178°C par immersion dans l'éthane liquide à l'aide d'un cryoplongeur.

B.5.2 Localisation des NPs par TEM dans les cellules

Des cellules F98 sont ensemencées dans des puits de plaque 96 puits et incubées dans du milieu complet pendant 24h pour adhésion. Le lendemain, le milieu est changé par du milieu complet contenant diverses concentrations de NPs Fe. Les cellules sont exposées aux NPs pendant 24h, puis rincées deux fois au PBS et fixées dans 2.5% de glutaraldéhyde dilué dans une solution à 0.1 M de sodium-cacodylate au pH de 7.4.

Les échantillons sont ensuite traités par nos collaborateurs Werner Graber, Jean-Albert Laissue et Valentin Djonov de l'Institut d'Anatomie de l'Université de Berne. Les échantillons sont fixés par des bains successifs d'éthanol en concentration croissante. Les cellules sont ensuite cimentées avec de l'Epon, une résine utilisée dans la préparation des échantillons en microscopie électronique, dont la polymérisation est catalysée par la BDMA (N,N-Dimethylbenzylamine). Après trois jours de polymérisation à 60°C, des coupes de 1mm x 2mm x 1 µm sont réalisées dans les échantillons et observées au microscope optique avec un objectif 40x.

B.5.3 Coloration au Bleu de Prusse

Protocole pour une solution de coloration à 5% de ferrocyanure de potassium / 5% HCl.

Pour 12mL de solution de coloration :

Produit	Fournisseur	Ref	Volume (mL)	% final
Poudre Potassium hexacyanoferrate II Trihydrate (jaune)	Fluka Chemica		600 mg	5%
HCl 35%			1.71	5%
Eau distillée			10.29	

Préparation de la solution de coloration : la poudre est pesée puis diluée dans une solution d'acide chlorhydrique à 5%.

Coloration d'une coupe histologique ou de cellules sur lamelle de verre : les cellules cultivées sur les lamelles de verre sont rincées deux fois au PBS. Les lamelles sont laissées pendant toute la coloration dans les puits de plaque 6 puits. Les cellules ou les coupes sont fixées au PFA 4% / PBS 1X pendant 15 minutes. Après deux rinçages de 5 minutes au PBS, la solution de coloration est déposée sur les cellules/les coupes pendant 30 minutes à température ambiante. Après deux rinçages au PBS de 5 minutes, les cellules sont contre-colorées à l'éosine pendant quelques secondes puis rincées. Les lames de coupes histologiques sont ensuite montées au Vectashield. Les lamelles portant les cellules sont montées sur des lames en verre classiques avec une goutte de Vectashield (donc à l'envers).

B.6 Expérimentation animale

B.6.1 Modèle orthotopique de gliome

Les quantités de cellules et volumes correspondants utilisés lors de l'implantation sont décrits dans le tableau, suivant selon le modèle tumoral utilisé.

lignée	volume	quantité de cellules
9L	1 µL	10^4
F98	2.5 µL	5000
C6	5 µL	100 000

Préparation des cellules : les T25 dans lesquelles les cellules ont été cultivées sont rincées au PBS puis trypsinées. Après 5 minutes d'incubation à 37°C, du milieu de culture complet est ajouté et la solution de cellules en suspension est transférée dans un Falcon 50 mL puis diluée. 20 µL de solution sont prélevés pour comptage sur les deux côtés d'un hématimètre de Neubauer. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. Après centrifugation, le surnageant est complètement vidé, le culot est repris avec le bon volume de DMEM sans SVF et sans PS calculé d'après le comptage des cellules.

À l'animalerie : il est possible de garder le même lot de cellules pendant 1h. L'implantation des cellules de gliomes chez le rat est réalisée sous anesthésie kétamine/xylazine (64.5/5.4 mg/kg, injection intrapéritonéale) après induction de l'anesthésie par un mélange air/isoflurane (3%). Le crâne des animaux est ensuite rasé et les rats placés dans un cadre stéréotaxique à l'aide des barres d'oreille et de la barre d'incisives. Le crâne des animaux est désinfecté à l'alcool et la peau est incisée sur quelques millimètres selon le plan médian. Une craniotomie est réalisée 3.5 mm à droite du bregma. Avec avoir vortexé le Flacon contenant les cellules,celles-ci sont prélevées à l'aide d'une seringue Hamilton et l'aiguille est désinfectée à l'alcool. L'aiguille de la seringue Hamilton est alors descendue dans la boîte crânienne à 6 mm de profondeur puis remontée de 0.5 mm. Les cellules sont alors injectées (quantités décrites dans le tableau ci-dessus) à l'aide d'une pompe. Le trou est rebouché par de la cire à os, la plaie est désinfectée à la Bétadine puis refermée à l'aide de points de suture. Les animaux sont ensuite déposés dans une couveuse maintenue à 27°C.

B.6.2 Culture des macrophages primaires

Le rat donneur est anesthésié par un mélange air/isoflurane (3%), puis euthanasié par une injection intracardiaque de Dolethal. La peau au niveau des pattes arrière est incisée et les os sont récupérés. Après avoir aussitôt retiré les chaires, les os sont passés dans l'éthanol, rincés au PBS puis posés dans une boîte de Pétri remplie de DMEM. Les extrémités des os sont coupées, une aiguille est passée dans l'ouverture ainsi créée et le contenu des os est "flushé" à l'aide d'une seringue remplie de milieu de culture approprié, décrit dans le tableau suivant. Cette opération est répétée plusieurs fois par os pour en retirer un maximum de moëlle osseuse. Les cellules ainsi prélevées sont mises en culture pendant plusieurs jours selon le stade de différenciation désiré.

Produit	Fournisseur	Ref	Volume (mL)	% final
surnageant L929	-	-	100	20
Serum de cheval décomplémenté	Life Technologies	16050-122	25	5
SVF décomplémenté	Life Technologies	10270-106	50	10
L-glutamine (200 mM)	Life Technologies	25030-081	5	1
Pyruvate de sodium 100 mM	Life Technologies	11360-070	5	1
DMEM Glutamax	Life Technologies	31966-047	315	

B.6.3 Coloration des macrophages primaires

B.6.3.1 Billes

55 µL de solution de billes (Sigma Aldrich, L4655-1ML *Latex beads, carboxylate-modified polyester, fluorescent yellow-green*) sont préincubés avec 12.5 mL de PBS et 12.5 mL de SVF pendant 30 minutes à 37°C. 100 µL de cette solution sont ensuite ajoutés aux flasques de culture pour 1 mL de milieu de culture (par exemple, 2.5 mL de solution seront ajoutés par flasque contenant 25 mL de milieu de culture). Les macrophages sont ainsi incubés pendant 4 h à 37°C. Une fois le temps écoulé, le milieu de culture et les billes sont éliminés et les flasques sont rincées au PBS. Les cellules sont ensuite mises en suspension et rincées par deux séries de centrifugation (5 min, 1500 rpm) - rinçage au PBS.

B.6.3.2 Hoechst

Pour colorer 68 millions de cellules (à adapter en fonction du nombre de cellules à colorer) : les cellules sont détachées de leur support, comptées et centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm. Le culot est ensuite resuspendu de manière à obtenir une solution de 68 millions de cellules / mL. 1 mL de cette solution est prélevé et transféré dans un tube Falcon 15. 6.8 µL de Hoechst 33342 à 10 mg/mL (1pg/cellule) sont ajoutés au mL. Le tube Falcon est aussitôt entouré de papier aluminium et l'ensemble est incubé au bain marie à 37°pendant 20 minutes. Une fois le temps écoulé, les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 1400 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans 20 mL de PBS de manière à rincer le colorant en excès. Les cellules sont à nouveau centrifugées pendant 5 minutes à 1400 rpm. Cette opération de rinçage est répétée une fois, puis le surnageant est éliminé et la solution est resuspendue dans du PBS pour injection.

B.6.3.3 CFSE et DDAO

Le DDAO-SE (CellTrace Far Red DDAO-SE, C34553, Life Technologies) est stocké à -20°C à une concentration de 5 mM dans du DMSO. Pour la coloration, les cellules en suspension sont mises dans un tube Falcon (10^6 cellules/tube), lavées deux fois avec du PBS et resuspendues dans 1 mL de PBS. Le DDAO-SE est alors ajouté aux cellules pour une concentration finale de 10 µM. Les cellules sont ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C. Après ces 30 minutes d'incubation, 5 mL de milieu de culture sont ensuite ajoutés au tube et les cellules sont à nouveau incubées pendant 5 minutes à 37°C. Ensuite, les cellules sont lavées avec du PBS (ou du milieu de culture) et resuspendues dans du PBS ou du milieu de culture complet selon utilisation.

Le CFSE (CellTrace CFSE, C34554, Life Technologies) est stocké à -20°C à une concentration de 5 mM dans du DMSO après reconstitution (18µL pour un tube). 50 10^6 cellules en suspension sont mises dans un tube Falcon et centrifugées (5 min, 1500 rpm). Le surnageant est éliminé et le

culot est repris dans 10 mL de PBS. Cette opération est répétée une fois. Après avoir repris le culot dans 20 mL de PBS, 16 µL de colorant CFSE à 5 mM sont ajoutés et le tube est incubé pendant 30 minutes à 37°C. Après ces 30 minutes d'incubation, 20 mL de milieu complet sont ajoutés puis les cellules sont incubées à nouveau pendant 5 minutes à 37°C. Le tube est centrifugé et le culot est repris dans 10 mL de PBS. Il est à nouveau centrifugé puis repris dans du PBS ou du milieu complet selon utilisation.

B.6.3.4 FISH

Principe :

Le FISH (hybridation *in situ* en fluorescence, de l'anglais *Fluorescence In Situ Hybridization*) permet de reconnaître et détecter une séquence de nucléotides particulière sur l'ADN des cellules des coupes histologiques. Pour cela, très schématiquement, les deux brins d'ADN des coupes à analyser sont séparés l'un de l'autre en chauffant l'échantillon. Par ailleurs, le FISH fait intervenir une "sonde", c'est à dire un brin d'ADN contenant la séquence recherchée dans lequel sont incorporés des marqueurs fluorescents. Une fois les brins d'ADN des coupes dissociés, les sondes sont déposées sur les échantillons : elles viennent aussitôt s'apparier sur les séquences complémentaires, donc sur la séquence cible recherchée. Les coupes sont ensuite observées au microscope à fluorescence. Une première étape est souvent ajoutée : les coupes à analyser sont exposées à une enzyme protéase qui digère les protéines de façon à améliorer la pénétration de la sonde.

L'application de cette méthode à la détection de Mo/Ma injectés dans les tissus est adaptée d'un article de la littérature [Roge 10]. Cette stratégie repose sur le constat que l'utilisation de colorants, qu'ils soient membranaires, cytoplasmiques ou sous forme de billes, engendre le risque de modifier le comportement des cellules. L'idéal serait donc d'utiliser des Mo/Ma non colorés, tout en pouvant les repérer lors de l'analyse des coupes. Pour cela, la méthode FISH est un bon candidat car elle permet de marquer les chromosomes Y dans les cellules. La logique est donc la suivante : des Mo/Ma de rats mâles (donc porteurs de chromosomes Y) sont injectés par voie intraveineuse à des rattes, dont les cellules sont dépourvues de chromosome Y. Après prélèvement du cerveau, les coupes sont traitées par la méthode FISH dans le but de retrouver des cellules porteuses du chromosome Y dans le cerveau de rat femelle, signe qu'il s'agit d'un des Mo/Ma injectés ayant migré.

Cette stratégie est limitée par le génome anormal des cellules tumorales 9L. Ces cellules comportent en général au moins un chromosome Y et même parfois plusieurs chromosomes Y. De façon à différencier les Mo/Ma injectés des cellules tumorales, un immunomarquage spécifique des macrophages avec ED1 [2] sera aussi réalisé sur les coupes.

L'étude du FISH comme solution pour repérer les Mo/Ma injectés a été faite en partenariat avec Françoise Ceccaldi et Nelly Magnat (CHU, Grenoble). Le protocole précis utilisé est disponible en annexe (B.6.3.4).

Protocole :

La méthode du FISH a été utilisée pour marquer le chromosome Y sur des coupes congelées 10 µm de cerveau de rat. Le protocole a été développé par Mélanie Flaender.

Après fixation au méthanol/acide acétique (3/1) pendant 30 min à 4°C, les coupes sont déshydratés par des bains successifs de 2 minutes dans l'éthanol à 70%, 80% puis 100%. Les coupes sont ensuite

2. ED1 est l'anticorps monoclonal le plus utilisé pour marquer la protéine CD68 chez le rat. Cette dernière est exprimée particulièrement par les monocytes et les macrophages.

mises à sécher.

Les étapes suivantes concernent la digestion par la protéase. Après avoir immergé les lames pendant 30 minutes dans la solution de Protéase (Abbott) à 37°C (± 1°C), les lames sont plongées pendant 1 minute dans l'eau osmosée puis cinq minutes dans deux bains de 2X SSC. Les lames sont ensuite passées dans un bain propre d'eau osmosée.

L'étape suivante est l'étape d'hybridation. Tout d'abord, les lames sont déshydratées dans trois bains distincts d'éthanol absolu pendant 1 minute à chaque fois. Les lames sont mises à sécher sur l'hybridizer à 37°C. 10µl de solution contenant la sonde (3µL de sonde et 7µL de tampon d'hybridation Interchim/EmpireGenomics) sont déposés par coupe. Les coupes sont ensuite recouvertes par une lamelle et scellées avec du Ruber Cement. Les lames sont placées dans l'hybridizer et le programme de dénaturation et hybridation est lancé (69°C pendant 16h).

Finalement, les lames sont lavées avec une solution de 2X SSC / 0,3% NP 40 au cours d'une série d'étapes. Le Rubber Cement est retiré et les lames sont plongées entre 2 et 5 minutes dans du 2X SSC à température ambiante. La lamelle est doucement décollée de la lame. Les lames sont ensuite plongée 5 minutes dans la solution de rinçage 2X SSC / 0,3% NP40 préchauffée à 73°C, puis 5 minutes dans la solution de rinçage 2X SSC / 0,3% NP40 à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées dans de l'eau osmosée pendant 1 minute, puis déshydratées dans trois bains distincts d'éthanol absolu pendant 1 minute à chaque fois. Les lames sont ensuite mises à sécher sur l'hybridizer à 37°C, puis montées au DAPI/Vectashield.

B.6.4 Ouverture de la BHE par ultrasons

B.6.4.1 Préparation des microbulles :

500 µL de tampon HEPES à 10 mM sont injectés dans un flacon étanche contenant un lyophilisat de liposomes à l'aide d'une aiguille 26G. La seringue est retirée en laissant l'aiguille en place à travers la membrane, pour laisser le gaz contenu dans le flacon s'échapper. Une fois l'opération terminée, l'aiguille est retirée, la solution est homogénéisée doucement. Le flacon est ensuite agité pendant 45s, puis laissé 5 minutes à reposer.

B.6.4.2 Ouverture par de la BHE :

après reconstitution des microbulles, le rat est anesthésié avec un mélange air/isoflurane. Le rat est rasé sur le dessus de la tête et épilé, puis du gel hydrosoluble (utilisé en routine à l'hôpital pour les échographies) est déposé sur la peau à nue. 80 µL de tampon HEPES et 20 µL de solution de microbulles sont mélangés dans une seringue de 1mL. Le rat est ensuite placé dans un berceau adapté et la plateforme est montée jusqu'au contact avec la membrane soutenant l'eau qui conduit les ultrasons. La seringue est déposée dans le pousse-seringue et connectée au cathéter du rat dans la veine de la queue. Les microbulles sont injectées pendant 5 secondes, suivies par l'injection de 200 µL de NaCl. 15 secondes après l'injection des microbulles, les ultrasons sont déclenchés pendant 1 minute. 900 µL de solution de nanoparticules de Fer (à la main) sont éventuellement injectés dès l'arrêt des ultrasons pendant 20 s, toujours dans la veine de la queue, puis rincés avec 500 µL de sérum physiologique. Finalement, 180 µL de Dotarem sont aussi injectés et le rat est aussitôt préparé pour l'imagerie IRM (séquences T2, T2*, T1 axial et coronal, angiographie). Après les séquences IRM, le rat est euthanasié et le cerveau est prélevé puis congelé pour analyses histologiques.

Résumé

Les techniques actuellement disponibles pour le traitement des gliomes de haut grade sont principalement palliatives et permettent d'augmenter la survie des patients de quelques mois seulement. Une approche thérapeutique innovante pour augmenter le ciblage des dommages induits par la radiothérapie aux cellules tumorales consiste à utiliser l'interaction entre les rayons X et un composé préalablement délivré à la tumeur. Ce composé contient des éléments de numéro atomique élevé qui peuvent être « photo-activés ». Une fois excités par le rayonnement X, ils génèrent des électrons secondaires qui déposent leur énergie dans leur proche environnement. Cela conduit à une augmentation locale de la dose reçue par les cellules tumorales.

La réussite de cette stratégie thérapeutique dépend en particulier de l'obtention d'une concentration suffisante d'éléments « photo-activables » dans la tumeur par rapport au tissu sain et d'un recouvrement optimal de la tumeur par ces éléments. Les nanoparticules (NPs) font actuellement l'objet de nombreuses études car elles permettent de délivrer une grande quantité d'éléments lourds dans les cellules. Au cours de ces travaux de thèse, deux aspects de cette méthode ont été étudiés : tout d'abord, le potentiel des NPs d'oxyde de fer (NPs Fe_3O_4) comme agents « photo-activables » permettant d'augmenter localement la dose délivrée à la tumeur lors d'une irradiation aux rayons X monochromatiques a été testé. Le second aspect ouvre sur la question de la répartition des NPs dans la tumeur dans des modèles précliniques. Comment contourner la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) pour obtenir une distribution optimale des composés dans la tumeur et observer un effet thérapeutique significatif ?

Dans un premier temps, l'augmentation de dose théorique délivrée à la tumeur en fonction de la concentration en nanoparticules et de l'énergie d'irradiation a été simulée par méthode Monte-Carlo. De plus, l'effet thérapeutique de ces NPs Fe a été testé in vitro sur la lignée de glioblastome de rats F98. Nous avons ainsi montré que les F98 sont capables d'internaliser les NPs d'oxyde de fer : 20 ± 4 pg de fer par cellule après incubation pendant 24h à une concentration de 0.06 mg/mL de Fe dans le milieu de culture. Nous avons observé que les NPs Fe3O4 sont localisées dans des vacuoles cytoplasmiques. Dans ces conditions, la présence de NPs Fe3O4 dans les cellules a entrainé une augmentation de mort cellulaire d'un facteur 1.6 ± 0.4 pour une irradiation à 30 keV.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à une stratégie d'optimisation de la distribution des composés dans la tumeur reposant sur l'utilisation de cellules immunitaires, les macrophages. Reconnus pour leurs grandes capacités de phagocytose, les macrophages peuvent efficacement intérioriser les NPs et sont capables de migrer vers les sites tumoraux à travers la BHE. La méthode étudiée dans cette thèse comporte plusieurs étapes : les macrophages sont tout d'abord chargés de NPs in vitro. Ils sont ensuite injectés dans le sang et migrent dans la tumeur

en passant à travers la BHE tels des « Chevaux de Troie ». Nous avons montré que, dans les conditions expérimentales étudiées, seulement une petite fraction des monocytes/macrophages injectés en intraveineuse parvient à migrer dans la tumeur. De plus, injectés en intra-tumoral, les monocytes/macrophages ne se répartissent pas de façon homogène dans la tumeur. Les distributions de NPs obtenues par la méthode « Cheval de Troie » dans les conditions étudiées ne sont pas encore optimales, limitant ainsi les bénéfices thérapeutiques que l'on pourrait espérer lors de la radiothérapie. Enfin, une méthode d'ouverture locale et réversible de la BHE par ultrasons a été étudiée au cours d'études pilotes : les résultats sont encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives pour la distribution de composés thérapeutiques dans les gliomes.

Abstract

Currently available methods for the treatment of high-grade gliomas are mainly palliative and the patient survival is only increased by a few months. An innovative therapeutic approach to improve the targeting of radiotherapy-induced damage to tumor cells relies on the interaction between X-rays and a compound previously delivered to the tumor. This compound contains high atomic number elements that can be "photo-activated". Once excited by X-rays, they generate secondary electrons that deposit their energy in their nearest environment. This leads to a local increase of the dose received by the tumor cells.

The success of this therapeutic strategy particularly depends on two aspects : (i) obtaining a sufficient concentration of "photo-activable" elements in the tumor relative to the normal tissue, and (ii) getting an optimal covering of the tumor by these elements. Nanoparticles (NPs) are currently the subject of many studies because they allow to deliver a large amount of heavy elements into the cells. During this Ph.D. thesis, two aspects of this strategy were studied : firstly, the potential of iron oxide NPs (Fe3O4 NPs) as "photo-activable" agents able to locally increase the dose delivered to the tumor during monochromatic X-ray irradiation was tested. The second aspect raises the question of the distribution of NPs in the tumor in preclinical models. How can the Blood Brain Barrier (BBB) be circumvented, so that the distribution of compounds in the tumor is sufficient to observe a significant therapeutic effect ?

On the one hand, the theoretical dose increase delivered to the tumor as a function of the nanoparticle concentration and the irradiation energy was simulated by Monte Carlo algorithms (PENELOPE 2014). In addition, the therapeutic effect of these Fe NPs was tested in vitro on the F98 rat glioblastoma cell line. We have thus shown that these Fe NPs can be internalized by F98 : we measured 20 ± 4 µg iron per cell after a 24 hour-incubation at a concentration of 0.06 mg (Fe)/mL in the culture medium. We noticed that Fe_3O_4 NPs are mainly localized in cytoplasmic vacuoles. In these conditions, the presence of Fe3O4 NPs in the cells led to an increase in cell death of 1.6 ± 0.4 for an irradiation at 30 keV.

On the other hand, we focused on a strategy to optimize the compounds distribution in the tumor relying on the use of immune cells called macrophages. Macrophages are known for their high phagocytosis abilities and can efficiently internalize NPs and migrate to tumor sites across the BBB. This strategy involves several steps : first, macrophages are loaded with NPs in vitro. Then, they are injected into the blood circulation and migrate into the tumor crossing the BBB such as "Trojan horses". We have shown that, under the studied experimental conditions, only a small fraction of the monocytes/macrophages injected intravenously manages to reach the brain tumor. In addition, intratumoraly injected monocytes/macrophages do not distribute homogeneously in the tumor. The

NPs distributions obtained by the "Trojan Horse" method under the studied conditions are not yet optimal, thus limiting the therapeutic benefits that one could hope for during radiotherapy. Finally, a local and reversible opening of the BBB by ultrasound has been studied in pilot studies : the results are encouraging and open up new perspectives for the distribution of therapeutic compounds in glioma.

Table des figures

1.1 Description des cellules gliales associées aux systèmes nerveux central et périphérique. 18

1.2 Origine schématique des cellules gliales et des cellules tumorales qui en dérivent, d'après [Rowi 10, Gran 03]. 20

1.3 L'astrocyte établit un lien entre les neurones et les vaisseaux sanguins (d'après l'illustration de Sylvie Dessert). 23

1.4 Pourcentage des différents types de gliomes dans les tumeurs cérébrales (figure réalisée d'après [Amer 18]). 23

1.5 Image T1 d'un glioblastome après injection de Gadolinium. 25

1.6 Chronologie du "Protocole de Stupp", le traitement actuel du GBM. 26

1.7 Courbes de survie des patients ayant reçu : A) les meilleurs soins conventionnels possibles mais ni radiothérapie, ni chimiothérapie, B) BCNU (chimiothérapie), C) radiothérapie, ou D) BCNU et radiothérapie [Walk 78]. 28

1.8 Relation entre la dose délivrée et les conséquences de la radiothérapie. Il existe un équilibre à trouver entre le contrôle tumoral et les complications suite aux dommages au tissu sain [With 92]. 29

1.9 Schéma de synthèse : quelques cibles et processus de résistance du GBM ainsi que des exemples de thérapies associées. 30

1.10 Techniques thérapeutiques fondées sur l'utilisation d'autres sources énergétiques que les rayons X (figure réalisée d'après [Wang 15, Son 16]). 32

1.11 Selon la phase du cycle cellulaire, la cellule est plus sensible ou plus résistante aux rayons X. 37

1.12 Schéma illustrant le concept du fractionnement spatial. 38

1.13 La radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT) permet d'adapter la forme du faisceau à chaque incidence au profil de la tumeur [Rome 05]. 38

1.14 Principe de fonctionnement du CyberKnife et du Gamma Knife. En A : le CyberKnife effectue des rotations autour du patient pour délivrer les fractions de dose qui s'accumulent dans la tumeur (source : Accuray Inc., OrthoSpineNews). En B : le Gamma Knife est constitué d'une couronne de sources de Cobalt 60 qui délivrent des faisceaux de rayons gamma se focalisant sur la tumeur (source : *Mayo Foundation for Medical Education and Research*). 39

1.15 Coloration d'une coupe de cervelet de porcelet 15 mois après irradiation par MRT (dose pic d'entrée à la peau : 300 Gy) : les rayures blanches horizontales visibles sur la figure de droite correspondent au passage des microfaisceaux, de 27 µm de large et espacés de 210 µm [Lais 07]. 40

1.16 Les photons déposent leur énergie tout au long de leur trajet dans la matière, tandis que les protons en déposent la majorité dans le pic de Bragg [Moha 17]. 41

1.17 Comparaison de la distribution de dose de la 3D-CRT, de l'IMRT et de la protonthérapie (PSPT) pour trois cas de traitement. La cible est indiquée en rouge (image tirée de [Roel 12]). 41

1.18 Pistes d'optimisation de la radiothérapie du glioblastome (liste non exhaustive). Table réalisée à partir de l'ensemble des données recueillies pendant l'étude bibliographique. 42

2.1 (1) Schéma résumé des interactions lumière-matière : (A) pas d'interaction, (B) effet photoélectrique, (C) diffusion Rayleigh, (D) diffusion Compton. Figure tirée de [Seib 05]. (2) Domaines de prédominance des effets Compton, photoélectrique et production de paires en fonction de l'énergie des photons X et du numéro atomique des atomes rencontrés. Figure tirée de [Abde 10]. 48

2.2 Schéma résumé : relaxations radiatives et non radiatives (électrons Auger, Coster-Krönig, super Coster-Krönig). 49

2.3 Schéma résumé des interactions lumière-matière ainsi que les phénomènes de relaxation et de freinage qui en découlent. 50

2.4 Coefficients d'atténuation massique μ/ρ et d'absorption en énergie μ_{en}/ρ de l'eau et du fer (A) ou de l'eau et du Gd (B) selon les données issues du NIST XCOM. 51

2.5 Les principaux types de lésion de l'ADN, figure réalisée d'après [Hout 06]. 55

2.6 Schéma illustrant les dommages à l'ADN causés par des radiations à haut ou bas TEL [Loma 13]. 56

2.7 A gauche : déroulement de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Les groupements "P" montrent la phosphorylation des protéines par les kinases de transduction (en jaune) ou effectrices (en marron). D'après [Free 10, Suro 13]. A droite : les principaux types de mort cellulaire causés par les dommages à l'ADN, d'après [Suro 13]. 57

2.8 Déroulement des phases physique, chimique et biologique décrivant les processus par lesquels une émission de photons mène à la mort cellulaire. Figure tirée de [Cord 02]. 59

2.9 Coefficients d'atténuation massique de l'eau, de l'iode, du gadolinium et du platine en fonction de l'énergie d'irradiation, d'après [Cord 02]. 59

2.10 Synthèse des études *in vitro* et *in vivo* de SSRT au sein de l'équipe RSRM. Les références sont, dans l'ordre : [Cord 02, Cord 04, Adam 03a, Adam 06, Adam 03b, Bist 04, Rous 07b, Rous 07a, Rous 09b, Rous 09a, Edou 10, Boby 10, Boby 12, Taup 13, Delo 17, Gime 15]. 63

2.11 Synthèse d'études de "photoactivation" des NPs *in vivo*, d'après [Kunc 18]. Les publications relatives sont les suivantes : [Hain 04, Le D 11, Choi 12a, Hain 13, Mila 14, Laur 16, McQu 15, Zhan 15, Deta 16] 67

2.12 Evolution de la croissance tumorale de tumeurs CT26 sous cutanées chez la souris avec ou sans injection de NPs Fe_3O_4 suivie d'une irradiation de 7.1 keV à 10 Gy [Choi 12a]. 69

2.13 Schéma illustrant deux phénomènes physiques à l'origine de l'émission d'électrons secondaires lors de l'interaction NPs - rayonnement X : l'effet photoélectrique et la relaxation atomique. 70

2.14 Synthèse d'études *in vitro* utilisant des NPs Fe pour augmenter le dépôt de dose dans les cellules tumorales. Dans l'ordre, les références sont : [Klei 14, Mazu 13, Khos 17, Haus 16, Choi 12a, Klei 12a, Zhan 18, Gime 15, Klei 12b, Khoe 14, Mafa 16]. En gris : références utilisant les mêmes NPs Fe que celles utilisées pendant ces travaux de thèse. 72

3.1 Schéma illustrant les composants de la Barrière Hémato-Encéphalique : les cellules endothéliales sont reliées entre elles par les jonctions serrées. La glia limitans participe à la régulation de la perméabilité de la BHE. D'après [Stam 10]. 74

3.2 Illustration de coupes de cerveaux des patients, étude post-mortem de l'utilisation des NPs magnétiques pour la thérapie du GBM. [Bleu] : limites de la tumeur. [Orange] : zones nécrotiques. [Vert] : zones contenant des agrégats de NPs magnétiques [Land 09]. 76

3.3 Exemples de stratégies employées pour atteindre les tumeurs cérébrales malgré la présence de la BHE : (1) augmenter la capacité du médicament à passer à travers la barrière, (2) augmenter temporairement la perméabilité de la barrière, (3) utilisation de cathéters pour délivrer directement les médicaments, (4) utilisation d'objets implantables comme les disques de polymères ou les *microchips*. Copyright : Ian Suk, Johns Hopkins University, 2012. 78

3.4 Illustration de la méthode CED. (A) Les composés sont injectés dans la tumeur par placement d'un cathéter. La distribution des composés qui en résulte permet un meilleur recouvrement tumoral qu'une injection intratumorale simple (B). D'après [Seo 17]. 81

3.5 Schéma illustrant les deux polarisations principales des macrophages (M1 et M2) ainsi que les propriétés spécifiques à chaque polarisation. 83

3.6 Schéma résumant les principales fonctions des TAMs. Figure adaptée de [Soli 09, Vino 14, Quat 12, Hana 00, Qian 10]. 85

3.7 Infiltration de macrophages dans les tumeurs cérébrales après irradiation. (1) L'irradiation de la tumeur promeut l'infiltration de cellules dérivées de la moëlle osseuse (cellules GFP+, en vert) dans la tumeur [Kioi 10]. (2) La MRT attire plus de macrophages (marquage ED1, en rouge) dans le gliome de rat que l'irradiation en faisceau plein (Serduc *et. al*). 86

3.8 Synthèse d'études visant à utiliser les Mo/Ma comme Chevaux de Troie. Dans l'ordre, les références : [Choi 12c, Choi 12b, Choi 12d, Mads 13, Mads 15, Jian 15, Muth 15, Dou 09, Wu 06, Vala 07, Pang 16, Tong 16, Yang 16]. 89

3.9 (A) Délivrance d'ultrasons non focalisés sous l'os du crâne pour augmenter la perméabilité de la BHE suite à une injection de microbulles afin de favoriser la distribution de composés chimiothérapeutiques dans les tumeurs cérébrales. Le transducteur utilisé (SonoCloud) (B) émet des ultrasons pulsés de basse intensité. Figures tirées de [Carp 16]. 92

3.10 Schéma illustratif de la stratégie d'augmentation de dose délivrée aux tissus tumoraux par accumulation d'atomes lourds dans la tumeur. 96

3.11 Schéma décrivant le principe général de la thérapie utilisant les macrophages comme Chevaux de Troie. Figure adaptée de [Weis 14] et [Gu 11]. 98

4.1 Schéma illustrant la dénomination des couches électroniques dans le logiciel de simulation Monte-Carlo PENELOPE pour décrire l'origine du photoélectron (à gauche) et des électrons de relaxation (à droite). D'après les explications de [Salv 11]. 106

4.2 (A) Notation des interactions (ICOL) dans le code Monte-Carlo PENELOPE. (B) Notation des couches électroniques dans le code Monte-Carlo PENELOPE. Tableaux tirés de [Salv 11]. 107

4.3 (A) Evolution du DEF simulé en fonction de l'énergie d'irradiation pour diverses concentrations de Fe, d'Au, d'I ou de Gd. Les atomes lourds sont répartis de façon homogène dans le volume considéré. (B) Evolution du DEF simulé en fonction de la concentration des composés dans le milieu. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}. 108

4.4 Spectre en énergie des photons et des électrons secondaires émis hors d'une NP d'oxyde de fer Fe_3O_4 de 50 nm de diamètre lors d'une irradiation à 30 keV. 110

4.5 Spectre en énergie des photons et des électrons secondaires émis hors d'une NP d'oxyde de fer Fe_3O_4 de 50 nm de diamètre lors d'une irradiation à 6, 8, 10, 30, 51 ou 80 keV. Le spectre relatif à l'irradiation d'une NP identique remplie d'eau est donnée à titre comparatif. 112

4.6 Proportions des électrons émis sortant d'une NP d'oxyde de fer Fe_3O_4 (ou remplie d'eau) de 50 nm de diamètre, selon le processus qui les a mis en mouvement ou les interactions qu'ils ont subis (diffusion). La NP est irradiée à différentes énergies (6, 7.12, 8, 10, 30, 51 et 80 keV) et les spectres des particules secondaires sont mesurés à différentes distances radiales (50 nm, juste en surface, puis 325 nm, 700 nm, 5 µm, 30 µm). Le faisceau est ponctuel et traverse la NP en son centre. 113

4.7 Parcours des électrons sur le plan normal à l'irradiation suite à l'irradiation d'une NP de 50 nm de diamètre remplie d'eau ou de fer à 100 mg/mL. Les énergies d'irradiation sont 6, 8, 30, 51 et 80 keV. L'échelle de couleur représente l'énergie des électrons en eV. En médaillon en haut à droite : électrons de plus faible énergie, probablement les électrons de relaxation. 115

4.8 (1) Parcours moyen d'un électron dans l'eau (en µm) pour des énergies cinétiques initiales comprises entre 10 et 100 keV. Données provenant du NIST. (2) Parcours moyen d'un électron dans l'eau pour des énergies cinétiques comprises entre 0.1 eV et 10 keV [Nikj 10]. 116

4.9 Nombre d'interactions subies par les électrons sortant d'une NP de 50 nm de diamètre remplie d'eau ou de 100 mg(Fe)/mL pour une distance radiale comprise entre 0 et 10 µm (échelle "intracellulaire"). La NP est irradiée à différentes énergies (6, 8, 30, 51 et 80 keV). Le faisceau est ponctuel et traverse la NP en son centre. 118

4.10 Nombre d'interactions subies par les électrons sortant d'une NP de 50 nm de diamètre remplie d'eau ou de 100 mg(Fe)/mL pour une distance radiale comprise entre 0 et 100 µm (à l'échelle de plusieurs cellules). La NP est irradiée à différentes énergies (6, 8, 30, 51 et 80 keV). Le faisceau est ponctuel et traverse la NP en son centre. . . 119

5.1 Observations TEM des NPs Fe de l'équipe coréenne (A) tirée d'une de leurs publications [Kim 10b] et (B) réalisée lors de ces travaux de thèse. 126

5.2 Distribution des diamètres (en intensité) des NPs mesurée par DLS pour des échantillons de NPs Fe coréennes, diluées dans l'eau (A, B, C, D) ou dans du milieu complet de culture cellulaire (E, F, G, H). Quatre conditions de sonications ont été testées : vortex pour homogénéiser, sans sonication (A et E), une sonication la veille de 15 min à 80% (B et F), trois sonications la veille de 15 min à 80% (C et G), et une sonication la veille 15 min à 80% après quatre sonications identiques réparties la semaine précédente (H et F). 127

5.3 Mesure de la taille des NPs Fe de l'équipe coréenne par DLS suivant différents algorithmes : (A) Z-average dans l'eau ou dans le milieu complet avec ou sans sonication. Cette mesure ne donne pas de barre d'erreur mais la fiabilité de la mesure est décrite par l'indice de polydispersité. Les mesures sont déclarées fiables par l'algorithme pour les mesures de diamètre de NPs dans l'eau uniquement. (B) Valeur du pic de la distribution de taille pondérée en intensité des NPs Fe diluées dans de l'eau. Les barres d'erreur représentent l'écart type du diamètre en nm. (C) Valeur des deux premiers pics de la distribution de taille pondérée en intensité des NPs Fe diluées dans du milieu complet. Les barres d'erreur représentent l'écart type du diamètre en nm pour chaque pic. 128

5.4 Mesure par DLS de la taille des NPs Fe *coatées* en alginate synthétisées par l'équipe de J.K. Kim. Mesure tirée de [Klei 12b]. 130

5.5 Distribution pondérée en intensité de la taille des composés présents dans le DMEM complet seul (mesure par DLS). 131

5.6 Comparaison des concentrations calculées à partir de la concentration de la solution mère indiquée par l'équipe coréenne avec les concentrations mesurées par ICP-MS pour plusieurs dilutions de la solution de NPs Fe. 132

5.7 Schéma illustrant la correspondance "volume/surface". Pour une même concentration de NPs dans le milieu, les cellules en culture dans un puits de plaque 96 puits "rencontreront" plus de NPs que les cellules en culture dans une flasque T25 : en 24 h, les NPs auront sédimenté et se seront accumulées sur le tapis cellulaire. 134

5.8 (A) Table des équivalences volume/surface selon le type de récipient de culture cellulaire utilisé. (B) Exemples de concentrations équivalentes pour plusieurs types de récipients de culture cellulaire. 135

6.1 Observation des cellules F98 au microscope optique après exposition pendant 24h aux NPs Fe de l'équipe coréenne. 140

6.2 Masse de fer internalisée par cellule après une exposition pendant 24 h aux NPs Fe coréennes, mesurée par ICP-MS. Exposition de cellules de gliome 9L (A) et F98 (B) aux NPs Fe non soniquées. (C) Exposition des F98 aux NPs soniquées. (D) Résultats présentés dans l'article de l'équipe coréenne exposant des cellules CT26 aux mêmes NPs Fe [Choi 12a]. 141

6.3 Observation au microscope optique (40x) de F98 après exposition aux NPs Fe coréennes (non soniquées) pendant 24h à 0.3 mg(Fe)/mL. 141

6.4 Images caractéristiques de cellules F98 après exposition pendant 24 h aux NPs Fe de l'équipe coréenne (soniquées) observées sur ID-16 par SR-XRF (concentrations d'exposition : [gauche] 0.02 mg/mL ; [droite] 0.06 mg/mL). Ces cartes indiquent la concentration surfacique de fer (Fe) ou de soufre (S) mesurée pour chaque "pixel" de la cellule. 142

6.5 Observation du comportement des cellules F98 en *live imaging* à intervalles réguliers pendant approximativement 12 h. (A) Cellules témoin. (B) Cellules exposées à 0.3 mg(Fe)/mL de NPs Fe de l'équipe coréenne non soniquées. 143

6.6 Etude du cycle cellulaire des F98 exposées (ou non) pendant 24h aux NPs Fe coréennes soniquées (C2=0.06 mg(Fe)/mL et C3=0.15 mg(Fe)/mL). Images représentatives des triplicats réalisés pendant l'expérience. 144

6.7 Distribution des cellules F98 dans le cycle cellulaire après exposition pendant 24h aux NPs coréennes soniquées (0.06 et 0.15 mg/mL). 145

6.8 Les cellules de gliome 9L internalisent les NPs Fe présentes dans un certain périmètre autour de leur localisation. 147

6.9 Masse de fer internalisée par cellule (A) 9L ou (B) F98, après une exposition pendant 24 h à différentes concentrations de NPs Fe FerInject, mesurée par ICP-MS. 148

6.10 Comptage du nombre de cellules F98 par flasque après exposition pendant 24 h aux NPs Fe coréennes soniquées (N=3). Concentrations : 0.02 et 0.06 mg(Fe)/mL. 150

6.11 Synthèse bibliographique d'articles traitant de l'arrêt en phase S. Les références sont, dans l'ordre alphabétique : [Ge 16, Guo 14, Joe 02, Lang 08, Prey 17, Sale 17, Wei 12, Zhon 16]. 151

6.12 Quelques conséquences possibles de l'exposition des NPs d'oxyde de fer sur les cellules. D'après [Sing 10, Hohn 13, Haus 16, Yarj 17]. 153

6.13 Observation de cellules F98 au microscope optique après exposition pendant 24 h aux NPs Fe coréennes et réensemencement dans des flasques de culture. Concentration : 0.06 mg(Fe)/mL. Les cellules ont été trypsinées à J+1. Faire en J+6. 154

6.14 (A) Prolifération des F98 et 9L suite à l'exposition pendant 24 h aux NPs FerInject pour différentes concentrations (mesures en triplicat). (B) Comptage du nombre de cellules F98 par flasque après exposition pendant 24 h aux agents de contraste Magnevist et Dotarem (N=3). Concentration : 5 mg(Gd)/mL. 155

6.15 Masse de Gd internalisée par les cellules F98 après exposition aux agents de contraste au Gd Magnevist et Dotarem (10 mg(Gd)/mL) pendant différentes durées (mesures ICP-MS, triplicats). 155

6.16 Cartes caractéristiques de cellules F98 après exposition pendant 24 h aux agents de contraste au Gd Magnevist (0.5 mg(Gd)/mL, 48 h d'incubation et 5 mg(Gd)/mL, 24 h d'incubation) ou Dotarem (0.5 mg(Gd)/mL, 48 h d'incubation ; 5 mg(Gd)/mL, 24 h d'incubation ; 10 mg(Gd)/mL, 48 h d'incubation). Ces cartes ont été obtenues par SR-XRF sur ID-16 (ESRF, Grenoble). Les différentes cartes n'ont pas la même échelle : l'objectif de cette figure est de montrer la distribution intracellulaire du Gd pour plusieurs conditions d'exposition. [Vert] : soufre. [Rouge] : gadolinium. L'échelle de couleur est différente selon les conditions, de manière à rendre visibles les vésicules remplies de Gd dans les cellules exposées aux plus basses concentrations. 157

6.17 (A) Masse de Gadolinium intracellulaire mesurée par analyse ImageJ des images obtenues sur ID-16 par fluorescence X. Des F98 ont été exposées pendant 24 h ou 48 h à différentes concentrations de Dotarem (D) ou de Magnevist (M) : C1 = 0.5 mg/mL, C2 = 10 mg/mL et C3 = 5 mg/mL. (B) Cartographies de la répartition du Zinc réalisées par fluorescence X sur ID-16, pour ces cellules F98 exposées à 10 mg/mL de Dotarem pendant 48h. 158

7.1 *Set-up* d'irradiation des plaques 96 puits sur la ligne ID-17 (SSRT). 163

7.2 Exemple de courbe de survie cellulaire ajustée avec le modèle linéaire quadratique. . 164

7.3 Courbe de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV avec (rond rouge) ou sans (carré noir) pré-exposition de 48h à 10 μM d'IUdR [Boby 10]. Deux méthodes de mesure de la survie y sont illustrées : le $SER_{10\%}$ et le SER_{4Gy}. 166

7.4 Test de clonogénicité : cellules contrôle et cellules traitées. 166

7.5 Illustration du protocole de suivi sur 10 jours par test MTT : (A) plaque avant le point de mesure de J8 ; (B) plaque après dissolution des cristaux de formazan dans le DMSO. 168

7.6 Exemple de courbe de prolifération obtenue par mesure MTT et ajustée avec une sigmoïde sur le logiciel PRISM. Les différents paramètres issus du *fit* sont explicités : *hillslope*, *top* et *bottom*, *log(IC50)*. 168

7.7 Schéma illustratif du protocole de mesure de la survie cellulaire suite à une irradiation de rayons X monochromatiques, avec ou sans exposition préalable aux NPs Fe. Les deux protocoles de mesure de la survie MTT et test de clonogénicité sont effectués en parallèle pour caractériser le lien entre les deux méthodes. 169

7.8 Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 30, 51 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux concentrations de NPs Fe (C1=0.02 mg/mL et C2=0.06 mg/mL) pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle). 170

7.9 Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 aux différentes conditions étudiées. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à différentes concentrations (C1 = 0.02 mg/mL et C2 = 0.06 mg/mL) pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy). Les cellules ont été irradiées avec un faisceau monochromatique aux énergies suivantes : (A) 30 keV, (B) 51 keV, (C) 80 keV, (D) cellules non irradiées. 171

7.10 Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 aux différentes conditions étudiées. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à différentes concentrations (C1 = 0.02 mg/mL et C2 = 0.06 mg/mL) pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy, énergie du faisceau : 30, 51 ou 80 keV). (A) Décalage temporel mesuré entre les cellules traitées aux NPs Fe et les cellules non traitées. La toxicité n'est pas prise en compte dans la mesure du décalage des cellules traitées irradiées. (B) Pente (*hillslope*) mesurée selon la condition étudiée. 171

7.11 Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 30, 51 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux concentrations de NPs Fe de l'équipe coréenne (C2=0.06 mg/mL et C3=0.15 mg/mL) pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle). 172

7.12 Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 aux différentes conditions étudiées. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à différentes concentrations (C2=0.06 mg/mL et C3=0.15 mg/mL) pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy, énergie du faisceau : 30, 51 ou 80 keV). (A) Décalage temporel mesuré entre les cellules traitées aux NPs Fe et les cellules non traitées. La toxicité n'est pas prise en compte dans la mesure du décalage des cellules traitées irradiées. (B) Pente (*hillslope*) mesurée selon la condition étudiée. 173

7.13 Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 30, 50 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux concentrations de NPs Fe de l'équipe coréenne (0.06 mg/mL [bleu] et 0.03 mg/mL [rouge]) pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle) [Gime 15]. 174

7.14 Evolution du SER mesuré par clonogénicité selon la masse de fer internalisée par les cellules (mesures ICP-MS sur un échantillon de cellules provenant de l'expérience). Le lot 1 de NPs correspond aux NPs utilisées dans l'expérience 1 et le lot 2 aux NPs utilisées dans l'expérience 2. Les deux lots sont des lots de NPs Fe de l'équipe coréenne, fournis moins de trois mois avant chaque expérience. Les NPs ont été préablement soniquées avant expositions aux cellules. 178

7.15 Schéma illustratif du protocole de mesure de la prolifération cellulaire par suivi MTT avec irradiation des cellules F98 en plaques. Les cellules ont préalablement été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne (0.06 mg/mL) pendant 24h. . . . 179

7.16 Suivi par tests MTT de la prolifération des cellules F98 avec le protocole d'irradiation des cellules en plaques. Les cellules ont été exposées (ou non) aux NPs Fe de l'équipe coréenne à une concentration de 0.06 mg/mL pendant 24h avant l'irradiation (dose déposée : 4 Gy ; énergie du faisceau : 30 keV). 180

7.17 (A) Masse de fer internalisée par cellule lors de l'expérience 1 (mesures ICP-MS). Les cellules ont été exposées à deux concentrations de NPs Fe de l'équipe coréenne (0.02 ou 0.06 mg/mL) pendant 24 h. (B) DEF macroscopique correspondant simulé par méthode Monte Carlo, selon le protocole décrit dans la section 4.1.3.1. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}. 181

7.18 Schéma illustrant la différence entre le SER mesuré et le DEF physique simulé. . . . 182

7.19 Comparaison entre le DEF macroscopique simulé lié à la masse de fer internalisée par cellule (A) et le DEF expérimental obtenu par ajustement du SER mesuré avec le modèle LQ (méthode tirée de [Delo 17]) (B). Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}. 183

7.20 Résultats du test de clonogénicité suite à l'irradiation de cellules F98 à 50, 51 ou 80 keV (dose délivrée : 4 Gy) ou sans irradiation (toxicité). Les cellules ont été préalablement exposées à deux agents de contraste au Gd ((A) Magevist ou (B) Dotarem) à la concentration de 5 mg(Gd)/mL pendant 24h, ou à du milieu de culture complet (cellules contrôle). Les cellules ont été irradiées après avoir été rincées ou dans du milieu contenant 5 mg(Gd)/mL (condition "cellules non rincées"). 185

7.21 DEF macroscopique correspondant à la concentration intracellulaire de Gd dans les cellules rincées après avoir été exposées à 5 mg/mL d'agent de contraste au Gd (Magnevist ou Dotarem) pendant 24 h ou à la concentration (5 mg/mL) de Gd externe aux cellules pour la condition "cellules non rincées". Le DEF a été calculé par simulations Monte-Carlo selon le protocole décrit dans la section 4.1.3.1. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10^{-3}. 185

7.22 Survie normalisée des cellules F98 après exposition à deux agents de contraste au Gd (Dotarem et Magnevist) pendant 24 h, mesurée par test MTT. 186

7.23 Schéma illustrant l'utilisation des données obtenues par suivi MTT pour calculer la survie cellulaire. 188

7.24 Comparaison des SER obtenus lors des deux expériences présentées dans ce chapitre par tests de clonogénicité (A) ou par suivi MTT (méthode de Buch [Buch 12]) (B). . 190

7.25 Relation entre les SER mesurés par clonogénicité et les SER mesurés par MTT ([bleu] : expérience 1 ; [orange] : expérience 2). 190

8.1 Exemple d'images tomographiques obtenues avec le détecteur germanium, après injection d'agents de contraste par la veine de la queue. 196

8.2 Courbes Kaplan-Meier de survie des animaux porteurs de tumeur F98 après irradiation, avec ou sans injection préalable de NPs. Les rats ont été répartis dans 6 groupes : trois groupes non irradiés ont reçu soit aucune NP Fe (n=5), soit des NPs Fe par CED (CED, n=5) ou par injection intraveineuse (iv, n=5). Trois autres groupes ont aussi reçu un traitement par radiothérapie, consistant en une fraction de 20.8 Gy délivrée à 35 keV centrés sur la tumeur avec aucune NP Fe (X, n=5), une injection par CED (CED+X, n=10) ou une injection intraveineuse de NPs Fe (IV+X, n=10). 197

9.1 Schéma illustrant l'approche "Cheval de Troie". 202

9.2 Observations par TEM des Mo/Ma de lignée J774A.1 (gauche) et RAW264.7 (droite) ayant été exposés pendant 24 h aux NPs FerInject (0.24 ou 2.4 mg(Fe)/mL) ou aux NPs de l'équipe coréenne (0.3 mg(Fe)/mL). Les flèches indiquent les vésicules contenant possiblement des NPs Fe. 204

9.3 Internalisation des NPs Fe FerInject par les macrophages J774A.1 en fonction de la concentration de fer dans le milieu de culture (exposition aux NPs Fe pendant 24 h ; mesures ICP-MS en triplicats). 205

9.4 Viabilité (normalisée par rapport au contrôle) des Mo/Ma de lignée J774A.1 et RAW264.7 après une exposition aux NPs Fe FerInject pendant 24 h à différentes concentrations de fer dans le milieu. Mesures par Bleu de Trypan. 206

9.5 Image TEM d'une cellule se divisant après internalisation de NPs Fe γ-Fe_2O_3. Les NPs sont partagées entre les deux cellules filles [Gu 11]. 208

10.1 Déroulement de l'expérience *in vivo* pour l'étude de la migration des lignées cellulaires. 215

10.2 Déroulement de l'expérience *in vivo* pour l'étude de la migration des Mo/Ma primaires après injection en intraveineuse. 218

10.3 (A) et (B) : images en fluorescence (x40) de coupes de cerveaux de rats ayant reçu une injection en i.v. de Mo/Ma primaires marqués avec des microbilles ([bleu] : noyau des cellules / DAPI ; [vert] : microbilles marquant les Mo/Ma injectés). Les images ont été prises dans la zone tumorale. 218

10.4 Schéma illustratif d'une injection intra-tumorale de Mo/Ma primaires. 218

10.5 Déroulement de l'expérience *in vivo* pour l'étude de la migration des Mo/Ma primaires après injection intratumorale. 219

10.6 Images en fluorescence de coupe de cerveaux de rats ayant reçu une injection en intratumorale de Mo/Ma primaires marqués avec des microbilles ([bleu] : noyau des cellules / DAPI ; [vert] : microbilles marquant les Mo/Ma injectés), (A) : 3 j après injection et (B) : 24 h après injection. 219

10.7 (A) et (B) : images en transmission de coupe de cerveaux de rats ayant reçu une injection en intratumorale de Mo/Ma primaires marqués au FerInject. Les coupes ont subi une coloration du H&E puis au Bleu de Prusse ([bleu] : marquage du fer ; [zones encadrées en rouge] : les cellules porteuses de Fe sont restées regroupées localement). 220

10.8 Image en fluorescence d'une coupe de rate de rat (x20) ayant reçu une injection en i.v. de Mo/Ma primaires marqués avec des microbilles ([bleu] : noyau des cellules / DAPI ; [vert] : microbilles marquant les Mo/Ma injectés). 221

10.9 Tableau comparatif des différents marqueurs cellulaires utilisés pour retrouver les Mo/Ma injectés dans les coupes, adapté du travail de Mélanie Flaender. 222

10.10 Image en fluorescence de Mo/Ma primaires marqués au CFSE (vert) et au DAPI (bleu) illustrant l'irrégularité du marquage CFSE après quelques jours (x40). 222

10.11 Images en fluorescence de coupes de cerveaux de rats ayant reçu une injection en i.v. de Mo/Ma primaires marqués au Hoechst (canal DAPI) et au CFSE (expérience pilote). Les images ont été prises dans la zone tumorale ou dans le controlatéral. . . 223

10.12 Tentative d'utilisation de la méthode FISH, sur une coupe de cerveau de ratte porteuse de tumeur F98 et ayant reçu des Mo/Ma par voie intraveineuse (marqués par des billes fluoresçantes en vert). Le marquage (rouge) est présent autant dans la tumeur que dans le controlatéral, qui pourtant n'est pas supposé contenir des cellules porteuses de chromosome Y. 224

10.13 Imagerie *ex vivo* des organes d'animaux 48 h après injection (ou non) de macrophages primaires. Les macrophages, en plus d'avoir internalisé les billes fluorescentes permettant de les détecter, ont été chargés ou non de FerInject. D'après les travaux de Dalzon *et al.* [Dalz 18]. 226

11.1 Injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons pour ouvrir la BHE d'un rat porteur de tumeur. 230

11.2 *Set-up* d'ouverture de la BHE par ultrasons (collaboration GIN V. Stupar, A. Delalande, N. Collomb). 231

11.3 Protocole d'ouverture de la BHE grâce à l'interaction ultrasons - micro-bulles. Des NPs de fer sont injectées ici après l'ouverture afin de tester leur propension à s'accumuler dans les zones où les vaisseaux ont été rendus perméables. 231

11.4 Observation d'un cerveau de rat sain par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de NPs de fer (*in vivo*). Les séquences IRM observées sont, en haut : T2 à gauche et T2* à droite ; en bas : T1, selon la coupe coronale à gauche et axiale à droite. 234

11.5 Principe des "ventres" et "noeuds" : la taille des microbulles étant situées sur un "noeud" n'évolue pas. Les microbulles situées sur un "ventre" enflent par exemple à t_1 (courbe bleue) et se compriment à t_2 (courbe verte). Figure réalisée d'après le principe physique explicité dans la publication [Liu 14]. 234

11.6 Observation de cerveaux de rats sains par IRM après injection de micro-bulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 100 µL d'agent de contraste au Gd pour confirmer l'ouverture de la BHE (observation *in vivo*). 237

11.7 Observation d'un cerveau de rat sain par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 200 µL de solution mère de NPs de fer (observation *in vivo*). 100 µL d'agent de contraste au Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE. Le pattern observé en T2* est susceptible de provenir des NPs. Une analyse histologique est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. 238

11.8 Observation de cerveaux de rats porteurs de tumeur F98 par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 1 mL de solution mère de NPs de fer (observation *in vivo*). 100 µL d'agent de contraste au Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE. La perturbation du signal T2 observée en T2* est susceptible de provenir des NPs. Une analyse histologique est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. 239

11.9 Observation d'un cerveau de rat porteur de tumeur F98 par IRM selon deux coupes (A et B) après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 200 µL de solution mère de NPs de fer (observation *in vivo*). 100 µL d'agent de contraste au Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE. 241

11.10 Observation d'un cerveau de rat porteur de tumeur F98 par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection d'1 mL d'agent de contraste au Gadolinium (Dotarem) -observation *in vivo*. La zone sombre visible en T2 provient probablement du phénomène de "sursignal". 243

11.11 Probabilité de relaxation non radiative selon le numéro atomique de l'élément considéré. D'après les calculs de Krause *et al.* [Krau 79]. 250

11.12 Longueur d'atténuation des photons X dans l'eau en fonction de leur énergie (longueur pour laquelle l'intensité du faisceau est atténuée de 1/e de sa valeur à la surface). D'après *http ://henke.lbl.gov/optical_constants/*. 251

11.13Quantité (normalisée par rapport à une NP de 5 nm) d'électrons Auger et de photoélectrons issus de la couche K sortant d'une NP Fe selon le rayon de cette NP. **La NP a été irradiée par une source ponctuelle en son centre : cette courbe n'est donc pas indicative des conséquences de l'irradiation d'une NP entière.** 254

A.1 Structure et composition du FerInject® : le coeur métallique, de structure akaganéite, est enrobé de carboxymaltose. Illustrations provenant du site officiel du FerInject®. . 266

A.2 Tableau récapitulatif des cellules tumorales utilisées. Les images ont toutes été prises avec le microscope du laboratoire. 269

A.3 Tableau récapitulatif des monocytes/macrophages de lignée utilisés. Les cellules sont toutes issues d'ATCC. Les images ont toutes été prises avec le microscope du laboratoire à l'exception de celle des NR8383 (obtenue sur le site de ATCC). 270

A.4 Schéma représentant la méthode de culture des monocytes-macrophages primaires issus de la moëlle osseuse retirée des tibias et fémurs de rats donneurs. Les monocytes sont différenciés pendant plusieurs jours par la culture en milieu conditionné de surnageant de culture de L929. 272

A.5 Suivi de la maturation des Mo/Ma primaires de rats sur 6 jours au microscope optique du laboratoire (x20). En suspension lors des premiers jours, les cellules deviennent peu à peu adhérentes au cours de leur maturation. 272

A.6 Différences entre les structures des agents de contraste Magnevist et Dotarem, d'après [Aime 06]. 273

A.7 Tableau comparatif des modèles tumoraux utilisés. D'après [Bart 09] et [Bouc 12]. En pratique, les propriétés d'un même modèle peuvent varier d'un laboratoire à l'autre : les caractéristiques des modèles F98, 9L et C6 présentées ici sont relatives aux modèles de l'équipe de Barth. Le modèle 9L de l'équipe RSRM (implantée sur la ligne ID-17) a été caractérisé par Audrey Bouchet et ne possède pas les mêmes propriétés que le modèle 9L de Barth *et al.*. 276

A.8 Principe de fonctionnement du synchrotron (d'après une image provenant de *esrf.eu*). Après avoir été accélérés jusqu'à 200 MeV dans le Linac, les électrons sont acheminés dans le booster synchrotron où ils sont à nouveau accélérés jusqu'à 6 GeV. Ceux-ci rejoignent ensuite l'anneau de stockage où ils sont maintenus à 6 GeV. 279

A.9 Principe de fonctionnement de l'anneau de stockage du synchrotron et de ses éléments (d'après des images provenant de *esrf.eu*). Les électrons sont maintenu dans la trajectoire de l'anneau grâce aux aimants de courbure (A), tandis que les éléments d'insertion (B) permettent d'augmenter la brillance de la machine. 280

A.10 Différences entre les spectres issus du Wiggler d'ID-17 et d'un générateur X conventionnel, à 1m de la source. D'après [Boud 06]. 282

B.1 Exemples de sphères équivalentes représentatives de différentes propriétés d'un objet 3D irrégulier. Figure adaptée du manuel du ZetaSizer Nano ZS, Malvern. 287

B.2 *Set-up* de mesure de la taille d'une NP avec le Zetasiser Nano ZS. Figure adaptée du manuel du ZetaSizer Nano ZS, Malvern. 288

B.3 Exemple de courbe de corrélation. Le coefficient de corrélation devrait toujours décroître avec le temps. S'il ne décroit pas, comme c'est le cas à la fin de l'enregistrement par exemple, c'est le signe que d'autres phénomènes interviennent comme la sédimentation ou la convection (dans le cas où la température change au cours de l'expérience). Au début de l'enregistrement, le coefficient est stable. Le moment auquel le coefficient commence à décroître est indicateur de la taille moyenne des NPs. Le gradient de décroissance indique lui la polydispersité de l'échantillon. 289

B.4 Principe de fonctionnement de l'analyse par DLS. Les hypothèses effectuées pour chaque mesure sont indiquées en italique. Schéma explicatif d'après les explications du manuel du Zetasizer Nano ZS. 290

B.5 *Set-up* de l'observation de la dynamique d'internalisation des NPs Fe par les cellules F98 en *live imaging* sur la plateforme M4D de l'IBS. 295

B.6 Répartition usuelle des cellules dans le cycle cellulaire lors d'une mesure par cytométrie en flux. 296

B.7 Méthode d'analyse des échantillons par SR-XRF sur la ligne ID-16. 299

B.8 Fixer les cellules sur des membranes spécifiques permet d'étudier la distribution élémentaire de ces échantillons sur la ligne ID-16. 300

B.9 Représentation schématique de la membrane utilisée pour les expériences sur ID16. . 300

Liste des tableaux

1.1 Tableau résumant les principaux types d'astrocytomes ainsi que leur grade et leur fréquence. 23
1.2 Tableau résumant les principales limites des traitements actuels utilisés pour le Protocole de Stupp. 29

2.1 Rendement de formation des lésions lors d'une irradiation [Burk 99]. 55

3.1 Récapitulatif des principaux intérêts et inconvénients des thérapies locales et systémiques, d'après [Chak 18]. 77

8.1 Survie des rats selon les traitements : survie médiane, pourcentage d'augmentation de la survie médiane par rapport aux témoins : ILS % = (Survie – Survie témoins) / Survie témoins et valeur du test *Log-Rank* par rapport aux témoins et par rapport aux X seuls selon les groupes. 197

9.1 DEF théorique obtenu à 80 keV par simulation Monte-Carlo dans un milieu homogène, en fonction de la concentration en élément dans le milieu (I, Gd ou Fe). Ces concentrations sont des concentrations réalistes par rapport à ce qu'il est possible d'obtenir *in vivo* (pour le Gd et l'I) ou *in vitro* dans les cellules (pour le Fe). 208

B.1 Conditions de congélation utilisées selon la lignée cellulaire. 293

Bibliographie

[Abde 10] W. Abdel-Rahman and E. Podgorsak. "Energy transfer and energy absorption in photon interactions with matter revisited : A step-by-step illustrated approach". *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 79, No. 5, pp. 552–566, may 2010. 48, 312

[Adam 03a] J.-F. Adam. *Tumeurs cérébrales et rayonnement synchrotron : Développements méthodologiques en imagerie quantitative de la perfusion et en radiothérapie renforcée par effet photoélectrique.* PhD thesis, 2003. 12, 62, 63, 312

[Adam 03b] J. F. Adam, H. Elleaume, A. Joubert, M. C. Biston, A. M. Charvet, J. Balosso, J. F. Le Bas, and F. Estève. "Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent : first trial on rats bearing F98 gliomas.". *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Vol. 57, No. 5, pp. 1413–26, dec 2003. 12, 63, 312

[Adam 06] J.-F. Adam, A. Joubert, M.-C. Biston, A.-M. Charvet, M. Peoc'h, J.-F. Le Bas, J. Balosso, F. Estève, and H. Elleaume. "Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy". *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, Vol. 64, No. 2, pp. 603–611, feb 2006. 63, 312

[Adam 09] C. Adamson, O. O. Kanu, A. I. Mehta, C. Di, N. Lin, A. K. Mattox, and D. D. Bigner. "Glioblastoma multiforme : a review of where we have been and where we are going". *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Vol. 18, No. 8, pp. 1061–1083, aug 2009. 31

[Adam 77] F. H. Adams, A. Norman, R. S. Mello, and D. Bass. "Effect of Radiation and Contrast Media on Chromosomes". *Radiology*, Vol. 124, No. 3, pp. 823–826, sep 1977. 60

[Adeb 17] S. Adeberg, D. Bernhardt, S. B. Harrabi, M. Uhl, A. Paul, N. Bougatf, V. Verma, A. Unterberg, W. Wick, T. Haberer, S. E. Combs, K. Herfarth, J. Debus, and S. Rieken. "Sequential proton boost after standard chemoradiation for high-grade glioma". *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 125, No. 2, pp. 266–272, nov 2017. 41

[Aham 13] M. Ahamed, H. A. Alhadlaq, M. A. M. Khan, and M. J. Akhtar. "Selective killing of cancer cells by iron oxide nanoparticles mediated through reactive oxygen species via p53 pathway". *Journal of Nanoparticle Research*, Vol. 15, No. 1, p. 1225, jan 2013. 256

[Aime 06] S. Aime, S. G. Crich, E. Gianolio, G. Giovenzana, L. Tei, and E. Terreno. "High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging". *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 250, No. 11-12, pp. 1562–1579, jun 2006. 273, 322

[AL W 86] N. S. AL-Waili and M. A. AL-Ani. "Allogeneic transfusion of macrophages in acute urinary tract infection". *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Vol. 13, No. 2, pp. 173–176, feb 1986. 225

[Al W 89] N. S. Al-Waili. "Peritoneal macrophages transfusion in the treatment of chronic post-operative wound infections.". *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, Vol. 39, No. 12, pp. 310–2, dec 1989. 225

[Alla 08] P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, and A. Mantovani. "The inflammatory micro-environment in tumor progression : The role of tumor-associated macrophages". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 66, No. 1, pp. 1–9, apr 2008. 82, 84

[Alli 99] F. Alliot, I. Godin, and B. Pessac. "Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain.". *Brain research. Developmental brain research*, Vol. 117, No. 2, pp. 145–52, nov 1999. 226

[Amer 18] "American Brain Tumor Association : brain tumor statistics". 2018. 21, 23, 311

[Audr 95] R. Audran, B. Collet, A. Moisan, and L. Toujas. "Fate of mouse macrophages radiolabelled with PKH-95 and injected intravenously.". *Nuclear medicine and biology*, Vol. 22, No. 6, pp. 817–21, aug 1995. 90, 220

[Azev 09] F. A. Azevedo, L. R. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. Ferretti, R. E. Leite, W. J. Filho, R. Lent, and S. Herculano-Houzel. "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain". *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 513, No. 5, pp. 532–541, apr 2009. 18, 19

[Baek 11] S.-K. Baek, A. R. Makkouk, T. Krasieva, C.-H. Sun, S. J. Madsen, and H. Hirschberg. "Photothermal treatment of glioma ; an in vitro study of macrophage-mediated delivery of gold nanoshells". *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 104, No. 2, pp. 439–448, sep 2011. 88

[Bail 26] P. Bailey and H. Cushing. *A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis.* J.P. Lippincott Company, 1926. 21

[Bana 99] D. Banasiak, A. R. Barnetson, R. A. Odell, H. Mameghan, and P. J. Russell. "Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line". *Radiation Oncology Investigations*, Vol. 7, No. 2, pp. 77–85, jan 1999. 191

[Bao 06] S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, and J. N. Rich. "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response". *Nature*, Vol. 444, No. 7120, pp. 756–760, dec 2006. 30, 31

[Bart 04] J. Bartek, C. Lukas, and J. Lukas. "Checking on DNA damage in S phase". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 5, No. 10, pp. 792–804, oct 2004. 150

[Bart 09] R. F. Barth and B. Kaur. "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology : the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas". *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 94, No. 3, pp. 299–312, sep 2009. 254, 268, 269, 274, 275, 276, 322

[Bart 16] C. S. von Bartheld, J. Bahney, and S. Herculano-Houzel. "The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain : A review of 150 years of cell counting.". *The Journal of comparative neurology*, Vol. 524, No. 18, pp. 3865–3895, dec 2016. 19

[Bask 12] R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, and K.-W. Yeoh. "Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions". *International Journal of Medical Sciences*, Vol. 9, No. 3, pp. 193–199, 2012. 57

[Bell 08] M.-F. Bellin and A. J. Van Der Molen. "Extracellular gadolinium-based contrast media : An overview". *European Journal of Radiology*, Vol. 66, No. 2, pp. 160–167, may 2008. 273

[Bern 13] C. Bernstein, A. R., V. Nfonsam, and H. Bernstei. "DNA Damage, DNA Repair and Cancer". In : *New Research Directions in DNA Repair*, InTech, may 2013. 20

[Biss 16] C. Bissardon. *Rôle du Sélénium dans le Métabolisme, la Croissance et la Maturation du Cartilage Articulaire*. PhD thesis, COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES, 2016. 298

[Bist 04] M.-C. Biston, A. Joubert, J.-F. Adam, H. Elleaume, S. Bohic, A.-M. Charvet, F. Estève, N. Foray, and J. Balosso. "Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays.". *Cancer research*, Vol. 64, No. 7, pp. 2317–23, apr 2004. 63, 312

[Blak 08] J. Blakeley. "Drug delivery to brain tumors.". *Current neurology and neuroscience reports*, Vol. 8, No. 3, pp. 235–41, may 2008. 75, 78, 79, 80, 81, 82

[Boby 10] L. Bobyk. *Renforcement de la dose par rayonnement synchrotron et atomes lourds dans le cadre du traitement des gliomes*. PhD thesis, 2010. 12, 63, 66, 165, 166, 262, 312, 317

[Boby 12] L. Bobyk, M. Edouard, P. Deman, J. Rousseau, J.-F. Adam, J.-L. Ravanat, F. Estève, J. Balosso, R. F. Barth, and H. Elleaume. "Intracerebral delivery of Carboplatin in combination with either 6 MV Photons or monoenergetic synchrotron X-rays are equally efficacious for treatment of the F98 rat glioma". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Vol. 31, No. 1, p. 78, sep 2012. 63, 312

[Bohm 15] N. Bohmer and A. Jordan. "Caveolin-1 and CDC42 mediated endocytosis of silica-coated iron oxide nanoparticles in HeLa cells". *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Vol. 6, pp. 167–176, jan 2015.

[Bonv 17] S. Bonvalot, C. Le Pechoux, T. De Baere, G. Kantor, X. Buy, E. Stoeckle, P. Terrier, P. Sargos, J. M. Coindre, N. Lassau, R. Ait Sarkouh, M. Dimitriu, E. Borghi, L. Levy, E. Deutsch, and J.-C. Soria. "First-in-Human Study Testing a New Radioenhancer Using Nanoparticles (NBTXR3) Activated by Radiation Therapy in Patients with Locally Advanced Soft Tissue Sarcomas". *Clinical Cancer Research*, Vol. 23, No. 4, pp. 908–917, feb 2017. 257

[Bouc 12] A. Bouchet. *Réponse transcriptomique des tissus cérébraux sains et tumoraux à la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron*. PhD thesis, Université de Grenoble, 2012. 39, 268, 275, 276, 322

[Bouc 15] A. Bouchet, R. Serduc, J. A. Laissue, and V. Djonov. "Effects of microbeam radiation therapy on normal and tumoral blood vessels". *Physica Medica*, Vol. 31, No. 6, pp. 634–641, sep 2015. 213

[Boud 06] C. Boudou. *Dosimétrie pour la radiothérapie stéréotaxique en rayonnement synchrotron : calculs Monte-Carlo et gels radiosensibles*. PhD thesis, 2006. 61, 282, 322

[Boul 11] S. Boulant, C. Kural, J.-C. Zeeh, F. Ubelmann, and T. Kirchhausen. "Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis". *Nature Cell Biology*, Vol. 13, No. 9, pp. 1124–1131, sep 2011.

[Brem 95] H. Brem, S. Piantadosi, P. C. Burger, M. Walker, R. Selker, N. A. Vick, K. Black, M. Sisti, S. Brem, and G. Mohr. "Placebo-controlled trial of safety and efficacy of

intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group.". *Lancet (London, England)*, Vol. 345, No. 8956, pp. 1008–12, apr 1995. 27

[Brow 03] A. B. Brown, W. Yang, N. O. Schmidt, R. Carroll, K. K. Leishear, N. G. Rainov, P. M. Black, X. O. Breakefield, and K. S. Aboody. "Intravascular Delivery of Neural Stem Cell Lines to Target Intracranial and Extracranial Tumors of Neural and Non-Neural Origin". *Human Gene Therapy*, Vol. 14, No. 18, pp. 1777–1785, dec 2003. 225

[Brun 16] E. Brun and C. Sicard-Roselli. "Actual questions raised by nanoparticle radiosensitization". *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 128, pp. 134–142, nov 2016. 66, 67, 68, 259

[Brya 16] R. N. Bryan. "Science to Practice : Can Focused Ultrasound Disruption of the Blood-Brain Barrier Improve Malignant Brain Tumor Treatment Outcomes ?". *Radiology*, Vol. 281, No. 1, pp. 1–3, oct 2016. 91

[Buch 12] K. Buch, T. Peters, T. Nawroth, M. Sänger, H. Schmidberger, and P. Langguth. "Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay–a comparative study.". *Radiation oncology (London, England)*, Vol. 7, p. 1, jan 2012. 188, 190, 319

[Burk 99] W. Burkart, T. Jung, and G. Frasch. "Damage pattern as a function of radiation quality and other factors.". *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, Vol. 322, No. 2-3, pp. 89–101, 1999. 55, 325

[Caho 08] J. D. Cahoy, B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson, and B. A. Barres. "A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes : A New Resource for Understanding Brain Development and Function". *Journal of Neuroscience*, Vol. 28, No. 1, pp. 264–278, jan 2008. 147

[Cane 10] M. Cañete, J. Soriano, A. Villanueva, A. G. Roca, S. Veintemillas, C. J. Serna, R. Miranda, and M. Del Puerto Morales. "The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover : a morphological approach.". *International journal of molecular medicine*, Vol. 26, No. 4, pp. 533–9, oct 2010.

[Cant 12] I. Canton and G. Battaglia. "Endocytosis at the nanoscale". *Chemical Society Reviews*, Vol. 41, No. 7, p. 2718, apr 2012.

[Carm 87] J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing.". *Cancer research*, Vol. 47, No. 4, pp. 936–42, feb 1987. 191

[Carp 16] A. Carpentier, M. Canney, A. Vignot, V. Reina, K. Beccaria, C. Horodyckid, C. Karachi, D. Leclercq, C. Lafon, J.-Y. Chapelon, L. Capelle, P. Cornu, M. Sanson, K. Hoang-Xuan, J.-Y. Delattre, and A. Idbaih. "Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound.". *Science translational medicine*, Vol. 8, No. 343, p. 343re2, jun 2016. 92, 93, 314

[Cell 08] "Cells concentrations in human and mouse samples". Tech. Rep., Thermofisher Tools, 2008. 225

[Chai 99] F. Chai, A. Q. Truong-Tran, L. H. Ho, and P. D. Zalewski. "Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation : A review". *Immunology and Cell Biology*, Vol. 77, No. 3, pp. 272–278, jun 1999. 159

[Chak 18] R. W. Chakroun, P. Zhang, R. Lin, P. Schiapparelli, A. Quinones-Hinojosa, and H. Cui. "Nanotherapeutic systems for local treatment of brain tumors". *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol. 10, No. 1, p. e1479, jan 2018. 77, 79, 80, 81, 325

[Cham 09] L. M. Chamberlain, M. L. Godek, M. Gonzalez-Juarrero, and D. W. Grainger. "Phenotypic non-equivalence of murine (monocyte-) macrophage cells in biomaterial and inflammatory models". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 88A, No. 4, pp. 858–871, mar 2009. 270

[Chan 05] T. A. Chan, J. D. Weingart, M. Parisi, M. A. Hughes, A. Olivi, S. Borzillary, D. Alahakone, N. A. Detorie, M. D. Wharam, and L. Kleinberg. "Treatment of recurrent glioblastoma multiforme with GliaSite brachytherapy". *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, Vol. 62, No. 4, pp. 1133–1139, jul 2005. 35

[Chin 14] O. L. Chinot, W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, A. F. Carpentier, K. Hoang-Xuan, P. Kavan, D. Cernea, A. A. Brandes, M. Hilton, L. Abrey, and T. Cloughesy. "Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma". *New England Journal of Medicine*, Vol. 370, No. 8, pp. 709–722, feb 2014. 34

[Cho 05] S. H. Cho. "Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments : a preliminary Monte Carlo study". *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 50, No. 15, pp. N163–N173, aug 2005. 104

[Cho 09] S. H. Cho, B. L. Jones, and S. Krishnan. "The dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) via brachytherapy using low-energy gamma-/x-ray sources.". *Physics in medicine and biology*, Vol. 54, No. 16, pp. 4889–905, aug 2009. 252

[Choi 07] M.-R. Choi, K. J. Stanton-Maxey, J. K. Stanley, C. S. Levin, R. Bardhan, D. Akin, S. Badve, J. Sturgis, J. P. Robinson, R. Bashir, N. J. Halas, and S. E. Clare. "A Cellular Trojan Horse for Delivery of Therapeutic Nanoparticles into Tumors". *Nano Letters*, Vol. 7, No. 12, pp. 3759–3765, dec 2007. 87

[Choi 12a] G.-H. Choi, S.-J. Seo, K.-H. Kim, H.-T. Kim, S.-H. Park, J.-H. Lim, and J.-K. Kim. "Photon activated therapy (PAT) using monochromatic Synchrotron x-rays and iron oxide nanoparticles in a mouse tumor model : feasibility study of PAT for the treatment of superficial malignancy". *Radiation Oncology*, Vol. 7, No. 1, p. 184, oct 2012. 67, 69, 72, 124, 129, 133, 135, 141, 146, 148, 149, 174, 198, 262, 267, 268, 312, 313, 316

[Choi 12b] J. Choi, H.-Y. Kim, E. J. Ju, J. Jung, J. Park, H.-K. Chung, J. S. Lee, J. S. Lee, H. J. Park, S. Y. Song, S.-Y. Jeong, and E. K. Choi. "Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors". *Biomaterials*, Vol. 33, No. 16, pp. 4195–4203, jun 2012. 84, 86, 88, 89, 216, 313

[Choi 12c] J. Choi, H.-N. Woo, E. J. Ju, J. Jung, H.-K. Chung, J. Park, S. S. Park, S. H. Shin, H. J. Park, J. S. Lee, S. Y. Song, S.-Y. Jeong, and E. K. Choi. "Immunocytes as a Biocarrier to Delivery Therapeutic and Imaging Contrast Agents to Tumors". *Journal of Nanomaterials*, Vol. 2012, pp. 1–8, 2012. 89, 216, 313

[Choi 12d] M.-R. Choi, R. Bardhan, K. J. Stanton-Maxey, S. Badve, H. Nakshatri, K. M. Stantz, N. Cao, N. J. Halas, and S. E. Clare. "Delivery of nanoparticles to brain metastases of breast cancer using a cellular Trojan horse". *Cancer Nanotechnology*, Vol. 3, No. 1-6, pp. 47–54, dec 2012. 88, 89, 212, 225, 262, 313

[Chun 15] D. Chung, J. Kim, and J. K. Kim. "Evaluation of MTT and Trypan Blue assays for radiation-induced cell viability test in HepG2 cells". *International Journal of Radiation Research*, Vol. 13, No. 4, pp. 331–335, oct 2015. 191

[Clem 00] G. T. Clement, J. Sun, T. Giesecke, and K. Hynynen. "A hemisphere array for non-invasive ultrasound brain therapy and surgery". *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 45, No. 12, pp. 3707–3719, dec 2000. 91

[Comb 13] S. E. Combs, T. Bruckner, J.-E. Mizoe, T. Kamada, H. Tsujii, M. Kieser, and J. Debus. "Comparison of carbon ion radiotherapy to photon radiation alone or in combination with temozolomide in patients with high-grade gliomas : explorative hypothesis-generating retrospective analysis.". *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Vol. 108, No. 1, pp. 132–5, jul 2013. 41

[Cond 06] J. Condeelis and J. W. Pollard. "Macrophages : Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis". *Cell*, Vol. 124, No. 2, pp. 263–266, jan 2006. 83, 84, 85

[Conn 03] S. D. Conner and S. L. Schmid. "Regulated portals of entry into the cell". *Nature*, Vol. 422, No. 6927, pp. 37–44, mar 2003.

[Cord 02] S. Corde. *Développement méthodologique de l'application d'agents pharmacologiques renforçateurs de l'effet photoélectrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse.* PhD thesis, Université Joseph Fourier, 2002. 59, 63, 312

[Cord 04] S. Corde, A. Joubert, J. F. Adam, A. M. Charvet, J. F. Le Bas, F. Estève, H. Elleaume, and J. Balosso. "Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity enhancement following photoelectric effect on stable iodinated compounds". *British Journal of Cancer*, Vol. 91, No. 3, pp. 544–551, aug 2004. 63, 114, 312

[Coul 13] J. Coulter, W. Hyland, J. Nicol, and F. Currell. "Radiosensitising Nanoparticles as Novel Cancer Therapeutics — Pipe Dream or Realistic Prospect ?". *Clinical Oncology*, Vol. 25, No. 10, pp. 593–603, oct 2013. 257

[Cros 10] E. Crossley, J. Aitken, S. Vogt, H. Harris, and L. Rendina. "Selective Aggregation of a Platinum-Gadolinium Complex Within a Tumor-Cell Nucleus". *Angewandte Chemie*, Vol. 122, No. 7, pp. 1253–1255, feb 2010. 158

[Curt 16] K. K. Curtis, W. W. Wong, and H. J. Ross. "Past approaches and future directions for targeting tumor hypoxia in squamous cell carcinomas of the head and neck". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vol. 103, pp. 86–98, jul 2016. 42

[Dalz 18] B. Dalzon. *Etude des réponses des macrophages aux nanoparticules d'oxydes métalliques par une combinaison d'approches protéomiques et ciblées.* PhD thesis, COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, 2018. 209, 226, 320

[Dawi 15] C. M. Dawidczyk, L. M. Russell, and P. C. Searson. "Recommendations for Benchmarking Preclinical Studies of Nanomedicines.". *Cancer research*, Vol. 75, No. 19, pp. 4016–20, oct 2015. 192

[Daws 88] P. Dawson, M. Penhaligon, E. Smith, and J. Saunders. "Synergistic cytotoxicity of iodinated contrast agents and x-radiation.". *Investigative radiology*, Vol. 23 Suppl 1, pp. S110–3, sep 1988. 60

[De P 13] M. De Palma and C. E. Lewis. "Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies.". *Cancer cell*, Vol. 23, No. 3, pp. 277–86, mar 2013. 86, 87

[De S 01] G. De Stasio, P. Casalbore, R. Pallini, B. Gilbert, F. Sanità, M. T. Ciotti, G. Rosi, A. Festinesi, L. M. Larocca, A. Rinelli, D. Perret, D. W. Mogk, P. Perfetti, M. P. Mehta, and D. Mercanti. "Gadolinium in human glioblastoma cells for gadolinium neutron capture therapy.". *Cancer research*, Vol. 61, No. 10, pp. 4272–7, may 2001. 156

[Delo 13] R. Delorme. *Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules : modélisation à l'échelle sub-micrométrique et comparaison expérimentale*. PhD thesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2013. 102, 103, 120, 138

[Delo 17] R. Delorme, F. Taupin, M. Flaender, J.-L. Ravanat, C. Champion, M. Agelou, and H. Elleaume. "Comparison of gadolinium nanoparticles and molecular contrast agents for radiation therapy-enhancement". *Medical Physics*, Vol. 44, No. 11, pp. 5949–5960, nov 2017. 12, 63, 182, 183, 312, 319

[Deta 15] A. Detappe, S. Kunjachan, J. Rottmann, J. Robar, P. Tsiamas, H. Korideck, O. Tillement, and R. Berbeco. "AGuIX nanoparticles as a promising platform for image-guided radiation therapy.". *Cancer nanotechnology*, Vol. 6, No. 1, p. 4, 2015. 257

[Deta 16] A. Detappe, S. Kunjachan, L. Sancey, V. Motto-Ros, D. Biancur, P. Drane, R. Guieze, G. M. Makrigiorgos, O. Tillement, R. Langer, and R. Berbeco. "Advanced multimodal nanoparticles delay tumor progression with clinical radiation therapy". *Journal of Controlled Release*, Vol. 238, pp. 103–113, sep 2016. 67, 312

[Djan 14] I. Djan, S. Solajic, M. Djan, N. Vucinic, D. Popovic, M. Ilic, S. Lučić, and G. Bogdanovic. "Radiobiological effects of multiple vs. single low-dose pre-irradiation on the HT29 cell line.". *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, Vol. 18, No. 4, pp. 230–3, 2014. 178

[Dou 09] H. Dou, C. B. Grotepas, J. M. McMillan, C. J. Destache, M. Chaubal, J. Werling, J. Kipp, B. Rabinow, and H. E. Gendelman. "Macrophage Delivery of Nanoformulated Antiretroviral Drug to the Brain in a Murine Model of NeuroAIDS". *The Journal of Immunology*, Vol. 183, No. 1, pp. 661–669, jul 2009. 88, 89, 313

[Duff 03] J. S. Duffield. "The inflammatory macrophage : a story of Jekyll and Hyde.". *Clinical science (London, England : 1979)*, Vol. 104, No. 1, pp. 27–38, jan 2003. 85

[DuVa 09] G. A. DuVall, D. Tarabar, R. H. Seidel, N. L. Elstad, and K. D. Fowers. "Phase 2 : a dose-escalation study of OncoGel (ReGel/paclitaxel), a controlled-release formulation of paclitaxel, as adjunctive local therapy to external-beam radiation in patients with inoperable esophageal cancer.". *Anti-cancer drugs*, Vol. 20, No. 2, pp. 89–95, feb 2009. 80

[Edou 10] M. Edouard. *Dosimétrie pour la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron : d'une vision macroscopique aux considérations microscopiques des dépôts d'énergie*. PhD thesis, Université de Grenoble, 2010. 12, 61, 63, 312

[Eide 06] D. J. Eide. "Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Vol. 1763, No. 7, pp. 711–722, jul 2006. 159

[Eldr 16] B. N. Eldridge, B. W. Bernish, C. D. Fahrenholtz, and R. Singh. "Photothermal Therapy of Glioblastoma Multiforme Using Multiwalled Carbon Nanotubes Optimized

for Diffusion in Extracellular Space". *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 2, No. 6, pp. 963–976, jun 2016. 75

[Elja 10] S. Eljamel. "Photodynamic applications in brain tumors : A comprehensive review of the literature". *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Vol. 7, No. 2, pp. 76–85, jun 2010. 32

[Elle 99] H. Elleaume, A. Charvet, P. Berkvens, G. Berruyer, T. Brochard, Y. Dabin, M. Dominguez, A. Draperi, S. Fiedler, G. Goujon, G. Le Duc, M. Mattenet, C. Nemoz, M. Perez, M. Renier, C. Schulze, P. Spanne, P. Suortti, W. Thomlinson, F. Esteve, B. Bertrand, and J. Le Bas. "Instrumentation of the ESRF medical imaging facility". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, Vol. 428, No. 2-3, pp. 513–527, jun 1999. 281

[Erta 14] G. Ertas, A. R. Ucer, Y. Y. Guney, G. G. Avci, M. Bedri Altundag, H. Abanuz, A. Demirkasimoglu, and T. Calikoglu. "Survival Following Stereotactic Radiotherapy for Recurrent High Grade Gliomas International Journal of Hematology and Oncology". *International Journal of Hematology and Oncology*, Vol. 24, No. 4, 2014. 38

[Etam 12] A. B. Etame, R. J. Diaz, C. A. Smith, T. G. Mainprize, K. Hynynen, and J. T. Rutka. "Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier : a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology.". *Neurosurgical focus*, Vol. 32, No. 1, p. E3, jan 2012. 91

[Fish 07] J. L. Fisher, J. A. Schwartzbaum, M. Wrensch, and J. L. Wiemels. "Epidemiology of Brain Tumors". *Neurologic Clinics*, Vol. 25, No. 4, pp. 867–890, nov 2007. 24

[Free 10] A. K. Freeman and A. N. Monteiro. "Phosphatases in the cellular response to DNA damage". *Cell Communication and Signaling*, Vol. 8, No. 1, p. 27, sep 2010. 57, 312

[Fris 01] B. J. Frisken. "Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data". *Applied Optics*, Vol. 40, No. 24, p. 4087, aug 2001. 288

[Fris 16] J. M. Frischer, C. Marosi, A. Woehrer, J. A. Hainfellner, K. U. Dieckmann, H. Eiter, W.-T. Wang, A. Mallouhi, A. Ertl, E. Knosp, M. Filipits, K. Kitz, and B. Gatterbauer. "Gamma Knife Radiosurgery in Recurrent Glioblastoma". *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, Vol. 94, No. 4, pp. 265–272, 2016. 39

[Gall 15] O. Gallego. "Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma.". *Current oncology (Toronto, Ont.)*, Vol. 22, No. 4, pp. e273–81, aug 2015. 29

[Ge 16] Z.-C. Ge, X. Qu, H.-F. Yu, H.-M. Zhang, Z.-H. Wang, and Z.-T. Zhang. "Antitumor and apoptotic effects of bergaptol are mediated via mitochondrial death pathway and cell cycle arrest in human breast carcinoma cells". *Bangladesh Journal of Pharmacology*, Vol. 11, No. 2, p. 489, apr 2016. 151, 316

[Geis 11] P. Geisser, S. Burckhardt, P. Geisser, and S. Burckhardt. "The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Iron Preparations". *Pharmaceutics*, Vol. 3, No. 1, pp. 12–33, jan 2011. 266

[Gepp 12] M. Geppert, M. C. Hohnholt, S. Nürnberger, and R. Dringen. "Ferritin up-regulation and transient ROS production in cultured brain astrocytes after loading with iron oxide nanoparticles". *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, No. 10, pp. 3832–3839, oct 2012. 177

[Gime 15] P. Gimenez. *Radiothérapie par photoactivation de nanoparticules et effet Mössbauer*. PhD thesis, 2015. 12, 63, 71, 72, 109, 130, 133, 139, 148, 174, 259, 312, 313, 318

[Gome 15] E. Gomez Perdiguero, K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M. F. de Bruijn, F. Geissmann, and H.-R. Rodewald. "Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors". *Nature*, Vol. 518, No. 7540, pp. 547–551, feb 2015. 226

[Gran 03] L. Grandbarbe, J. Bouissac, M. Rand, M. Hrabé de Angelis, S. Artavanis-Tsakonas, and E. Mohier. "Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process.". *Development (Cambridge, England)*, Vol. 130, No. 7, pp. 1391–402, apr 2003. 19, 20, 311

[Grat 08] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, and J. M. DeSimone. "The effect of particle design on cellular internalization pathways". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 105, No. 33, pp. 11613–11618, aug 2008.

[Gray 03] A. C. R. Grayson, I. S. Choi, B. M. Tyler, P. P. Wang, H. Brem, M. J. Cima, and R. Langer. "Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device". *Nature Materials*, Vol. 2, No. 11, pp. 767–772, nov 2003. 80

[Grif 12] R. J. Griffin, N. A. Koonce, R. P. M. Dings, E. Siegel, E. G. Moros, E. Bräuer-Krisch, and P. M. Corry. "Microbeam radiation therapy alters vascular architecture and tumor oxygenation and is enhanced by a galectin-1 targeted anti-angiogenic peptide.". *Radiation research*, Vol. 177, No. 6, pp. 804–12, jun 2012. 39

[Grob 02] B. Grobben, P. De Deyn, and H. Slegers. "Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion". *Cell and Tissue Research*, Vol. 310, No. 3, pp. 257–270, dec 2002. 268, 276

[Grot 15] M. Grotzer, E. Schültke, E. Bräuer-Krisch, and J. Laissue. "Microbeam radiation therapy : Clinical perspectives". *Physica Medica*, Vol. 31, No. 6, pp. 564–567, sep 2015. 40

[Gu 11] J. Gu, H. Xu, Y. Han, W. Dai, W. Hao, C. Wang, N. Gu, H. Xu, and J. Cao. "The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell". *Science China Life Sciences*, Vol. 54, No. 9, pp. 793–805, sep 2011. 98, 208, 314, 320

[Guo 14] Q. Guo, X. X. Nan, J. R. Yang, L. Yi, B. L. Liang, Y. B. Wei, N. Zhu, S. B. Hu, H. Zhang, Y. Luo, and Y. F. Xu. "Triptolide inhibits the multidrug resistance in prostate cancer cells via the downregulation of MDR1 expression". *Neoplasma*, Vol. 60, No. 06, pp. 598–604, 2014. 151, 316

[Haas 02] H. Haase and D. Beyersmann. "Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells.". *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 296, No. 4, pp. 923–8, aug 2002. 159

[Hain 04] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz. "The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice.". *Physics in medicine and biology*, Vol. 49, No. 18, pp. N309–15, sep 2004. 12, 66, 67, 259, 262, 312

[Hain 13] J. F. Hainfeld, H. M. Smilowitz, M. J. O'Connor, F. A. Dilmanian, and D. N. Slatkin. "Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice.". *Nanomedicine (London, England)*, Vol. 8, No. 10, pp. 1601–9, oct 2013. 67, 312

[Hana 00] D. Hanahan and R. A. Weinberg. "The hallmarks of cancer.". *Cell*, Vol. 100, No. 1, pp. 57–70, jan 2000. 83, 85, 313

[Hani 17] F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi, and S. U. Simjee. "Glioblastoma Multiforme : A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment". *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, Vol. 18, No. 1, pp. 3–9, 2017. 23, 24

[Hara 11] H. Harada. "How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy ?". *Journal of radiation research*, Vol. 52, No. 5, pp. 545–56, 2011. 33

[Haus 16] A. K. Hauser, M. I. Mitov, E. F. Daley, R. C. McGarry, K. W. Anderson, and J. Z. Hilt. "Targeted iron oxide nanoparticles for the enhancement of radiation therapy". *Biomaterials*, Vol. 105, pp. 127–135, oct 2016. 72, 130, 152, 153, 313, 316

[Haut 03] D. Hautot, Q. A. Pankhurst, N. Khan, and J. Dobson. "Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue.". *Proceedings. Biological sciences*, Vol. 270 Suppl, No. Suppl 1, pp. S62–4, aug 2003. 257

[Helm 89] R. J. Helmke, V. F. German, and J. A. Mangos. "A continuous alveolar macrophage cell line : Comparisons with freshly derived alveolar macrophages". *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Vol. 25, No. 1, pp. 44–48, jan 1989. 271

[Heri 18] F. Herisson, V. Frodermann, G. Courties, D. Rohde, Y. Sun, K. Vandoorne, G. R. Wojtkiewicz, G. S. Masson, C. Vinegoni, J. Kim, D.-E. Kim, R. Weissleder, F. K. Swirski, M. A. Moskowitz, and M. Nahrendorf. "Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration". *Nature Neuroscience*, Vol. 21, No. 9, pp. 1209–1217, sep 2018. 226, 227

[Hohn 13] M. Hohnholt and R. Dringen. "Uptake and metabolism of iron and iron oxide nanoparticles in brain astrocytes : Figure 1". *Biochemical Society Transactions*, Vol. 41, No. 6, pp. 1588–1592, dec 2013. 152, 153, 316

[Hout 06] J. H. Houtgraaf, J. Versmissen, and W. J. van der Giessen. "A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells". *Cardiovascular Revascularization Medicine*, Vol. 7, No. 3, pp. 165–172, jul 2006. 55, 57, 150, 312

[Huan 13] G. Huang, H. Chen, Y. Dong, X. Luo, H. Yu, Z. Moore, E. A. Bey, D. A. Boothman, and J. Gao. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles : Amplifying ROS Stress to Improve Anticancer Drug Efficacy". *Theranostics*, Vol. 3, No. 2, pp. 116–126, 2013. 153

[Hyny 05] K. Hynynen, N. McDannold, N. A. Sheikov, F. A. Jolesz, and N. Vykhodtseva. "Local and reversible blood–brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications". *NeuroImage*, Vol. 24, No. 1, pp. 12–20, jan 2005. 91

[Irwi 14] C. P. Irwin, Y. Portorreal, C. Brand, Y. Zhang, P. Desai, B. Salinas, W. A. Weber, and T. Reiner. "PARPi-FL–a fluorescent PARP1 inhibitor for glioblastoma imaging.". *Neoplasia (New York, N.Y.)*, Vol. 16, No. 5, pp. 432–40, may 2014. 191

[Iver 11] T.-G. Iversen, T. Skotland, and K. Sandvig. "Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles : Present knowledge and need for future studies". *Nano Today*, Vol. 6, No. 2, pp. 176–185, apr 2011.

[Iwam 90] K. S. Iwamoto, A. Norman, A. R. Kagan, M. Wollin, A. Olch, J. Bellotti, M. Ingram, and R. G. Skillen. "The CT scanner as a therapy machine.". *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Vol. 19, No. 4, pp. 337–43, dec 1990. 61

[Iwam 93] K. S. Iwamoto, A. Norman, D. B. Freshwater, M. Ingram, and R. G. Skillen. "Diagnosis and treatment of spontaneous canine brain tumors with a CT scanner.". *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Vol. 26, No. 1, pp. 76–8, jan 1993. 61

[Jahn 11] M. R. Jahn, H. B. Andreasen, S. Fütterer, T. Nawroth, V. Schünemann, U. Kolb, W. Hofmeister, M. Muñoz, K. Bock, M. Meldal, and P. Langguth. "A comparative study of the physicochemical properties of iron isomaltoside 1000 (Monofer®), a new intravenous iron preparation and its clinical implications". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 78, No. 3, pp. 480–491, aug 2011. 124, 266

[Je m 14] "Je m'informe sur le cancer.". 2014. 20

[Jema 11] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. "Global cancer statistics". *CA : A Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 61, No. 2, pp. 69–90, mar 2011. 21

[Jeon 16] J.-K. Jeon, S.-M. Han, S.-K. Min, S.-J. Seo, K. Ihm, W.-S. Chang, and J.-K. Kim. "Coulomb nanoradiator-mediated, site-specific thrombolytic proton treatment with a traversing pristine Bragg peak". *Scientific Reports*, Vol. 6, No. 1, p. 37848, dec 2016. 267

[Jian 15] P.-S. Jiang, C.-F. Yu, C.-Y. Yen, C. W. Woo, S.-H. Lo, Y.-K. Huang, J.-H. Hong, and C.-S. Chiang. "Irradiation Enhances the Ability of Monocytes as Nanoparticle Carrier for Cancer Therapy". *PLOS ONE*, Vol. 10, No. 9, p. e0139043, sep 2015. 89, 90, 225, 226, 313

[Joe 02] A. K. Joe, H. Liu, M. Suzui, M. E. Vural, D. Xiao, and I. B. Weinstein. "Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines.". *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Vol. 8, No. 3, pp. 893–903, mar 2002. 151, 316

[Jovc 13] I. Jovcevska, N. Kocevar, and R. Komel. "Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know ?". *Molecular and Clinical Oncology*, Vol. 1, No. 6, pp. 935–941, nov 2013. 24

[Khoe 14] S. Khoei, S. R. Mahdavi, H. Fakhimikabir, A. Shakeri-Zadeh, and A. Hashemian. "The role of iron oxide nanoparticles in the radiosensitization of human prostate carcinoma cell line DU145 at megavoltage radiation energies". *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 90, No. 5, pp. 351–356, may 2014. 68, 72, 313

[Khos 17] K. Khoshgard, P. Kiani, A. Haghparast, L. Hosseinzadeh, and M. T. Eivazi. "Radiation dose rate affects the radiosensitization of MCF-7 and HeLa cell lines to X-rays induced by dextran-coated iron oxide nanoparticles". *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 93, No. 8, pp. 757–763, aug 2017. 72, 313

[Kim 10a] J.-K. Kim, S.-J. Seo, K.-H. Kim, T.-J. Kim, M.-H. Chung, K.-R. Kim, and T.-K. Yang. "Therapeutic application of metallic nanoparticles combined with particle-induced x-ray emission effect". *Nanotechnology*, Vol. 21, No. 42, p. 425102, oct 2010. 124, 267, 268

[Kim 10b] J.-K. Kim, S.-J. Seo, K.-H. Kim, T.-J. Kim, M.-H. Chung, K.-R. Kim, and T.-K. Yang. "Therapeutic application of metallic nanoparticles combined with particle-induced x-ray emission effect". *Nanotechnology*, Vol. 21, No. 42, p. 425102, oct 2010. 126, 129, 315

[Kim 93] W. H. Kim, C. Y. Chon, Y. M. Moon, J. K. Kang, I. S. Park, and H. J. Choi. "Effect of anticancer drugs and desferrioxamine in combination with radiation on hepatoma cell lines". *Yonsei Medical Journal*, Vol. 34, No. 1, p. 45, mar 1993. 191

[Kioi 10] M. Kioi, H. Vogel, G. Schultz, R. M. Hoffman, G. R. Harsh, and J. M. Brown. "Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice". *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 120, No. 3, pp. 694–705, mar 2010. 86, 87, 227, 256, 262, 313

[Klei 12a] S. Klein, A. Sommer, L. V. Distel, W. Neuhuber, and C. Kryschi. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 425, No. 2, pp. 393–397, aug 2012. 72, 152, 253, 313

[Klei 12b] A. Kleinauskas, J.-K. Kim, G.-H. Choi, H.-T. Kim, K. Røe, and P. Juzenas. "Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles for Cancer Theranostics". *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 1, No. 4, pp. 271–283, dec 2012. 72, 130, 313, 315

[Klei 14] S. Klein, A. Sommer, L. V. R. Distel, J.-L. Hazemann, W. Kröner, W. Neuhuber, P. Müller, O. Proux, and C. Kryschi. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Novel X-ray Enhancer for Low-Dose Radiation Therapy". *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 118, No. 23, pp. 6159–6166, jun 2014. 72, 133, 313

[Krau 79] M. O. Krause. "Atomic radiative and radiationless yields for K and L shells". *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, Vol. 8, No. 2, pp. 307–327, apr 1979. 250, 321

[Kroe 09] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, and Nomenclature Committee on Cell Death 2009. "Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009". *Cell Death & Differentiation*, Vol. 16, No. 1, pp. 3–11, jan 2009. 56

[Kuhn 14] D. A. Kuhn, D. Vanhecke, B. Michen, F. Blank, P. Gehr, A. Petri-Fink, and B. Rothen-Rutishauser. "Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages". *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Vol. 5, pp. 1625–1636, sep 2014.

[Kuln 08] S. Kulnigg, S. Stoinov, V. Simanenkov, L. V. Dudar, W. Karnafel, L. C. Garcia, A. M. Sambuelli, G. D'Haens, and C. Gasche. "A Novel Intravenous Iron Formulation for Treatment of Anemia in Inflammatory Bowel Disease : The Ferric Carboxymaltose (FERINJECT ®) Randomized Controlled Trial". *The American Journal of Gastroenterology*, Vol. 103, No. 5, pp. 1182–1192, may 2008. 267

[Kuma 10] S. Kumari, S. MG, and S. Mayor. "Endocytosis unplugged : multiple ways to enter the cell". *Cell Research*, Vol. 20, No. 3, pp. 256–275, mar 2010.

[Kunc 18] Z. Kuncic and S. Lacombe. "Nanoparticle radio-enhancement : principles, progress and application to cancer treatment". *Physics in Medicine & Biology*, Vol. 63, No. 2, p. 02TR01, jan 2018. 67, 312

[Lacr 01] M. Lacroix, D. Abi-Said, D. R. Fourney, Z. L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F. F. Lang, I. E. McCutcheon, S. J. Hassenbusch, E. Holland, K. Hess, C. Michael, D. Miller,

and R. Sawaya. “A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme : prognosis, extent of resection, and survival”. *Journal of Neurosurgery*, Vol. 95, No. 2, pp. 190–198, aug 2001. 26

[Lais 07] J. Laissue, H. Blattmann, H. P. Wagner, M. A. Grotzer, and D. N. Slatkin. “Prospects for microbeam radiation therapy of brain tumours in children to reduce neurological sequelae”. *Developmental Medicine & Child Neurology*, Vol. 49, No. 8, pp. 577–581, aug 2007. 40, 312

[Land 09] F. K. van Landeghem, K. Maier-Hauff, A. Jordan, K.-T. Hoffmann, U. Gneveckow, R. Scholz, B. Thiesen, W. Brück, and A. von Deimling. “Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles”. *Biomaterials*, Vol. 30, No. 1, pp. 52–57, jan 2009. 76, 80, 313

[Lang 08] T. S. Lange, K. K. Kim, R. K. Singh, R. M. Strongin, C. K. McCourt, and L. Brard. “Iron(III)-Salophene : An Organometallic Compound with Selective Cytotoxic and Anti-Proliferative Properties in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells”. *PLoS ONE*, Vol. 3, No. 5, p. e2303, may 2008. 151, 316

[Laur 16] G. Laurent, C. Bernhard, S. Dufort, G. Jiménez Sánchez, R. Bazzi, F. Boschetti, M. Moreau, T. H. Vu, B. Collin, A. Oudot, N. Herath, H. Requardt, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, M. Dutreix, M. Meyer, F. Brunotte, P. Perriat, F. Lux, O. Tillement, G. Le Duc, F. Denat, and S. Roux. “Minor changes in the macrocyclic ligands but major consequences on the efficiency of gold nanoparticles designed for radiosensitization.”. *Nanoscale*, Vol. 8, No. 23, pp. 12054–65, jun 2016. 67, 312

[Le D 11] G. Le Duc, I. Miladi, C. Alric, P. Mowat, E. Bräuer-Krisch, A. Bouchet, E. Khalil, C. Billotey, M. Janier, F. Lux, T. Epicier, P. Perriat, S. Roux, and O. Tillement. “Toward an Image-Guided Microbeam Radiation Therapy Using Gadolinium-Based Nanoparticles”. *ACS Nano*, Vol. 5, No. 12, pp. 9566–9574, dec 2011. 67, 312

[Lech 11] E. Lechtman, N. Chattopadhyay, Z. Cai, S. Mashouf, R. Reilly, and J. P. Pignol. “Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location”. *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 56, No. 15, pp. 4631–4647, aug 2011. 104, 179

[Lee 16] S. Y. Lee. “Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme”. *Genes & Diseases*, Vol. 3, No. 3, pp. 198–210, sep 2016. 27

[Lipa 08] J. D. Lipani, P. S. Jackson, S. G. Soltys, K. Sato, and J. R. Adler. “Survival following CyberKnife Radiosurgery and Hypofractionated Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme”. *Technology in Cancer Research & Treatment*, Vol. 7, No. 3, pp. 249–255, jun 2008. 38

[Liu 14] H.-L. Liu, C.-H. Fan, C.-Y. Ting, and C.-K. Yeh. “Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors : current progress and overview.”. *Theranostics*, Vol. 4, No. 4, pp. 432–44, 2014. 91, 230, 234, 321

[Loma 13] M. Lomax, L. Folkes, and P. O’Neill. “Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage : Relevance to Radiotherapy”. *Clinical Oncology*, Vol. 25, No. 10, pp. 578–585, oct 2013. 56, 312

[Lore 13] S. Lorentini, D. Amelio, M. G. Giri, F. Fellin, G. Meliadò, A. Rizzotti, M. Amichetti, and M. Schwarz. “IMRT or 3D-CRT in Glioblastoma ? A Dosimetric Criterion for Patient Selection”. *Technology in Cancer Research & Treatment*, Vol. 12, No. 5, pp. 411–420, oct 2013. 38

[Loui 07] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues. "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.". *Acta neuropathologica*, Vol. 114, No. 2, pp. 97–109, aug 2007. 22

[Luno 11] O. Lunov, V. Zablotskii, T. Syrovets, C. Röcker, K. Tron, G. U. Nienhaus, and T. Simmet. "Modeling receptor-mediated endocytosis of polymer-functionalized iron oxide nanoparticles by human macrophages". *Biomaterials*, Vol. 32, No. 2, pp. 547–555, jan 2011.

[Luo 15] C. Luo, Y. Li, L. Yang, X. Wang, J. Long, and J. Liu. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles exacerbate the risks of reactive oxygen species-mediated external stresses". *Archives of Toxicology*, Vol. 89, No. 3, pp. 357–369, mar 2015. 153

[Luth 13] E. M. Luther, C. Petters, F. Bulcke, A. Kaltz, K. Thiel, U. Bickmeyer, and R. Dringen. "Endocytotic uptake of iron oxide nanoparticles by cultured brain microglial cells". *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, No. 9, pp. 8454–8465, sep 2013.

[Lyse 09] K. A. Lyseng-Williamson and G. M. Keating. "Ferric Carboxymaltose". *Drugs*, Vol. 69, No. 6, pp. 739–756, 2009. 266

[Mads 12] S. J. Madsen, S.-K. Baek, A. R. Makkouk, T. Krasieva, and H. Hirschberg. "Macrophages as Cell-Based Delivery Systems for Nanoshells in Photothermal Therapy". *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 40, No. 2, pp. 507–515, feb 2012. 88

[Mads 13] S. J. Madsen, H. M. Gach, S. J. Hong, F. A. Uzal, Q. Peng, and H. Hirschberg. "Increased nanoparticle-loaded exogenous macrophage migration into the brain following PDT-induced blood-brain barrier disruption". *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol. 45, No. 8, pp. n/a–n/a, aug 2013. 88, 89, 214, 225, 313

[Mads 15] S. J. Madsen, C. Christie, S. J. Hong, A. Trinidad, Q. Peng, F. A. Uzal, and H. Hirschberg. "Nanoparticle-loaded macrophage-mediated photothermal therapy : potential for glioma treatment". *Lasers in Medical Science*, Vol. 30, No. 4, pp. 1357–1365, may 2015. 88, 89, 214, 225, 228, 256, 313

[Mafa 16] H. Mafakhei, K. Khoshgard, A. Haghparast, A. Mostafaie, M.-T. Eivazi, and M. Rezaei. "Investigating the Radiosensitivity Effect of Dextran-coated Iron Oxide Nanoparticles on Cervical Cancerous Cells Irradiated with 6 MV Photon Beams". *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, Vol. 25, No. 133, pp. 162–170, 2016. 68, 72, 313

[Mahe 16] B. A. Maher, I. A. M. Ahmed, V. Karloukovski, D. A. MacLaren, P. G. Foulds, D. Allsop, D. M. A. Mann, R. Torres-Jardón, and L. Calderon-Garciduenas. "Magnetite pollution nanoparticles in the human brain.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 113, No. 39, pp. 10797–801, sep 2016. 257

[Mahm 10] M. Mahmoudi, A. Simchi, M. Imani, M. A. Shokrgozar, A. S. Milani, U. O. Häfeli, and P. Stroeve. "A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles". *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, Vol. 75, No. 1, pp. 300–309, jan 2010. 149, 177

[Mahm 18] K. Mahmoudi, A. Bouras, D. Bozec, R. Ivkov, and C. Hadjipanayis. "Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma : a review of the therapy's history, efficacy and application in humans". *International Journal of Hyperthermia*, pp. 1–13, feb 2018. 33

[Man 07] S. Man, E. E. Ubogu, and R. M. Ransohoff. "Inflammatory Cell Migration into the Central Nervous System : A Few New Twists on an Old Tale". *Brain Pathology*, Vol. 17, No. 2, pp. 243–250, apr 2007. 82

[Mart 16] G. Martínez-Criado, J. Villanova, R. Tucoulou, D. Salomon, J.-P. Suuronen, S. Labouré, C. Guilloud, V. Valls, R. Barrett, E. Gagliardini, Y. Dabin, R. Baker, S. Bohic, C. Cohen, and J. Morse. "ID16B : a hard X-ray nanoprobe beamline at the ESRF for nano-analysis". *Journal of Synchrotron Radiation*, Vol. 23, No. 1, pp. 344–352, jan 2016. 282

[Math 07] D. Mathieu, R. Lecomte, A. M. Tsanaclis, A. Larouche, and D. Fortin. "Standardization and Detailed Characterization of the Syngeneic Fischer/F98 Glioma Model". *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, Vol. 34, No. 03, pp. 296–306, aug 2007. 275

[Mazu 13] C. M. Mazur, J. A Tate, R. R. Strawbridge, D. J. Gladstone, and P. J. Hoopes. "Iron oxide nanoparticle enhancement of radiation cytotoxicity.". *Proceedings of SPIE–the International Society for Optical Engineering*, Vol. 8584, p. 85840J, feb 2013. 72, 146, 313

[McMa 11] S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, G. Schettino, G. R. Dickson, A. R. Hounsell, J. M. O'Sullivan, K. M. Prise, D. G. Hirst, and F. J. Currell. "Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles.". *Scientific reports*, Vol. 1, p. 18, 2011. 104

[McQu 15] C. McQuade, A. Al Zaki, Y. Desai, M. Vido, T. Sakhuja, Z. Cheng, R. J. Hickey, D. Joh, S.-J. Park, G. Kao, J. F. Dorsey, and A. Tsourkas. "A Multifunctional Nanoplatform for Imaging, Radiotherapy, and the Prediction of Therapeutic Response". *Small*, Vol. 11, No. 7, pp. 834–843, feb 2015. 67, 312

[Mell 83] R. S. Mello, H. Callisen, J. Winter, A. R. Kagan, and A. Norman. "Radiation dose enhancement in tumors with iodine". *Medical Physics*, Vol. 10, No. 1, pp. 75–78, jan 1983. 11, 60, 61

[Mesa 99] A. V. Mesa, A. Norman, T. D. Solberg, J. J. Demarco, and J. B. Smathers. "Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents". *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 44, No. 8, pp. 1955–1968, aug 1999. 61

[Mila 14] I. Miladi, C. Alric, S. Dufort, P. Mowat, A. Dutour, C. Mandon, G. Laurent, E. Bräuer-Krisch, N. Herath, J.-L. Coll, M. Dutreix, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, G. Le Duc, S. Roux, and O. Tillement. "The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents". *Small*, Vol. 10, No. 6, pp. 1116–1124, mar 2014. 67, 312

[Misc 04] P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, and S. F. Nelson. "DNA-microarray analysis of brain cancer : molecular classification for therapy". *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 5, No. 10, pp. 782–792, oct 2004. 22, 23, 35

[Mizu 16] M. Mizumoto, T. Yamamoto, E. Ishikawa, M. Matsuda, S. Takano, H. Ishikawa, T. Okumura, H. Sakurai, A. Matsumura, and K. Tsuboi. "Proton beam therapy with concurrent chemotherapy for glioblastoma multiforme : comparison of nimustine hydrochloride and temozolomide". *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 130, No. 1, pp. 165–170, oct 2016. 41

[Moha 17] O. Mohamad, B. Sishc, J. Saha, A. Pompos, A. Rahimi, M. Story, A. Davis, and D. Kim. "Carbon Ion Radiotherapy : A Review of Clinical Experiences and Preclinical

Research, with an Emphasis on DNA Damage/Repair". *Cancers*, Vol. 9, No. 12, p. 66, jun 2017. 28, 41, 312

[Moon 14] R. Mooney, Y. Weng, R. Tirughana-Sambandan, V. Valenzuela, S. Aramburo, E. Garcia, Z. Li, M. Gutova, A. J. Annala, J. M. Berlin, and K. S. Aboody. "Neural stem cells improve intracranial nanoparticle retention and tumor-selective distribution". *Future Oncology*, Vol. 10, No. 3, pp. 401–415, feb 2014. 90

[Mora 79] R. A. Morantz, G. W. Wood, M. Foster, M. Clark, and K. Gollahon. "Macrophages in experimental and human brain tumors". *Journal of Neurosurgery*, Vol. 50, No. 3, pp. 305–311, mar 1979. 85

[Mull 07] K. Müller, J. N. Skepper, M. Posfai, R. Trivedi, S. Howarth, C. Corot, E. Lancelot, P. W. Thompson, A. P. Brown, and J. H. Gillard. "Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro". *Biomaterials*, Vol. 28, No. 9, pp. 1629–1642, mar 2007. 208

[Muth 15] M. Muthana, A. J. Kennerley, R. Hughes, E. Fagnano, J. Richardson, M. Paul, C. Murdoch, F. Wright, C. Payne, M. F. Lythgoe, N. Farrow, J. Dobson, J. Conner, J. M. Wild, and C. Lewis. "Directing cell therapy to anatomic target sites in vivo with magnetic resonance targeting". *Nature Communications*, Vol. 6, No. 1, p. 8009, dec 2015. 68, 89, 216, 251, 313

[Nair 17] M. Nairz, I. Theurl, F. K. Swirski, and G. Weiss. ""Pumping iron"—how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, Vol. 469, No. 3-4, pp. 397–418, apr 2017.

[Nanc 14] E. Nance, C. Zhang, T.-Y. Shih, Q. Xu, B. S. Schuster, and J. Hanes. "Brain-Penetrating Nanoparticles Improve Paclitaxel Efficacy in Malignant Glioma Following Local Administration". *ACS Nano*, Vol. 8, No. 10, pp. 10655–10664, oct 2014. 81

[Neis 15] S. Neiser, D. Rentsch, U. Dippon, A. Kappler, P. G. Weidler, J. Göttlicher, R. Steininger, M. Wilhelm, M. Braitsch, F. Funk, E. Philipp, and S. Burckhardt. "Physico-chemical properties of the new generation IV iron preparations ferumoxytol, iron isomaltoside 1000 and ferric carboxymaltose". *BioMetals*, Vol. 28, No. 4, pp. 615–635, aug 2015. 266

[Nels 14] D. Nelson, S. Fisher, and B. Robinson. "The "Trojan Horse" Approach to Tumor Immunotherapy : Targeting the Tumor Microenvironment". *Journal of Immunology Research*, Vol. 2014, pp. 1–14, 2014. 87

[Ngwa 13] W. Ngwa, H. Korideck, A. I. Kassis, R. Kumar, S. Sridhar, G. M. Makrigiorgos, and R. A. Cormack. "In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with I-125 brachytherapy seeds.". *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, Vol. 9, No. 1, pp. 25–7, jan 2013. 252

[Nikj 10] H. Nikjoo and L. Lindborg. "RBE of low energy electrons and photons". *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 55, No. 10, pp. R65–R109, may 2010. 116, 314

[Nikz 13] S. Nikzad, B. Hashemi, Z.-M. Hassan, and H. Mozdarani. "The Cell Survival of F10B16 Melanoma and 4T1 Breast Adenocarcinoma Irradiated to Gamma Radiation Using the MTT Assay Based on Two Different Calculation Methods.". *Journal of biomedical physics & engineering*, Vol. 3, No. 2, pp. 29–36, jun 2013. 191

[Norm 78] A. Norman, F. H. Adams, and R. F. Riley. "Cytogenetic Effects of Contrast Media and Triiodobenzoic Acid Derivatives in Human Lymphocytes". *Radiology*, Vol. 129, No. 1, pp. 199–203, oct 1978. 60

[Norm 97] A. Norman, M. Ingram, R. Skillen, D. Freshwater, K. Iwamoto, and T. Solberg. "X-ray phototherapy for canine brain masses". *Radiation Oncology Investigations*, Vol. 5, No. 1, pp. 8–14, 1997. 11, 61

[Obei 14] L. Obeid, P. Deman, A. Tessier, J. Balosso, F. Estève, and J.-F. Adam. "Absolute perfusion measurements and associated iodinated contrast agent time course in brain metastasis : a study for contrast-enhanced radiotherapy.". *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Vol. 34, No. 4, pp. 638–45, apr 2014. 244

[Ober 16] R. K. Oberoi, K. E. Parrish, T. T. Sio, R. K. Mittapalli, W. F. Elmquist, and J. N. Sarkaria. "Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood–brain barrier to treat glioblastoma". *Neuro-Oncology*, Vol. 18, No. 1, pp. 27–36, jan 2016. 74, 79, 91

[Oh 14] N. Oh and J. H. Park. "Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells". *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 9 Suppl 1, p. 51, may 2014.

[Omar 06] S. Omar, M. Feki, and N. Kaabachi. "Le métabolisme du fer : revue générale et récents développements". *Annales de Biologie Clinique*, Vol. 64, No. 6, pp. 523–534, nov 2006.

[Ong 15] Q. Ong, F. H. Hochberg, and M. J. Cima. "Depot delivery of dexamethasone and cediranib for the treatment of brain tumor associated edema in an intracranial rat glioma model". *Journal of Controlled Release*, Vol. 217, pp. 183–190, nov 2015. 80

[Pang 16] L. Pang, J. Qin, L. Han, W. Zhao, J. Liang, Z. Xie, P. Yang, and J. Wang. "Exploiting macrophages as targeted carrier to guide nanoparticles into glioma.". *Oncotarget*, Vol. 7, No. 24, pp. 37081–37091, jun 2016. 88, 89, 313

[Park 12] J. Park, Y. Zhang, N. Vykhodtseva, F. A. Jolesz, and N. J. McDannold. "The kinetics of blood brain barrier permeability and targeted doxorubicin delivery into brain induced by focused ultrasound". *Journal of Controlled Release*, Vol. 162, No. 1, pp. 134–142, aug 2012. 92, 245

[Paul 17] L. B. de Paula, F. L. Primo, and A. C. Tedesco. "Nanomedicine associated with photodynamic therapy for glioblastoma treatment". *Biophysical Reviews*, Vol. 9, No. 5, pp. 761–773, oct 2017. 24

[Pawl 04] T. M. Pawlik and K. Keyomarsi. "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy". *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, Vol. 59, No. 4, pp. 928–942, jul 2004. 36

[Perr 07] J. Perry, A. Chambers, K. Spithoff, and N. Laperriere. "Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma : a systematic review.". *Current oncology (Toronto, Ont.)*, Vol. 14, No. 5, pp. 189–94, oct 2007. 27

[Pete 15] T. Peters, C. Grunewald, M. Blaickner, M. Ziegner, C. Schütz, D. Iffland, G. Hampel, T. Nawroth, and P. Langguth. "Cellular uptake and in vitro antitumor efficacy of composite liposomes for neutron capture therapy". *Radiation Oncology*, Vol. 10, No. 1, p. 52, feb 2015. 156

[Pett 16] C. Petters, K. Thiel, and R. Dringen. "Lysosomal iron liberation is responsible for the vulnerability of brain microglial cells to iron oxide nanoparticles : comparison with neurons and astrocytes". *Nanotoxicology*, Vol. 10, No. 3, pp. 332–342, mar 2016. 152

[Poig 17] F. Poignant, B. Gervais, A. Ipatov, H. Charfi, C. Monini, P.-J. Lartaud, E. Testa, and M. Beuve. "Modélisation biophysique de l'effet radiosensibilisant des nanoparticles à élément lourd". dec 2017. 102, 104

[Prey 17] U. H. Preya, K.-T. Lee, N.-J. Kim, J.-Y. Lee, D. S. Jang, and J.-H. Choi. "The natural terthiophene α-terthienylmethanol induces S phase cell cycle arrest of human ovarian cancer cells via the generation of ROS stress". *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 272, pp. 72–79, jun 2017. 151, 316

[Prez 17] Y. Prezado, G. Jouvion, D. Hardy, A. Patriarca, C. Nauraye, J. Bergs, W. González, C. Guardiola, M. Juchaux, D. Labiod, R. Dendale, L. Jourdain, C. Sebrie, and F. Pouzoulet. "Proton minibeam radiation therapy spares normal rat brain : Long-Term Clinical, Radiological and Histopathological Analysis". *Scientific Reports*, Vol. 7, No. 1, p. 14403, dec 2017. 42

[Pric 90] P. Price and T. J. McMillan. "Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation.". *Cancer research*, Vol. 50, No. 5, pp. 1392–6, mar 1990. 191

[Qian 10] B.-Z. Qian and J. W. Pollard. "Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis". *Cell*, Vol. 141, No. 1, pp. 39–51, apr 2010. 84, 85, 313

[Quat 12] J. G. Quatromoni and E. Eruslanov. "Tumor-associated macrophages : function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer.". *American journal of translational research*, Vol. 4, No. 4, pp. 376–89, 2012. 83, 84, 85, 313

[Quir 15] B. J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J. C. Vera, T. S. Mang, A. B. Foy, S. M. Lew, A. W. Girotti, S. Jogal, P. S. LaViolette, J. M. Connelly, and H. T. Whelan. "Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors – Where do we stand ?". *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Vol. 12, No. 3, pp. 530–544, sep 2015. 32

[Rebe 06] N. M. Rebenko-Moll, L. Liu, A. Cardona, and R. M. Ransohoff. "Chemokines, mononuclear cells and the nervous system : heaven (or hell) is in the details". *Current Opinion in Immunology*, Vol. 18, No. 6, pp. 683–689, dec 2006. 82

[Reti 15] P. Retif, S. Pinel, M. Toussaint, C. Frochot, R. Chouikrat, T. Bastogne, and M. Barberi-Heyob. "Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement : the Key Parameters.". *Theranostics*, Vol. 5, No. 9, pp. 1030–44, 2015. 66, 120, 184, 192, 250, 252, 259, 277

[Rey 17] S. Rey, L. Schito, M. Koritzinsky, and B. G. Wouters. "Molecular targeting of hypoxia in radiotherapy". *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 109, pp. 45–62, jan 2017. 42

[Robe 97] W. G. Roberts and G. E. Palade. "Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated.". *Cancer research*, Vol. 57, No. 4, pp. 765–72, feb 1997. 75

[Roel 12] E. Roelofs, M. Engelsman, C. Rasch, L. Persoon, S. Qamhiyeh, D. de Ruysscher, F. Verhaegen, M. Pijls-Johannesma, and P. Lambin. "Results of a Multicentric In Silico Clinical Trial (ROCOCO) : Comparing Radiotherapy with Photons and Protons for Non-small Cell Lung Cancer". *Journal of Thoracic Oncology*, Vol. 7, No. 1, pp. 165–176, jan 2012. 37, 41, 312

[Roge 10] M. Roger, A. Clavreul, M.-C. Venier-Julienne, C. Passirani, L. Sindji, P. Schiller, C. Montero-Menei, and P. Menei. "Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors". *Biomaterials*, Vol. 31, No. 32, pp. 8393–8401, nov 2010. 304

[Rogo 16] M. Rogosnitzky and S. Branch. "Gadolinium-based contrast agent toxicity : a review of known and proposed mechanisms". *BioMetals*, Vol. 29, No. 3, pp. 365–376, jun 2016. 273

[Rome 05] H. E. Romeijn, R. K. Ahuja, J. F. Dempsey, and A. Kumar. "A Column Generation Approach to Radiation Therapy Treatment Planning Using Aperture Modulation". *SIAM Journal on Optimization*, Vol. 15, No. 3, pp. 838–862, jan 2005. 35, 37, 38, 311

[Rose 99] J. H. Rose, A. Norman, M. Ingram, C. Aoki, T. Solberg, and A. Mesa. "First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx).". *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Vol. 45, No. 5, pp. 1127–32, dec 1999. 61

[Rous 07a] J. Rousseau, C. Boudou, R. F. Barth, J. Balosso, F. Esteve, and H. Elleaume. "Enhanced Survival and Cure of F98 Glioma Bearing Rats following Intracerebral Delivery of Carboplatin in Combination with Photon Irradiation". *Clinical Cancer Research*, Vol. 13, No. 17, pp. 5195–5201, sep 2007. 63, 312

[Rous 07b] J. Rousseau. *Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intratumorale de drogues antinéoplasiques*. PhD thesis, UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, 2007. 63, 66, 312

[Rous 09a] J. Rousseau, J.-F. Adam, P. Deman, T.-D. Wu, J.-L. Guerquin-Kern, B. Gouget, R. F. Barth, F. Estève, and H. Elleaume. "Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma". *Journal of Synchrotron Radiation*, Vol. 16, No. 4, pp. 573–581, jul 2009. 63, 312

[Rous 09b] J. Rousseau, R. F. Barth, M. L. Moeschberger, and H. Elleaume. "Efficacy of Intracerebral Delivery of Carboplatin in Combination With Photon Irradiation for Treatment of F98 Glioma-Bearing Rats". *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, Vol. 73, No. 2, pp. 530–536, feb 2009. 63, 195, 196, 312

[Rowi 10] D. H. Rowitch and A. R. Kriegstein. "Developmental genetics of vertebrate glial–cell specification". *Nature*, Vol. 468, No. 7321, pp. 214–222, nov 2010. 19, 20, 311

[Sale 17] F. Salehi, H. Behboudi, G. Kavoosi, and S. K. Ardestani. "Chitosan promotes ROS-mediated apoptosis and S phase cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells : evidence for intercalative interaction with genomic DNA". *RSC Advances*, Vol. 7, No. 68, pp. 43141–43150, sep 2017. 151, 316

[Salv 11] F. Salvat, J. M. Fernandez-Varea, and J. Sempau. *PENELOPE, a code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport*. 2011. 52, 102, 103, 106, 107, 314

[Sari 09] H. Sarin, A. S. Kanevsky, H. Wu, A. A. Sousa, C. M. Wilson, M. A. Aronova, G. L. Griffiths, R. D. Leapman, and H. Q. Vo. "Physiologic upper limit of pore size in the blood-tumor barrier of malignant solid tumors". *Journal of Translational Medicine*, Vol. 7, No. 1, p. 51, jun 2009. 75

[Scha 88] G. Schackert, R. D. Simmons, T. M. Buzbee, D. A. Hume, and I. J. Fidler. "Macrophage infiltration into experimental brain metastases : occurrence through an intact blood-brain barrier.". *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 80, No. 13, pp. 1027–34, sep 1988. 86

[Schm 16] R. S. Schmid, J. M. Simon, M. Vitucci, R. S. McNeill, R. E. Bash, A. M. Werneke, L. Huey, K. K. White, M. G. Ewend, J. Wu, and C. R. Miller. "Core pathway mutations induce de-differentiation of murine astrocytes into glioblastoma stem cells that are sensitive to radiation but resistant to temozolomide". *Neuro-Oncology*, Vol. 18, No. 7, pp. 962–973, jul 2016. 30

[Seib 05] J. A. Seibert and J. M. Boone. "X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2 : X-ray interactions and image formation.". *Journal of nuclear medicine technology*, Vol. 33, No. 1, pp. 3–18, mar 2005. 48, 312

[Sena 06] P. B. Senatus, Y. Li, C. Mandigo, G. Nichols, G. Moise, Y. Mao, M. D. Brown, R. C. Anderson, A. T. Parsa, P. W. Brandt-Rauf, J. N. Bruce, and R. L. Fine. "Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide.". *Molecular cancer therapeutics*, Vol. 5, No. 1, pp. 20–8, jan 2006. 150, 151

[Seo 13] S.-J. Seo, J.-K. Jeon, E.-J. Jeong, W.-S. Chang, G.-H. Choi, and J.-K. Kim. "Enhancement of Tumor Regression by Coulomb Nanoradiator Effect in Proton Treatment of Iron-Oxide Nanoparticle-Loaded Orthotopic Rat Glioma Model : Implication of Novel Particle Induced Radiation Therapy". *Journal of Cancer Therapy*, Vol. 04, No. 11, pp. 25–32, dec 2013. 129, 135, 255, 267

[Seo 17] Y.-E. Seo, T. Bu, and W. M. Saltzman. "Nanomaterials for convection-enhanced delivery of agents to treat brain tumors". *Current Opinion in Biomedical Engineering*, Vol. 4, pp. 1–12, dec 2017. 81, 313

[Siah 06] C. W. Siah, J. Ombiga, L. A. Adams, D. Trinder, and J. K. Olynyk. "Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders.". *The Clinical biochemist. Reviews*, Vol. 27, No. 1, pp. 5–16, feb 2006.

[Sime 14] I. Simeonova and E. Huillard. "In vivo models of brain tumors : roles of genetically engineered mouse models in understanding tumor biology and use in preclinical studies". *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 71, No. 20, pp. 4007–4026, oct 2014. 274, 276

[Sing 10] N. Singh, G. J. Jenkins, R. Asadi, and S. H. Doak. "Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)". *Nano Reviews*, Vol. 1, No. 1, p. 5358, jan 2010. 68, 131, 133, 153, 316

[Skol 10] K. Sköld, T. Gorlia, L. Pellettieri, V. Giusti, B. H-Stenstam, and J. W. Hopewell. "Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme : an assessment of clinical potential.". *The British journal of radiology*, Vol. 83, No. 991, pp. 596–603, jul 2010. 44

[Smil 18] H. M. Smilowitz, A. Meyers, K. Rahman, N. A. Dyment, D. Sasso, C. Xue, D. L. Oliver, A. Lichtler, X. Deng, S. M. Ridwan, L. J. Tarmu, Q. Wu, A. L. Salner, K. R. Bulsara, D. N. Slatkin, and J. F. Hainfeld. "Intravenously-injected gold nanoparticles (AuNPs) access intracerebral F98 rat gliomas better than AuNPs infused directly into the tumor site by convection enhanced delivery.". *International journal of nanomedicine*, Vol. 13, pp. 3937–3948, 2018. 255

[Snyd 77] R. Snyderman, M. C. Pike, D. G. Fischer, and H. S. Koren. "Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1.". *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Vol. 119, No. 6, pp. 2060–6, dec 1977. 269, 271

[Soen 10] S. J. H. Soenen, N. Nuytten, S. F. De Meyer, S. C. De Smedt, and M. De Cuyper. "High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling". *Small*, Vol. 6, No. 7, pp. 832–842, apr 2010. 149

[Solb 92] T. D. Solberg, K. S. Iwamoto, and A. Norman. "Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours.". *Physics in medicine and biology*, Vol. 37, No. 2, pp. 439–43, feb 1992. 61

[Soli 09] G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena. "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation". *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 86, No. 5, pp. 1065–1073, nov 2009. 21, 82, 83, 84, 85, 86, 313

[Son 16] K. H. Son, J. H. Hong, and J. W. Lee. "Carbon nanotubes as cancer therapeutic carriers and mediators.". *International journal of nanomedicine*, Vol. 11, pp. 5163–5185, 2016. 32, 33, 311

[Stam 10] R. Stam. "Electromagnetic fields and the blood–brain barrier". *Brain Research Reviews*, Vol. 65, No. 1, pp. 80–97, oct 2010. 74, 313

[Stri 04] H. M. Strik, M. Stoll, and R. Meyermann. "Immune cell infiltration of intrinsic and metastatic intracranial tumours.". *Anticancer research*, Vol. 24, No. 1, pp. 37–42, jan 2004. 86

[Stum 06] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. D. Wiestler, F. Zanella, H.-J. Reulen, and ALA-Glioma Study Group. "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma : a randomised controlled multicentre phase III trial.". *The Lancet. Oncology*, Vol. 7, No. 5, pp. 392–401, may 2006. 27

[Stup 14] R. Stupp, M. Brada, M. J. van den Bent, J.-C. Tonn, G. Pentheroudakis, and ESMO Guidelines Working Group. "High-grade glioma : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". *Annals of Oncology*, Vol. 25, No. suppl 3, pp. iii93–iii101, sep 2014. 11, 25, 27

[Stup 15] R. Stupp, S. Taillibert, A. A. Kanner, S. Kesari, D. M. Steinberg, S. A. Toms, L. P. Taylor, F. Lieberman, A. Silvani, K. L. Fink, G. H. Barnett, J.-J. Zhu, J. W. Henson, H. H. Engelhard, T. C. Chen, D. D. Tran, J. Sroubek, N. D. Tran, A. F. Hottinger, J. Landolfi, R. Desai, M. Caroli, Y. Kew, J. Honnorat, A. Idbaih, E. D. Kirson, U. Weinberg, Y. Palti, M. E. Hegi, and Z. Ram. "Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma". *JAMA*, Vol. 314, No. 23, p. 2535, dec 2015. 29, 31

[Subi 16] A. Subiel, R. Ashmore, and G. Schettino. "Standards and Methodologies for Characterizing Radiobiological Impact of High-Z Nanoparticles". *Theranostics*, Vol. 6, No. 10, pp. 1651–1671, 2016. 145, 192

[Suro 13] O. Surova and B. Zhivotovsky. "Various modes of cell death induced by DNA damage". *Oncogene*, Vol. 32, No. 33, pp. 3789–3797, aug 2013. 57, 312

[Taup 13] F. Taupin. *Nanoparticules et Rayonnement Synchrotron pour le Traitement des Tumeurs Cérébrales*. PhD thesis, Université de Grenoble, 2013. 12, 63, 268, 281, 291, 312

[Tell 15] O. van Tellingen, B. Yetkin-Arik, M. de Gooijer, P. Wesseling, T. Wurdinger, and H. de Vries. "Overcoming the blood–brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment". *Drug Resistance Updates*, Vol. 19, pp. 1–12, mar 2015. 75

[Thu 09] M. S. Thu, J. Najbauer, S. E. Kendall, I. Harutyunyan, N. Sangalang, M. Gutova, M. Z. Metz, E. Garcia, R. T. Frank, S. U. Kim, R. A. Moats, and K. S. Aboody. "Iron Labeling and Pre-Clinical MRI Visualization of Therapeutic Human Neural Stem Cells in a Murine Glioma Model". *PLoS ONE*, Vol. 4, No. 9, p. e7218, sep 2009. 90

[Thum 12] S. R. Thumma, A. L. Elaimy, N. Daines, A. R. Mackay, W. T. Lamoreaux, R. K. Fairbanks, J. J. Demakas, B. S. Cooke, and C. M. Lee. "Long-Term Survival after Gamma Knife Radiosurgery in a Case of Recurrent Glioblastoma Multiforme : A Case Report and Review of the Literature". *Case Reports in Medicine*, Vol. 2012, pp. 1–6, 2012. 39

[Tobi 13] A. L. Tobias, B. Thaci, B. Auffinger, E. Rincón, I. V. Balyasnikova, C. K. Kim, Y. Han, L. Zhang, K. S. Aboody, A. U. Ahmed, and M. S. Lesniak. "The Timing of Neural Stem Cell-Based Virotherapy Is Critical for Optimal Therapeutic Efficacy When Applied With Radiation and Chemotherapy for the Treatment of Glioblastoma". *STEM CELLS Translational Medicine*, Vol. 2, No. 9, pp. 655–666, sep 2013. 227, 228

[Tong 16] H.-I. Tong, W. Kang, Y. Shi, G. Zhou, and Y. Lu. "Physiological function and inflamed-brain migration of mouse monocyte-derived macrophages following cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles—Implication of macrophage-based drug delivery into the central nervous system". *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 505, No. 1-2, pp. 271–282, may 2016. 89, 207, 209, 216, 223, 253, 313

[Tort 13] S. V. Torti and F. M. Torti. "Iron and cancer : more ore to be mined.". *Nature reviews. Cancer*, Vol. 13, No. 5, pp. 342–55, may 2013. 256

[Tyle 10] B. Tyler, K. D. Fowers, K. W. Li, V. R. Recinos, J. M. Caplan, A. Hdeib, R. Grossman, L. Basaldella, K. Bekelis, G. Pradilla, F. Legnani, and H. Brem. "A thermal gel depot for local delivery of paclitaxel to treat experimental brain tumors in rats". *Journal of Neurosurgery*, Vol. 113, No. 2, pp. 210–217, aug 2010. 80

[Urhi 18] O. Urhie, R. Turner, B. Lucke-Wold, W. Radwan, J. Ahn, K. Gyure, and S. Bhatia. "Glioblastoma Survival Outcomes at a Tertiary Hospital in Appalachia : Factors Impacting the Survival of Patients Following Implementation of the Stupp Protocol". *World Neurosurgery*, apr 2018. 26

[Vala 07] S. Valable, E. L. Barbier, M. Bernaudin, S. Roussel, C. Segebarth, E. Petit, and C. Rémy. "In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma". *NeuroImage*, Vol. 37, pp. S47–S58, jan 2007. 89, 90, 214, 227, 256, 262, 270, 313

[Vatn 15] R. E. Vatner and S. C. Formenti. "Myeloid-Derived Cells in Tumors : Effects of Radiation". *Seminars in Radiation Oncology*, Vol. 25, No. 1, pp. 18–27, jan 2015. 87

[Verc 11] D. Vercauteren, M. Piest, L. J. van der Aa, M. Al Soraj, A. T. Jones, J. F. Engbersen, S. C. De Smedt, and K. Braeckmans. "Flotillin-dependent endocytosis and a phagocytosis-like mechanism for cellular internalization of disulfide-based poly(amido amine)/DNA polyplexes". *Biomaterials*, Vol. 32, No. 11, pp. 3072–3084, apr 2011.

[Vill 18] F. Villar, L. Andre, R. Baker, S. Bohic, J. C. da Silva, C. Guilloud, O. Hignette, J. Meyer, A. Pacureanu, M. Perez, M. Salome, P. van der Linden, Y. Yang, and P. Cloetens. "Nanopositioning for the ESRF ID16A Nano-Imaging Beamline". *Synchrotron Radiation News*, Vol. 31, No. 5, pp. 9–14, sep 2018. 282

[Vino 14] S. Vinogradov, G. Warren, and X. Wei. "Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates". *Nanomedicine*, Vol. 9, No. 5, pp. 695–707, apr 2014. 83, 85, 207, 313

[Voin 11] M. A. Voinov, J. O. Sosa Pagán, E. Morrison, T. I. Smirnova, and A. I. Smirnov. "Surface-mediated production of hydroxyl radicals as a mechanism of iron oxide na-

noparticle biotoxicity.". *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 133, No. 1, pp. 35–41, jan 2011. 153

[Vuke 07] S. J. Vukelja, S. P. Anthony, J. C. Arseneau, B. S. Berman, C. C. Cunningham, J. J. Nemunaitis, W. E. Samlowski, and K. D. Fowers. "Phase 1 study of escalating-dose OncoGel (ReGel/paclitaxel) depot injection, a controlled-release formulation of paclitaxel, for local management of superficial solid tumor lesions.". *Anti-cancer drugs*, Vol. 18, No. 3, pp. 283–9, mar 2007. 80

[Walk 78] M. D. Walker, E. Alexander, W. E. Hunt, C. S. MacCarty, M. S. Mahaley, J. Mealey, H. A. Norrell, G. Owens, J. Ransohoff, C. B. Wilson, E. A. Gehan, and T. A. Strike. "Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas". *Journal of Neurosurgery*, Vol. 49, No. 3, pp. 333–343, sep 1978. 28, 311

[Wang 09] Z. Wang, C. Tiruppathi, R. D. Minshall, and A. B. Malik. "Size and Dynamics of Caveolae Studied Using Nanoparticles in Living Endothelial Cells". *ACS Nano*, Vol. 3, No. 12, pp. 4110–4116, dec 2009.

[Wang 11] J. Wang and K. Pantopoulos. "Regulation of cellular iron metabolism". *Biochemical Journal*, Vol. 434, No. 3, pp. 365–381, mar 2011. 152

[Wang 12] H. Wang, L. Wu, and B. M. Reinhard. "Scavenger Receptor Mediated Endocytosis of Silver Nanoparticles into J774A.1 Macrophages Is Heterogeneous". *ACS Nano*, Vol. 6, No. 8, pp. 7122–7132, aug 2012.

[Wang 15] S. Wang, A. Riedinger, H. Li, C. Fu, H. Liu, L. Li, T. Liu, L. Tan, M. J. Barthel, G. Pugliese, F. De Donato, M. Scotto D'Abbusco, X. Meng, L. Manna, H. Meng, and T. Pellegrino. "Plasmonic Copper Sulfide Nanocrystals Exhibiting Near-Infrared Photothermal and Photodynamic Therapeutic Effects". *ACS Nano*, Vol. 9, No. 2, pp. 1788–1800, feb 2015. 32, 33, 311

[Wang 18] H. Wang, X. Mu, H. He, and X.-D. Zhang. "Cancer Radiosensitizers.". *Trends in pharmacological sciences*, Vol. 39, No. 1, pp. 24–48, jan 2018. 42

[Wei 12] X. Wei, L. Zhou, L. Hu, and Y. Huang. "Tanshinone IIA arrests cell cycle and induces apoptosis in 786-O human renal cell carcinoma cells.". *Oncology letters*, Vol. 3, No. 5, pp. 1144–1148, may 2012. 151, 316

[Weis 08] J. Weischenfeldt and B. Porse. "Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM) : Isolation and Applications.". *CSH protocols*, Vol. 2008, No. 12, p. pdb.prot5080, dec 2008. 271

[Weis 14] R. Weissleder, M. Nahrendorf, and M. J. Pittet. "Imaging macrophages with nanoparticles". *Nature Materials*, Vol. 13, No. 2, pp. 125–138, feb 2014. 98, 314

[Well 17] M. Weller, N. Butowski, D. D. Tran, L. D. Recht, M. Lim, H. Hirte, L. Ashby, L. Mechtler, S. A. Goldlust, F. Iwamoto, J. Drappatz, D. M. O'Rourke, M. Wong, M. G. Hamilton, G. Finocchiaro, J. Perry, W. Wick, J. Green, Y. He, C. D. Turner, M. J. Yellin, T. Keler, T. A. Davis, R. Stupp, J. H. Sampson, N. Butowski, J. Campian, L. Recht, M. Lim, L. Ashby, J. Drappatz, H. Hirte, F. Iwamoto, L. Mechtler, S. Goldlust, K. Becker, G. Barnett, G. Nicholas, A. Desjardins, T. Benkers, N. Wagle, M. Groves, S. Kesari, Z. Horvath, R. Merrell, R. Curry, J. O'Rourke, D. Schuster, M. Wong, M. Mrugala, R. Jensen, J. Trusheim, G. Lesser, K. Belanger, A. Sloan, B. Purow, K. Fink, J. Raizer, M. Schulder, S. Nair, S. Peak, J. Perry, A. Brandes, M. Weller, N. Mohile, J. Landolfi, J. Olson, G. Finocchiaro, R. Jennens, P. DeSouza, B. Robinson, M. Crittenden, K. Shih, A. Flowers, S. Ong, J. Connelly, C. Hadjipanayis, P. Giglio, F. Mott,

D. Mathieu, N. Lessard, S. J. Sepulveda, J. Lövey, H. Wheeler, P.-L. Inglis, C. Hardie, D. Bota, M. Lesniak, J. Portnow, B. Frankel, L. Junck, R. Thompson, L. Berk, J. McGhie, D. Macdonald, F. Saran, R. Soffietti, D. Blumenthal, S. B. C. M. André de, A. Nowak, N. Singhal, A. Hottinger, A. Schmid, G. Srkalovic, D. Baskin, C. Fadul, L. Nabors, R. LaRocca, J. Villano, N. Paleologos, P. Kavan, M. Pitz, B. Thiessen, A. Idbaih, J. S. Frenel, J. Domont, O. Grauer, P. Hau, C. Marosi, J. Sroubek, E. Hovey, P. Sridhar, L. Cher, E. Dunbar, T. Coyle, J. Raymond, K. Barton, M. Guarino, S. Raval, B. Stea, J. Dietrich, K. Hopkins, S. Erridge, J.-P. Steinbach, L. E. Pineda, Q. C. Balana, B. B. Sonia del, M. Wenczl, K. Molnár, K. Hideghéty, A. Lossos, L. Myra van, A. Levy, R. Harrup, W. Patterson, Z. Lwin, S. Sathornsumetee, E.-J. Lee, J.-T. Ho, S. Emmons, J. P. Duic, S. Shao, H. Ashamalla, M. Weaver, J. Lutzky, N. Avgeropoulos, W. Hanna, M. Nadipuram, G. Cecchi, R. O'Donnell, S. Pannullo, J. Carney, M. Hamilton, M. MacNeil, R. Beaney, M. Fabbro, O. Schnell, R. Fietkau, G. Stockhammer, B. Malinova, K. Odrazka, M. Sames, G. Miguel Gil, E. Razis, K. Lavrenkov, G. Castro, F. Ramirez, C. Baldotto, F. Viola, S. Malheiros, J. Lickliter, S. Gauden, A. Dechaphunkul, I. Thaipisuttikul, Z. Thotathil, H.-I. Ma, W.-Y. Cheng, C.-H. Chang, F. Salas, P.-Y. Dietrich, C. Mamot, L. Nayak, and S. Nag. "Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV) : a randomised, double-blind, international phase 3 trial". *The Lancet Oncology*, Vol. 18, No. 10, pp. 1373–1385, oct 2017. 34

[West 17] M. Westphal, C. L. Maire, and K. Lamszus. "EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment : An Unfulfilled Promise.". *CNS drugs*, Vol. 31, No. 9, pp. 723–735, sep 2017. 34

[WHO 10] "WHO — Cancer". *WHO, https ://web.archive.org/web/20101229092321/http ://www.who.int/m* 2010. 21

[With 92] H. R. Withers. "Biological basis of radiation therapy for cancer.". *Lancet (London, England)*, Vol. 339, No. 8786, pp. 156–9, jan 1992. 29, 35, 36, 311

[Wood 14] G. F. Woodworth, G. P. Dunn, E. A. Nance, J. Hanes, and H. Brem. "Emerging Insights into Barriers to Effective Brain Tumor Therapeutics". *Frontiers in Oncology*, Vol. 4, p. 126, jul 2014. 75, 79, 91

[Wu 06] J. Wu, S. Yang, H. Luo, L. Zeng, L. Ye, and Y. Lu. "Quantitative evaluation of monocyte transmigration into the brain following chemical opening of the blood–brain barrier in mice". *Brain Research*, Vol. 1098, No. 1, pp. 79–85, jul 2006. 89, 313

[Yang 16] T. D. Yang, W. Choi, T. H. Yoon, K. J. Lee, J.-S. Lee, J. H. Joo, M.-G. Lee, H. S. Yim, K. M. Choi, B. Kim, J. J. Lee, H. Kim, D. Y. Lee, K.-Y. Jung, and S.-K. Baek. "In vivo photothermal treatment by the peritumoral injection of macrophages loaded with gold nanoshells". *Biomedical Optics Express*, Vol. 7, No. 1, p. 185, jan 2016. 89, 313

[Yarj 17] Z. Yarjanli, K. Ghaedi, A. Esmaeili, S. Rahgozar, and A. Zarrabi. "Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation.". *BMC neuroscience*, Vol. 18, No. 1, p. 51, jun 2017. 153, 316

[Zang 16] S. Zanganeh, G. Hutter, R. Spitler, O. Lenkov, M. Mahmoudi, A. Shaw, J. S. Pajarinen, H. Nejadnik, S. Goodman, M. Moseley, L. M. Coussens, and H. E. Daldrup-Link. "Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage

polarization in tumour tissues". *Nature Nanotechnology*, Vol. 11, No. 11, pp. 986–994, nov 2016. 256

[Zeng 12] X. Zeng, Y. Zhang, and A. M. Nyström. "Endocytic Uptake and Intracellular Trafficking of Bis-MPA-Based Hyperbranched Copolymer Micelles in Breast Cancer Cells". *Biomacromolecules*, Vol. 13, No. 11, pp. 3814–3822, nov 2012.

[Zhan 09] S. X. Zhang, J. Gao, T. A. Buchholz, Z. Wang, M. R. Salehpour, R. A. Drezek, and T.-K. Yu. "Quantifying tumor-selective radiation dose enhancements using gold nanoparticles : a monte carlo simulation study". *Biomedical Microdevices*, Vol. 11, No. 4, pp. 925–933, aug 2009. 104

[Zhan 15] X.-D. Zhang, Z. Luo, J. Chen, S. Song, X. Yuan, X. Shen, H. Wang, Y. Sun, K. Gao, L. Zhang, S. Fan, D. T. Leong, M. Guo, and J. Xie. "Ultrasmall Glutathione-Protected Gold Nanoclusters as Next Generation Radiotherapy Sensitizers with High Tumor Uptake and High Renal Clearance". *Scientific Reports*, Vol. 5, No. 1, p. 8669, aug 2015. 67, 312

[Zhan 18] X. Zhang, Z. Liu, Z. Lou, F. Chen, S. Chang, Y. Miao, Z. Zhou, X. Hu, J. Feng, Q. Ding, P. Liu, N. Gu, and H. Zhang. "Radiosensitivity enhancement of Fe3O4@Ag nanoparticles on human glioblastoma cells.". *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, pp. 1–10, apr 2018. 68, 72, 313

[Zhon 16] S. Zhong, Y.-G. Li, D.-F. Ji, T.-B. Lin, and Z.-Q. Lv. "Protocatechualdehyde Induces S-Phase Arrest and Apoptosis by Stimulating the p27KIP1-Cyclin A/D1-CDK2 and Mitochondrial Apoptotic Pathways in HT-29 Cells". *Molecules*, Vol. 21, No. 7, p. 934, jul 2016. 151, 316