



HAL
open science

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxide de fer

Alexandre Ocadiz

► **To cite this version:**

Alexandre Ocadiz. Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxide de fer. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALS018 . tel-03828538

HAL Id: tel-03828538

<https://theses.hal.science/tel-03828538>

Submitted on 25 Oct 2022

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : ISCE - Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

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

Unité de recherche : STROBE - Rayonnement Synchrotron pour la Recherche Biomédicale

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

Medical physics and radiobiology issues in multimodal therapy using synchrotron radiation and iron oxide nanoparticle injection.

Présentée par :

Alexandre OCADIZ

Direction de thèse :

Hélène ELLEAUME

Directeur de recherches INSERM, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Jean-François ADAM

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

PATRICK VERNET

Professeur des Universités, UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

LYDIA MAIGNE

Maître de conférences HDR, UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

Thèse soutenue publiquement le **8 juillet 2022**, devant le jury composé de :

HELENE ELLEAUME

Directeur de recherche, INSERM DELEGATION AUVERGNE-RHONE-ALPES

Directrice de thèse

JEAN-FRANÇOIS ADAM

Maître de conférences HDR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Co-directeur de thèse

FRANÇOIS ESTEVE

Professeur des Univ. - Praticien hosp., UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Président

JEAN-MICHEL LETANG

Maître de conférences HDR, INSA LYON

Examineur

PATRICK VERNET

Professeur des Universités, UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

Rapporteur

LYDIA MAIGNE

Maître de conférences HDR, UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

Rapporteuse

Invités :



Remerciement

Cette thèse a été pour une dure épreuve, et je n'aurais bien sûr pas y arriver au bout tout seul.

J'aimerais en premier lieu remercier mes directeurs de thèse, Hélène et Jeff, qui ont réussi à me supporter jusqu'au bout sans m'abandonner avant la fin. Sans leur aide précieuse, je n'en serai jamais arrivé au bout.

Je remercie toute l'équipe STROBE (c'est STROBIEN !), Ainsi qu'à toutes les personnes travaillant sur la ligne ID17 et alentours de l'ESRF.

En particulier, J'aimerais remercier Sarvi, co-thésarde et meilleure amie, qui m'a soutenu dans mes meilleurs et pires moments de la thèse.

Je veux aussi remercier la machine à café qui a eu la double fonction de maintien en vie et de lieu de socialisation.

Je remercie aussi ma famille et ma chère Lyne de m'avoir accompagné sur cette thèse pendant les mois de confinements dus à la pandémie de covid-19 (que je ne remercie pas).

Table des matières

Chapitre 1. État de l'art	4
1.1. Le cancer du cerveau et les traitements associés	4
1.1.1. Caractéristiques et classification des tumeurs cérébrales	4
1.1.2. Thérapies pour le traitement des tumeurs cérébrales	10
1.2. Intérêt des nanoparticules en oncologie	19
1.2.1. Description des nanoparticules	19
1.2.2. Applications biomédicales des nanoparticules	24
1.3. Radiothérapies combinées pour le traitement des tumeurs cérébrales	27
1.3.2. Thérapies combinées : de la radiosensibilisation au renforcement de dose	27
1.3.3. Thérapies combinées au Synchrotron européen	34
1.3.4. Modélisation pour le renforcement de dose par les nanoparticules	42
1.4. Les nanoparticules d'oxyde de fer et leur utilisation en médecine	43
1.4.1. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'oxyde de fer	43
1.4.2. Applications biomédicales des nanoparticules d'oxyde de fer	47
1.4.3. Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer	51
1.4.4. Nanoparticules d'oxyde de fer et radiothérapie	55
1.5. Problématique de la thèse	60
Chapitre 2. Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer	64
2.1. Introduction	64
2.1.1. Modèle animal	65
2.1.2. Administration des nanoparticules	66
2.1.3. Objectif	68
2.2. Matériel et méthodes	69
2.2.1. Modèle préclinique de gliome de rat	69
2.2.2. Préparation et injection des nanoparticules d'oxyde de fer	71
2.2.3. Suivi temporel des nanoparticules d'oxyde de fer après injection IV ou CED	73
2.3. Imagerie par résonance magnétique	74
2.3.1. Imagerie IRM pour l'étude de la distribution des nanoparticules d'oxyde de fer	76
2.3.2. Résultats des analyses qualitatives par imagerie de résonance magnétique	77
2.4. Tomographie quantitative par rayonnement synchrotron	80
2.4.1. Acquisition des images de tomographie	80
2.4.2. Acquisition d'images par TQRS pour l'étude de la biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer	84
2.4.3. Résultat des analyses par tomographie quantitative par rayonnement synchrotron	86
2.5. Analyse post-mortem	93
2.5.1. Histologie	93
2.5.2. Spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser	97
2.5.3. Résultats des études post mortem par LIBS	99
2.6. Discussion	103
2.6.1. Protocole d'injection intraveineuse	103
2.6.2. Protocole d'injection CED	105
2.6.3. Comparaison des deux techniques d'administration des nanoparticules	106
2.6.4. Conclusion	109
Chapitre 3. Planification de traitement pour la radiothérapie synchrotron par photoactivation de nanoparticules d'oxyde de fer	110
3.1. Contexte et objectifs	111
3.1.1. Présentation d'un système de planification de traitement	112

3.1.2. Calcul de dose pour le renforcement de dose par nanoparticules	119
3.2. Étude de la biodistribution par tomographie synchrotron à 2 énergies	122
3.2.1. Étude sur fantôme	122
3.2.2. Étude préclinique	128
3.3. Calcul de Dose.....	131
3.3.1. Méthodologie pour le calcul de dose pour la planification de traitement.....	131
3.3.2. Évaluation dosimétrique et vérification de l'efficacité du traitement	138
3.4. Discussion des résultats	146
3.4.1. Distribution de la concentration de nanoparticules en CED	146
3.4.2. Dosimétrie	149
3.5. Conclusion.....	152
Chapitre 4. Étude in-vivo de la radiothérapie synchrotron par photo-activation de nanoparticules de fer chez le rat porteur du gliome F98	154
4.1. Contexte et objectifs.....	154
4.1.1. Objectifs de l'expérience.....	155
4.2. Matériel et méthodes	156
4.2.1. Préparation des animaux	156
4.2.2. Conditions d'irradiation	156
4.2.3. Suivi post-traitement	158
4.2.4. Analyse statistique.....	158
4.2.5. Groupement et protocoles.....	159
4.3. Résultats de survie	160
4.3.1. Effets des nanoparticules sans irradiation.....	160
4.3.2. Effets de la radiothérapie seule.....	162
4.3.3. Effet de la radiothérapie combinée à l'injection de nanoparticules d'oxydes de fer	165
4.4. Discussion	170
4.5. Conclusion.....	171
Chapitre 5. Discussion Générale.....	173
5.1. Biodistribution des nanoparticules.....	173
5.2. Calcul de dose en présence de fer	175
5.3. Essais précliniques	177
5.4. Conclusion.....	178
Bibliographie 180	
Liste des figures	202
Liste des tableaux.....	213
Résumé de la thèse.....	216

Abréviations

BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CED	<i>Convection Enhanced Delivery</i>
DEF	<i>Dose Enhancement Factor</i>
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
GATE	<i>GEANT4 Application for Tomographic Emission</i>
HDV	Histogramme Dose-Volume
hSRT	<i>Hypofractionated Stereotaxic Radiotherapy</i>
HU	<i>Hounsfield Unit</i>
ICP-MS	<i>Induction Coupled Plasma Mass Spectroscopy</i>
ICRU	<i>International Commission on Radiation Units</i>
IDH	Isocitrate Deshydrogenase
IMRT	<i>Intensity Modulated Radiation Therapy</i>
IONP	<i>Iron Oxide Nanoparticle</i>
IUdr	Iododéoxyuridine
IV	Intraveineuse
LIBS	<i>Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i>
MRT	<i>Microbeam Radiation Therapy</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NTCP	<i>Normal Tissue Complication Probability</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SER	<i>Sensitivity Enhancement Ratio</i>
SRS	<i>Stereotaxic Radiosurgery</i>
SR-XRF	<i>Synchrotron Radiation Xray Fluorescence Spectrometry</i>
SSRT	Radiothérapie stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron
TCP	<i>Tumor Control Probability</i>
TQRS	Tomographie Quantitative par Rayonnement Synchrotron
WBRT	<i>Whole Brain Radiation Therapy</i>

Chapitre 1. État de l'art

Chapitre 1. État de l'art	4
1.1. Le cancer du cerveau et les traitements associés	4
1.1.1. Caractéristiques et classification des tumeurs cérébrales.....	4
1.1.2. Thérapies pour le traitement des tumeurs cérébrales.....	10
1.2. Intérêt des nanoparticules en oncologie	19
1.2.1. Description des nanoparticules.....	19
1.2.2. Applications biomédicales des nanoparticules.....	24
1.3. Radiothérapies combinées pour le traitement des tumeurs cérébrales	27
1.3.2. Thérapies combinées : de la radiosensibilisation au renforcement de dose.....	27
1.3.3. Thérapies combinées au Synchrotron européen.....	34
1.3.4. Modélisation pour le renforcement de dose par les nanoparticules.....	42
1.4. Les nanoparticules d'oxyde de fer et leur utilisation en médecine	43
1.4.1. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'oxyde de fer.....	43
1.4.2. Applications biomédicales des nanoparticules d'oxyde de fer.....	47
1.4.3. Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer.....	51
1.4.4. Nanoparticules d'oxyde de fer et radiothérapie.....	55
1.5. Problématique de la thèse	60

1.1. Le cancer du cerveau et les traitements associés

Les tumeurs cérébrales primitives et les tumeurs du système nerveux central sont à l'heure actuelle un problème de santé publique majeur. En effet, malgré une incidence faible (10 cas pour 100 000 personnes adultes aux États-Unis (Ostrom et al. 2017)), le gliome malin est le type de tumeur intracrânienne primitive maligne le plus fréquent chez l'homme adulte avec une médiane de survie de 12 à 15 mois pour les glioblastomes qui sont les tumeurs cérébrales de plus haut grade (Wen and Kesari 2008; Hanif et al. 2017).

Le développement de traitements innovants est nécessaire pour améliorer la survie de ces patients. La recherche de pistes d'amélioration des traitements de ces cancers est un des axes de recherche de l'équipe STROBE depuis plusieurs années. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette démarche. Dans ce premier chapitre, une synthèse des caractéristiques de cette maladie et les traitements disponibles vont être présentés.

1.1.1. Caractéristiques et classification des tumeurs cérébrales

Les tumeurs prennent leur origine lors d'un dérèglement de la croissance d'une cellule suite à la mutation de son code génétique. Elles peuvent être bénignes lorsque leur croissance est limitée, mais lorsque la tumeur empêche le fonctionnement normal de l'organisme, on parle de tumeurs malignes. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser aux tumeurs cérébrales. On distingue deux catégories de tumeurs cérébrales en fonction de leur origine. Les tumeurs de la première catégorie sont dites primitives ; elles sont originaires d'une cellule cérébrale ayant muté. La seconde catégorie sont les métastases ou tumeurs secondaires, elles sont formées de cellules provenant d'un autre organe ayant migré *via* la circulation sanguine ou lymphatique dans le cerveau. (Achrol et al. 2019; R. K. Jain et al. 2007).

1.1.1.1. Tumeurs primitives du système nerveux central

Historiquement, la classification histogénétique des tumeurs cérébrales a été présentée par Bailey et Cushing dès 1926 (Bailey and Cushing 1926), elle est restée pratiquement inchangée depuis. Les tumeurs sont classifiées selon leur similarité avec les cellules constituant le système nerveux central. Parmi les cellules gliales, on distingue : les astrocytomes, les épendymomes et les oligodendriomes. Les médulloblastomes quant à eux sont issus des précurseurs des neurones. (Komori 2017).

Les tumeurs sont catégorisées selon leur degré de différenciation cellulaire, déterminé à partir des irrégularités morphologiques par rapport à leur équivalent sain. La différenciation cellulaire est la capacité d'une cellule à se spécialiser. Les cellules de la glie sont très différenciées. Au cours de l'évolution d'un cancer, les cellules tumorales vont perdre leur différenciation.

Selon l'OMS (Louis et al. 2016), les tumeurs primitives du système nerveux central sont divisées en 4 grades selon leur agressivité. Les tumeurs de bas grades (I et II) sont en général bien différenciées et sont proches des cellules normales. Elles se développent lentement et sont souvent bénignes. Les tumeurs de haut grade sont peu différenciées, voire indifférenciées. Elles ont tendance à se développer plus rapidement et à infiltrer les tissus sains environnants (Figure 1.1.1).

- Les tumeurs de grade I prolifèrent lentement, ne sont pas malignes et sont associées à une survie à long terme élevée des patients. On y retrouve notamment les astrocytomes pilocytiques, curables par chirurgie ;
- Les tumeurs de grade II prolifèrent relativement lentement, mais rechutent parfois en tumeurs de haut grade. Par exemple, l'astrocytome diffus à une évolution lente vers un astrocytome anaplasique. Elles peuvent être malignes ou non ;
- Les tumeurs de grade III sont malignes et rechutent souvent comme les tumeurs de plus haut grade. Exemple : l'astrocytome anaplasique ;
- Les tumeurs de grade IV prolifèrent rapidement. Ce sont des tumeurs malignes très agressives. Le glioblastome, qui est un astrocytome de grade IV, est la tumeur primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'homme.

Grade OMS	Tumeurs d'origine Astrocytaire	Probabilité de survie	Différenciation cellulaire
I	Astrocytome pilocytique	++	Cellules différenciées
II	Astrocytome diffus	+	
III	Astrocytome anaplasique	-	
IV	Glioblastome	--	Cellules indifférenciées

Figure 1.1.1 : Classification des tumeurs astrocytaires selon l'ancienne classification de l'OMS (Louis et al. 2007). Les tumeurs les plus différenciées sont de plus bas grade et ont une meilleure probabilité de survie que les tumeurs de plus haut grade qui sont peu différenciées.

Cette classification est globalement corrélée avec le pronostic de la maladie et reste utile pour déterminer la stratégie thérapeutique. Cependant, les découvertes récentes dans l'analyse génétique et épigénétique viennent remettre en question la façon de faire traditionnelle. (Komori 2017). En effet, il a été démontré que le pronostic de la maladie

est mieux corrélé avec le profil moléculaire qu'avec le grade de l'OMS (Mur et al. 2015). De plus, les tests moléculaires sont plus objectifs et reproductibles, alors que l'observation histologique nécessite une interprétation humaine ce qui peut conduire à des différences entre observateurs (Kros et al. 2007).

L'approche traditionnelle pour la classification des tumeurs cérébrales est de nature histologique, mais l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a publié en 2016 une révision sur la façon de classer les tumeurs du système nerveux central et a changé la façon d'évaluer les gliomes vers une approche plus moléculaire (Louis et al. 2016).

Un des principaux marqueurs biochimiques d'évaluation est la mutation sur le gène des enzymes isocitrate deshydrogenase 1 et 2 (IDH1/2). Ces mutations existent exclusivement chez les astrocytomes et ependyomes infiltrants, et sont un marqueur précoce de la tumorigénèse de ces types tumoraux. Un autre marqueur de classification important est la co-délétion des chromosomes 1p et 19q, qui est spécifique aux oligodendriomes et permet de les identifier dans les cas où le diagnostic histologique est difficile. La classification de 2016 est donc une classification « moléculaire, basée sur l'histologie ». L'évaluation histologique reste la première étape du diagnostic. La catégorie générale est déterminée par histologie et le sous-groupe dépend de l'analyse génétique. (Louis et al. 2016).

Le glioblastome (ou glioblastome multiforme) est le type d'astrocytome primitif le plus fréquent et le plus malin. Il est de grade IV selon la classification de l'OMS. Cette forme de cancer a une prévalence de 60 % parmi toutes les tumeurs cérébrales chez les adultes. (Hanif et al. 2017). Malgré la variété de traitements existants, le glioblastome a en général un mauvais pronostic : sans traitement, les patients ont une espérance de survie de 4 mois à partir de l'apparition des symptômes. La survie médiane après traitement est approximativement de 14 à 15 mois. (Louis et al. 2016 ; R. Stupp et al. 2014 b).

Le glioblastome est depuis 2016 divisé en 2 sous-catégories en fonction de la présence de mutations sur le gène IDH (Figure 1.1.2). La forme majeure est la forme sauvage (sans mutation) et correspond à un glioblastome primitif. Elle est prédominante chez les patients de plus de 55 ans. Dans 10 % des cas, on observe la forme mutée qui est secondaire à un astrocytome de plus faible grade. Elle apparait chez des patients de moyenne d'âge inférieure. Ce type de tumeur a un pronostic un peu moins sombre : la survie médiane après traitement est d'environ 31 mois. (Louis et al. 2016).

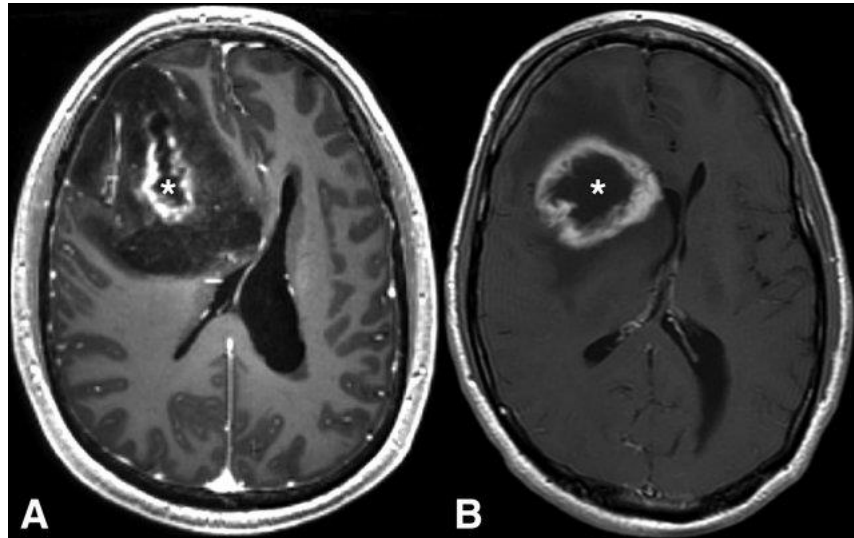


Figure 1.1.2 : Imagerie par résonance magnétique (IRM) pondérée en T1 après injection d'un agent de contraste au gadolinium. (A) Glioblastome IDH mutant et (B) glioblastome IDH sauvage. La partie nécrotique de la tumeur (*) est plus grande dans la forme sauvage que dans la forme mutée. (Arevalo et al. 2017)

1.1.1.2. Métastases cérébrales

Le développement de métastases cérébrales représente la complication la plus répandue du cancer (Figure 1.1.3). On estime que 20 % des patients atteints du cancer vont développer des métastases cérébrales. (Nayak, Lee, and Wen 2012; Nicole A. Shonka 2015). Cependant plusieurs facteurs font que ce nombre est probablement sous-estimé. De nombreuses études rapportent uniquement la présence de métastases au moment du diagnostic initial. (Achrol et al. 2019). De plus, leur présence n'est recherchée que dans le cas où les patients présentent des symptômes neurologiques. Les études basées sur les autopsies suggèrent que l'incidence des métastases cérébrales peut s'élever jusqu'à 40 % des patients atteints de cancers. (Achrol et al. 2019). Les métastases cérébrales proviennent principalement de 3 tumeurs primitives : le cancer du poumon (20-56 % des patients), du sein (5-20 %) et le mélanome (7-16 %). La survie des patients dépend du nombre et de la localisation des métastases, mais dans tous les cas les survies sont faibles. Seulement 8,1 % des patients survivent plus de 2 ans et les survies sont de 4 à 11 semaines pour certaines métastases de cancer pulmonaire. (Taillibert and le Rhun 2015).

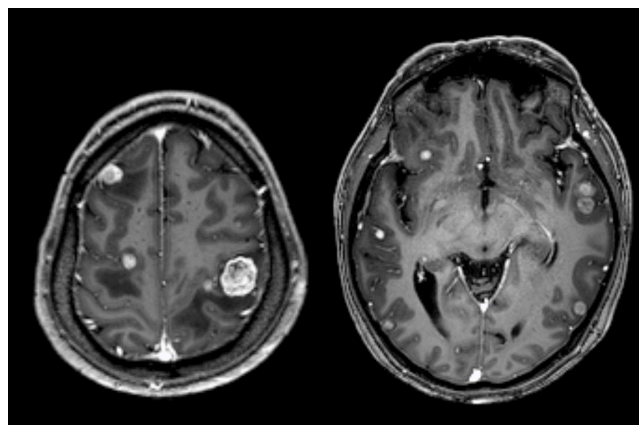


Figure 1.1.3 : Métastases cérébrales vues en IRM pondérée en T1 (Camille Verry et al. 2019).

Il existe deux classifications principales des métastases pour évaluer le pronostic de la maladie : la classification RPA (*Recursive Partitioning Analysis*) et la classification GPA (*Graded Prognostic Assessment*).

Le score RPA est dérivé de l'âge des patients, de la nature de la tumeur et de l'autonomie des patients qui est évaluée par le test de Karnofsky (KPS — *Karnofsky Performance Status*). Le KPS est un score évaluant l'autonomie des patients dans leurs activités quotidiennes (échelle de 0 à 100). C'est le déterminant majeur pour estimer la survie des patients. Le RPA distingue 3 classes, avec des médianes de survie allant de 2,3 mois pour la classe III à 7,7 mois pour la classe I (Achrol et al. 2019; Gaspar et al. 2000).

Le score GPA plus récent prend également en compte le KPS et l'âge du patient, mais aussi le nombre de métastases. Cet index comporte 4 catégories avec des médianes de survie allant de 2,6 mois à 11 mois. (Sperduto et al. 2008). Un score GPA spécifique des métastases de cancer pulmonaire a été établi qui prend aussi en compte des marqueurs moléculaires comme les mutations sur le gène EGFR (Epithelium Growth Factor Receptor) (Sperduto et al. 2017).

1.1.1.3. Évolution des tumeurs cérébrales : Néangiogénèse et rupture de la BHE

La croissance rapide des tumeurs et des métastases cérébrales entraîne des modifications importantes dans l'architecture cérébrale. Les tumeurs malignes en particulier se développent rapidement et ont des besoins nutritionnels importants. Elles nécessitent donc un apport continu en oxygène et nutriments par le système sanguin pour se développer au-delà de 2 millimètres d'un capillaire sanguin. (Sherwood, Parris, and Folkman 1971). La tumeur induit alors la production de vaisseaux sanguins par la sécrétion de facteurs de croissance. On parle alors de néoangiogénèse tumorale. Cette néoangiogénèse se fait de manière anarchique, ainsi la taille des nouveaux vaisseaux tumoraux est 4 fois plus importante que dans les tissus sains. Les vaisseaux se développent de manière désorganisée et avec de nombreuses tortuosités. (Beaumont et al. 2009). Si la tumeur se développe plus rapidement que la vascularisation, alors les cellules éloignées des vaisseaux sanguins nécrosent et meurent, formant une zone de nécrose tumorale. La néoangiogénèse est également nécessaire au développement des métastases. Avec l'augmentation de la croissance tumorale, des cellules peuvent quitter la tumeur primitive pour aller former des sites à distance *via* la circulation sanguine ou lymphatique. (R. K. Jain et al. 2007).

Le cerveau est un organe avec des besoins physiologiques particuliers et sa vascularisation est adaptée en conséquence. En effet, les neurones sont très sensibles aux éléments chimiques susceptibles de passer par la circulation sanguine. Le milieu interstitiel du cerveau est donc séparé de la lumière des vaisseaux sanguins par la barrière hématoencéphalique (BHE). La BHE ne laisse passer que certaines molécules nécessaires à l'homéostasie cérébrale. Cette barrière est composée de cellules endothéliales espacées par des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. Ce sont les jonctions serrées entre les cellules qui assurent l'imperméabilité de la BHE. La BHE laisse seulement passer les petites molécules hydrophobes (O₂, CO₂, hormones). Enfin, des protéines de transport localisées dans les membranes des cellules épithéliales permettent de laisser passer

certaines molécules spécifiques. Elles permettent l'influx des métabolites utiles dans le milieu interstitiel cérébral, comme le glucose, et l'efflux des déchets produits par les cellules de la glie. (Abbott et al. 2010). La BHE est une barrière très sélective et limite l'efficacité de nombreux traitements puisque 98 % des molécules ne peuvent pas traverser la BHE (Pardridge 2003).

Dans les tumeurs cérébrales, la croissance accélérée des vaisseaux sanguins empêche la BHE de se former correctement. Les métabolites qui ne peuvent normalement pas passer dans le milieu interstitiel peuvent alors circuler librement dans la tumeur. Cette perméabilité signe la présence d'une angiogenèse pathologique et la présence d'une tumeur (Figure 1.1.4). On peut alors repérer la tumeur en imagerie par des agents de contraste (Figure 1.1.2, Figure 1.1.3) : l'agent de contraste, injecté par voie veineuse, va pénétrer dans les tissus tumoraux par les lésions de la BHE mais pas dans le reste du cerveau où la BHE est saine et hermétique. (R. K. Jain et al. 2007; Karim et al. 2016).

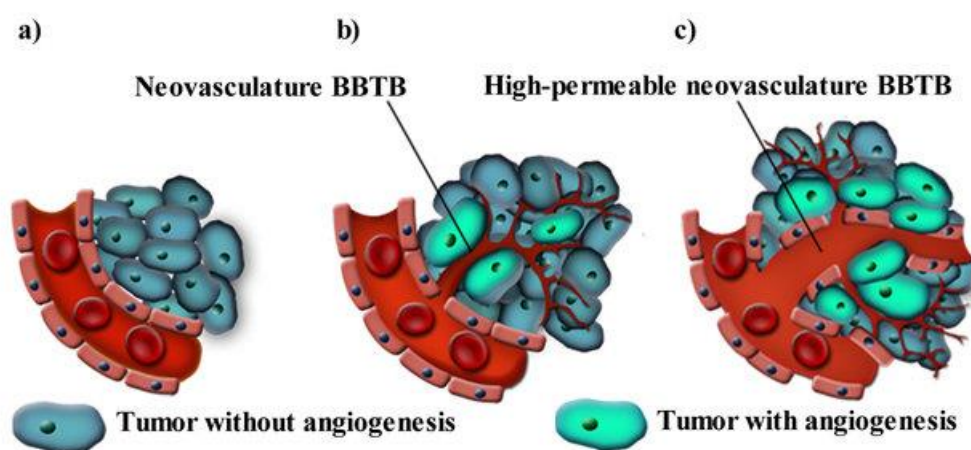


Figure 1.1.4 : Étapes de la néoangiogenèse tumorale. a) La tumeur est isolée de la circulation sanguine par la barrière hématoencéphalique. b) certaines cellules tumorales subissent une mutation provoquant la sécrétion de facteur de croissance vasculaire. La barrière hémato-tumorale commence à se former (BBTB). c) La néoangiogenèse rapide empêche les cellules endothéliales de former des jonctions serrées ce qui permet aux molécules de s'extravaser dans les tissus tumoraux (Karim et al. 2016).

Ce mécanisme d'augmentation de la perméabilité des vaisseaux tumoraux est commun aux tumeurs solides (Iyer et al. 2006). Ainsi, la néoangiogenèse tumorale permet d'accumuler des molécules injectées par voie veineuse par un mécanisme appelé EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). Cet effet permet d'accumuler des macromolécules avec un ratio de 10 à 50 fois la concentration observée dans les tissus normaux, 1 à 2 jours après injection (Figure 1.1.5)(Iyer et al. 2006). Cependant cet effet ne fonctionne pas avec les petites molécules à cause de la diffusion et de la clairance rapides de ces molécules qui peuvent regagner l'espace vasculaire (Seymour et al. 1995; Noguchi et al. 1998).

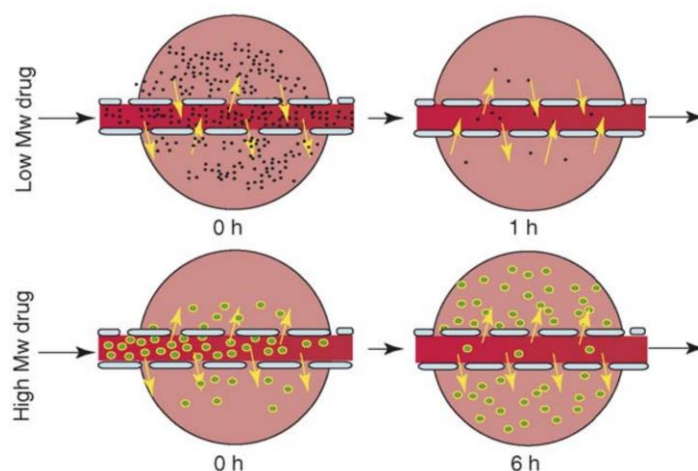


Figure 1.1.5 : Représentation schématique de l'effet EPR. Les molécules de bas poids moléculaire (Low Mw drug) et de haut poids moléculaire (High Mw drug) diffusent dans la tumeur grâce à la perméabilisation de la vascularisation due à la néoangiogénèse (0 h). Cependant les plus petites molécules diffusent librement et sont rapidement éliminées alors que les grosses molécules s'accumulent dans la tumeur. (Iyer et al. 2006).

1.1.2. Thérapies pour le traitement des tumeurs cérébrales

La prise en charge des patients porteurs de tumeurs cérébrales requiert une approche impliquant plusieurs modalités. Le but des traitements anticancéreux est d'éliminer les cellules tumorales qui perturbent l'activité normale de l'organisme. La première difficulté est d'identifier les cellules tumorales afin de les détruire. Comme les cellules tumorales sont difficiles à identifier individuellement, il faut en général aussi détruire une proportion de cellules saines. De ce fait, pour les tumeurs cérébrales, cette approche est plus délicate que pour d'autres tumeurs, puisque la destruction de l'environnement cérébral peut provoquer des dommages neurologiques graves.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous intéresser aux traitements des gliomes de haut grade (grade III et IV). Le cas des métastases va aussi être développé, en rapport aux essais cliniques récemment réalisés au laboratoire.

1.1.2.1. Présentation des traitements anticancéreux conventionnels.

En thérapie anticancéreuse, il existe 3 méthodes principales employées couramment en clinique :

- La chirurgie vise à retirer la tumeur, lorsqu'elle est bien circonscrite. Cette méthode nécessite que le chirurgien puisse accéder à la tumeur pour pouvoir la retirer ;
- La chimiothérapie consiste en l'utilisation de médicaments anticancéreux ou cytotoxiques, qui vont détruire principalement les cellules cancéreuses. Les chimiothérapies sont généralement administrées par voie systémique et visent les cellules se divisant rapidement ;
- La radiothérapie repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants de haute énergie pour détruire la tumeur de manière peu invasive. Cette méthode permet d'atteindre des tumeurs non accessibles par chirurgie.

Ces trois traitements ne sont pas exclusifs et sont souvent utilisés en combinaison. De plus, des thérapies innovantes existent et cherchent à améliorer l'efficacité et la spécificité de la destruction tumorale. Parmi celles-ci, on peut citer les thérapies ciblées, qui visent des caractéristiques spécifiques d'un type de tumeur donné, l'hormonothérapie, pour certains cancers (du sein et de la prostate) qui sont sensibles à l'action des hormones et l'immunothérapie, thérapie utilisant des anticorps ciblant la tumeur afin de stimuler le système immunitaire.

1.1.2.1.1. La chirurgie

La chirurgie est souvent la première étape d'un traitement lorsqu'elle est possible. Le but de la chirurgie est d'enlever totalement la tumeur ainsi qu'une marge de tissus, pour s'assurer qu'il ne reste plus de cellules tumorales qui pourraient entraîner une récurrence. Il arrive cependant que l'opération chirurgicale ne soit pas possible pour plusieurs raisons. (Steinmetz and Schackert 1996) :

- Si la tumeur est trop grande ;
- Si l'emplacement de la tumeur empêche que l'opération se fasse sans dommages aux tissus environnants ;
- Si la tumeur est trop petite pour être visible par le chirurgien ;
- Si l'état de santé du patient est trop faible pour envisager une chirurgie.

La chirurgie est souvent combinée avec une radiothérapie ou une chimiothérapie qui peuvent être réalisées avant l'opération pour réduire la taille de la tumeur (traitement néoadjuvant), ou après pour détruire les cellules tumorales restantes et éviter un risque de récurrence (traitement adjuvant).

1.1.2.1.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie utilise des médicaments qui visent à inhiber la prolifération des cellules tumorales. La chimiothérapie n'est pas spécifique des cellules cancéreuses et va provoquer des dommages chez toutes les cellules se divisant rapidement. Il existe plusieurs mécanismes d'action des agents chimiothérapeutiques, mais tous les médicaments de chimiothérapie affectent soit le cycle cellulaire en bloquant le mécanisme de division, soit la synthèse de l'ADN, en créant des dommages irréparables. La plupart du temps, la chimiothérapie est utilisée comme traitement systémique. Cela permet à l'agent d'attaquer les cellules tumorales partout dans le corps.

Dans le cadre des tumeurs cérébrales, la chimiothérapie a une action limitée, lorsqu'elle est utilisée par voie systémique. En effet, la présence de la barrière hématoencéphalique, même partiellement lésée, limite l'efficacité de nombreux médicaments. De plus, certains médicaments utilisés pour des soins palliatifs (certains corticoïdes, antiépileptiques) peuvent diminuer l'efficacité de la chimiothérapie. (Wen and Kesari 2008). Les médicaments les plus utilisés pour les tumeurs cérébrales sont le témozolomide, le carboplatine (les deux sont des agents alkylant de l'ADN), ou alors le régime PCV associant la procarbazine, la lomustine et la vincristine.

1.1.2.1.3. La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales. Les rayonnements ionisants vont provoquer des dommages à l'ADN directement, ou indirectement en créant des espèces oxydantes très réactives, ce qui va induire la mort cellulaire.

On appelle « rayonnements ionisants », les rayonnements capables d'ioniser la matière, c'est-à-dire qu'ils possèdent suffisamment d'énergie pour transformer les atomes de la matière en ions. Les rayonnements ionisants peuvent être des photons (rayons X, rayons gamma) ou des particules chargées comme des électrons, des positrons ou des protons.

La radiothérapie peut être utilisée soit en traitement principal, lorsque la chirurgie n'est pas possible, soit en traitement adjuvant à la chirurgie dans le cadre d'un traitement combiné.

La dose est un paramètre clé de la radiothérapie. Elle représente l'énergie déposée par le rayonnement ionisant dans la matière, rapportée à la masse. Elle est définie par :

$$D = \frac{dE}{dm} \quad 1.1$$

Avec dE (en J) l'énergie radiative déposée dans un élément de matière de masse dm (en kg). L'unité de la dose est le gray (symbole Gy, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$). L'intérêt principal de cette grandeur est de quantifier l'énergie déposée dans une unité de matière biologique pour prévoir les effets déterministes d'une irradiation. Plus la dose est élevée, plus on va induire de lésions dans les cellules.

En ce qui concerne la radiothérapie par rayonnement X ou Gamma, ce ne sont pas les photons qui sont directement responsables du dépôt d'énergie dans la matière. L'essentiel de l'énergie des photons est transféré aux électrons de la matière sous la forme d'énergie cinétique, et ce sont ces électrons qui vont ioniser la plupart des atomes de la matière.

Le dépôt de dose par les rayonnements ionisants correspond à une « phase physique » de l'irradiation. Cette phase est très rapide, et s'achève 10^{-15} s après l'irradiation. À la suite de cette phase physique s'ensuit la phase chimique. Comme les tissus biologiques sont composés majoritairement d'eau, l'essentiel des molécules ionisées sera des molécules d'eau. Ces espèces ionisées créées, appelées espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species), vont à leur tour créer des dommages chimiques et biologiques. (Burns and Sims 1981).

Les dommages biologiques induits peuvent concerner les membranes des cellules, les protéines ou l'ADN, mais il est admis que la cible la plus critique de ces dommages est l'ADN (Burkart, Jung, and Frasch 1999). L'ADN peut subir des lésions directement induites par les rayonnements ionisants ou particules secondaires, on parle alors de « l'effet direct ». L'irradiation peut aussi créer une quantité importante de ROS qui vont réagir et dénaturer l'ADN. C'est « l'effet indirect ». Suite à l'agression que la cellule vient

de subir, la cellule va enclencher des mécanismes de réparation, ou si les dommages sont trop importants, le processus va conduire à la mort cellulaire.

L'effet des radiations sur les cellules constitue le champ d'études de la radiobiologie, et plusieurs modèles ont été proposés pour mettre en lien l'effet des rayonnements avec l'efficacité thérapeutique.

La radiothérapie cherche à éliminer les cellules cancéreuses en leur causant des dommages irréversibles tout en essayant d'épargner les tissus sains environnants. Afin de quantifier cette différence d'effets entre les tissus sains environnants et la tumeur, des modèles ont été créés. Le modèle radiobiologique le plus couramment utilisé est le modèle TCP/NTCP, qui évalue la probabilité de contrôle tumoral (TCP) et la probabilité de complication des tissus normaux (NTCP) en fonction de la dose (Figure 1.1.6). Le TCP correspond à la probabilité, pour une dose donnée, que la tumeur soit éradiquée ou contrôlée. Le NTCP est la probabilité, pour une dose donnée, que les tissus normaux subissent des effets secondaires dus à l'irradiation. Cette valeur doit donc être la plus basse possible. Pour un traitement de radiothérapie donné, ces 2 valeurs vont augmenter avec la dose. Plus l'écart entre ces 2 valeurs sera grand, plus il sera aisé de traiter la tumeur sans détériorer les tissus sains. L'index thérapeutique correspond à l'intervalle entre ces 2 courbes. Pour un index thérapeutique élevé, on peut détruire la tumeur sans avoir de complications dans le tissu normal. (Chargari et al. 2016).

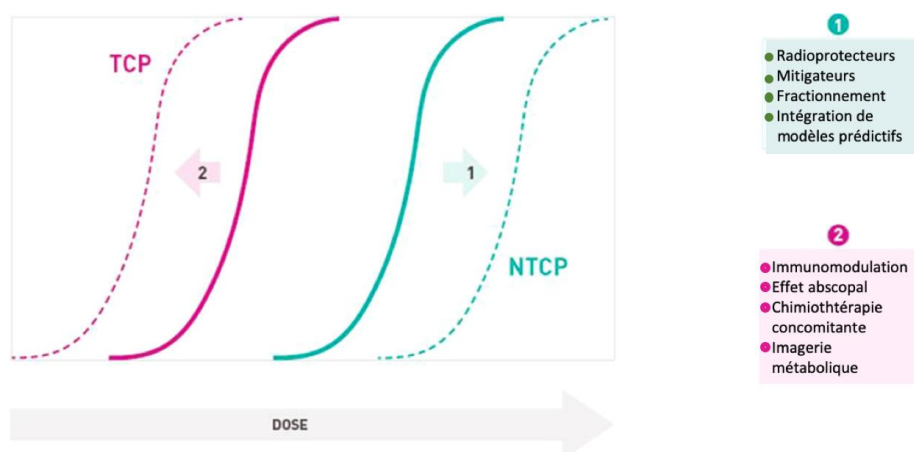


Figure 1.1.6 : Modèle de courbe de TCP (tumor control probability) et de NTCP (normal tissue complication probability) en fonction de la dose prescrite pour un traitement donné. 1. Exemples de modalités permettant de diminuer le NTCP en diminuant les dommages aux tissus sains. 2. Exemples de modalités permettant d'augmenter le TCP et d'avoir une meilleure survie après traitement. Adapté de (Chargari et al. 2016).

Les conditions de traitement peuvent également modifier les courbes de TCP et NTCP. Ainsi, si l'on met en place des procédures pour diminuer la sensibilité des tissus normaux aux rayonnements ionisants, cela permet d'augmenter la dose sans causer de complications aux tissus sains. Il est aussi possible, en augmentant la sensibilité de la tumeur aux rayonnements, de détruire la tumeur avec une dose plus faible. Dans le cas des tumeurs cérébrales, la tumeur se situant au centre d'un organe à risque, l'index thérapeutique est très petit. Il est essentiel d'agrandir le différentiel entre TCP et NTCP si l'on veut augmenter la survie des patients atteints de cette maladie. (de La Fuente Herman, Ahmad, and Vlachaki 2010).

Une des approches pour augmenter l'index thérapeutique consiste à créer un différentiel de dose entre la tumeur et les tissus sains. Pour atteindre cet objectif, il est possible d'optimiser les modalités de délivrance de la radiothérapie, en adaptant : le fractionnement temporel, le type de particule et la balistique de faisceau.

Il a été démontré (Withers 1992) que les tissus sains vont mettre en place des mécanismes de réparation après l'irradiation. Ainsi, le fractionnement temporel permet de délivrer une dose plus élevée à la tumeur tout en gardant des dommages dans les tissus sains raisonnables. Le traitement peut aussi être réalisé en une séance ou un petit nombre de séances, c'est le cas de la radiochirurgie stéréotaxique (une seule séance) ou de la radiothérapie stéréotaxique hypofractionnée (3 à 5 séances). Ces traitements utilisent une balistique très précise et lourde, nécessitant de diminuer le nombre de séances d'irradiation.

La radiothérapie utilise principalement trois types de rayonnements : Les photons (ou rayons X ou Gamma), les électrons, et les ions lourds (principalement des protons). Pour des raisons de disponibilité, la photonothérapie est la plus utilisée. Les cartes de dose de ces trois modalités sont représentées sur la Figure 1.1.7. Ces cartes de dose correspondent à un calcul fait par un système de planification de traitement (TPS). La planification de traitement est une phase qui a lieu avant la radiothérapie et permet de déterminer les conditions d'irradiation optimisant la dose délivrée dans la tumeur.

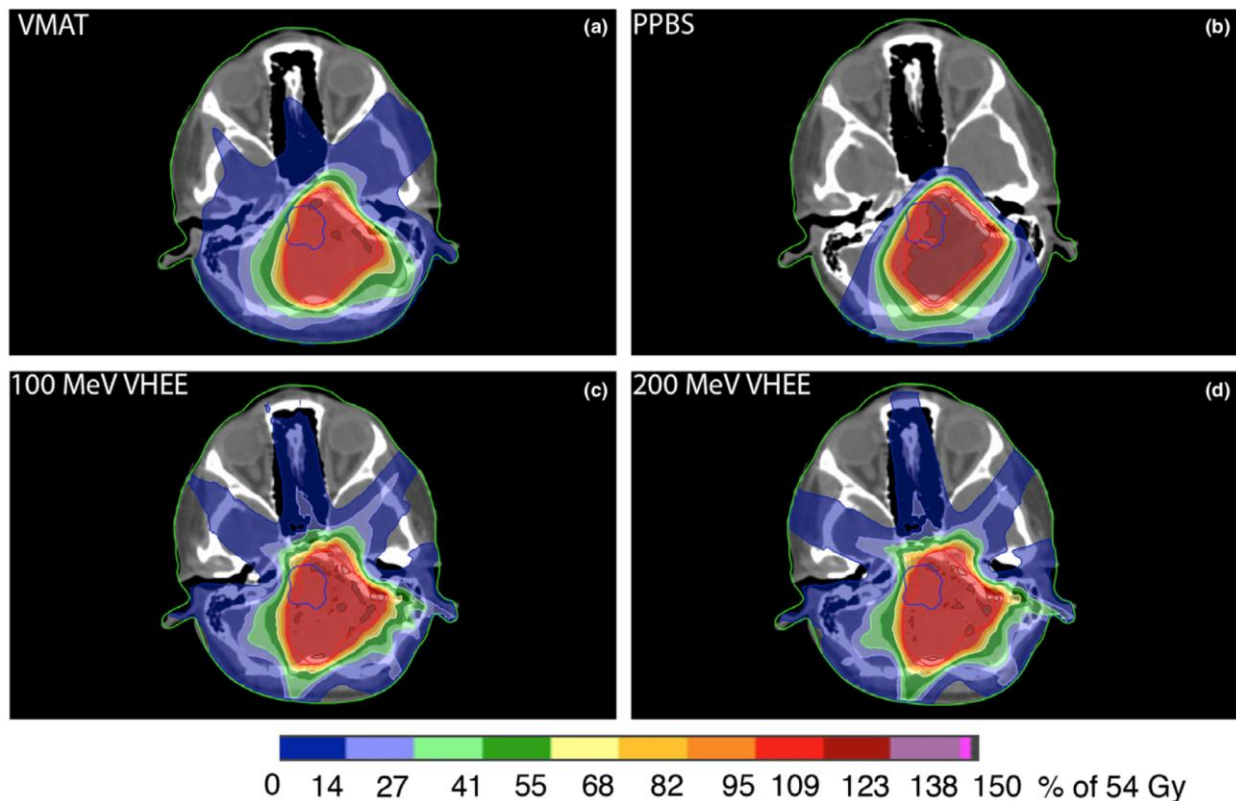


Figure 1.1.7 : Comparaison des cartes de doses correspondantes aux trois modalités de traitement en radiothérapie externe. Faisceaux de photons en arcthérapie volumétrique (a), faisceau de protons (b), faisceau d'électrons de très haute énergie de 100 MeV (c) et 200 MeV (d) (Schuler et al. 2017).

La balistique va jouer un rôle important dans le traitement de la tumeur. En thérapie photonique, il existe 3 types de traitements qui utilisent des balistiques différentes : la radiothérapie en arc avec modulation d'intensité (IMRT), le gamma knife et le cyberknife (Figure 1.1.8).

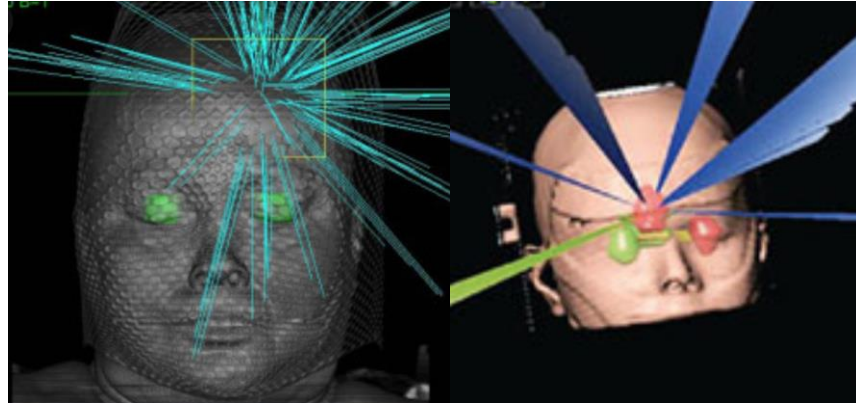
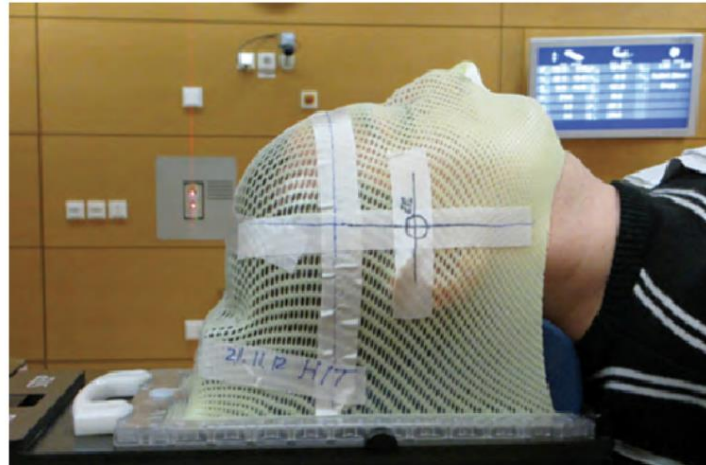


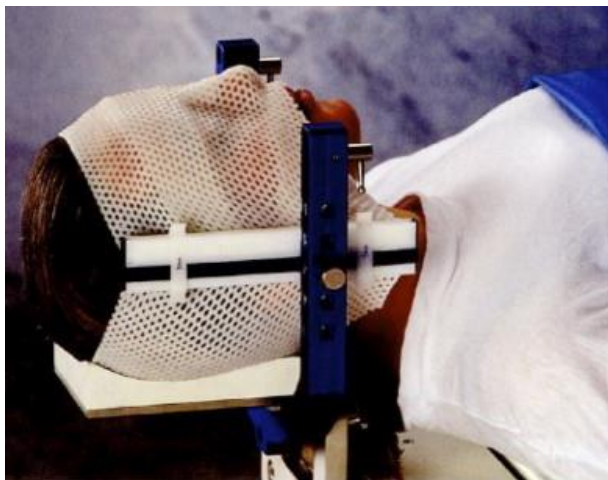
Figure 1.1.8: Comparaison des balistiques de traitement en radiothérapie stéréotaxique. La figure de gauche représente les faisceaux d'un traitement avec un cyberknife tandis que la figure de droite représente les faisceaux d'un traitement par IMRT. (Schuler et al. 2017).

Un aspect important dans la radiothérapie externe est le positionnement du patient. En effet la cible doit être positionnée précisément afin de traiter la tumeur de façon optimale, tout en épargnant au maximum les tissus sains. Historiquement, la tête du patient était immobilisée en fixant l'os du crâne à un cadre stéréotaxique, ce qui était une procédure très invasive. L'utilisation de masques conformationnels est la méthode la plus utilisée aujourd'hui, car elle est moins invasive. Cette méthode utilise un masque en plastique thermoformé qui va prendre la forme de la tête du patient. Ce masque est fixé sur un cadre qui permet de positionner le patient grâce à un système de coordonnées fixes et ainsi de cibler la tumeur avec précision..(W. Li et al. 2016).

Le choix du système de contention dépend du traitement de radiothérapie. Plus un traitement nécessite une grande précision spatiale et un grand nombre de fractions, plus les contraintes sur le positionnement du patient seront importantes (précision, reproductibilité). Il existe 3 niveaux de contention. L'utilisation d'un masque en thermoplastique sans cadre stéréotaxique donne une incertitude de 3 à 5 mm sur le positionnement du patient. Un masque en thermoplastique fixé sur un cadre stéréotaxique permet d'atteindre une incertitude de 1mm. Enfin, l'utilisation d'un cadre stéréotaxique invasif prenant appui sur le crâne du patient permet d'atteindre une incertitude inférieure à 0,5 mm (Figure 1.1.9).



A



B



C

Figure 1.1.9 : Méthodes de contention utilisées en radiothérapie. A. Masque thermoplastique immobilisant le patient sur la table de radiothérapie. B. Masque thermoplastique fixé sur un cadre. C. Cadre stéréotaxique fixé au crâne du patient (Amelio et al. 2013).

1.1.2.2. Traitement des tumeurs primitives de haut grade

Le traitement standard actuel pour les tumeurs cérébrales primitives de haut grade est le protocole de Stupp (Roger Stupp et al. 2005; R. Stupp et al. 2014b). Dans ce protocole, une résection de la tumeur par chirurgie est tout d'abord réalisée, lorsque celle-ci est possible et qu'elle n'affecte pas les fonctions neurologiques. Ensuite, une radiochimiothérapie concomitante est réalisée, en fonction du type moléculaire de la tumeur (Figure 1.1.10).

Pour le glioblastome, un protocole combinant une radiothérapie fractionnée de 60 Gy par fraction de 2 Gy cinq jours par semaine avec une chimiothérapie utilisant le témozolomide (75 mg par m² de surface corporelle par jour) est recommandé. Pour les tumeurs de grade III, il est préconisé de commencer par l'une des 2 modalités (radiothérapie ou chimiothérapie), puis de réaliser le traitement complémentaire en cas de progression de la maladie. La chimiothérapie peut inclure le témozolomide ou une trithérapie avec procarbazine, lomustine et vincristine (Wick et al. 2009; R. Stupp et al.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

2014a). Ce type de thérapie rentre dans le cadre des thérapies combinées, comme nous allons le voir dans la section 1.3.2.

Le témozolomide est un agent alkylant de la base guanine de l'ADN qui va engendrer des réparations aberrantes et provoquer des lésions cytotoxiques (Jacinto and Esteller 2007). Ce traitement améliore la survie médiane des patients, celle-ci atteint 14,6 mois contre 12,1 mois pour la radiothérapie seule, et montre un profil d'effets secondaires acceptable (R. Stupp et al. 2014). Malgré une amélioration de la survie médiane, le pronostic des patients atteints de glioblastome reste très sombre.

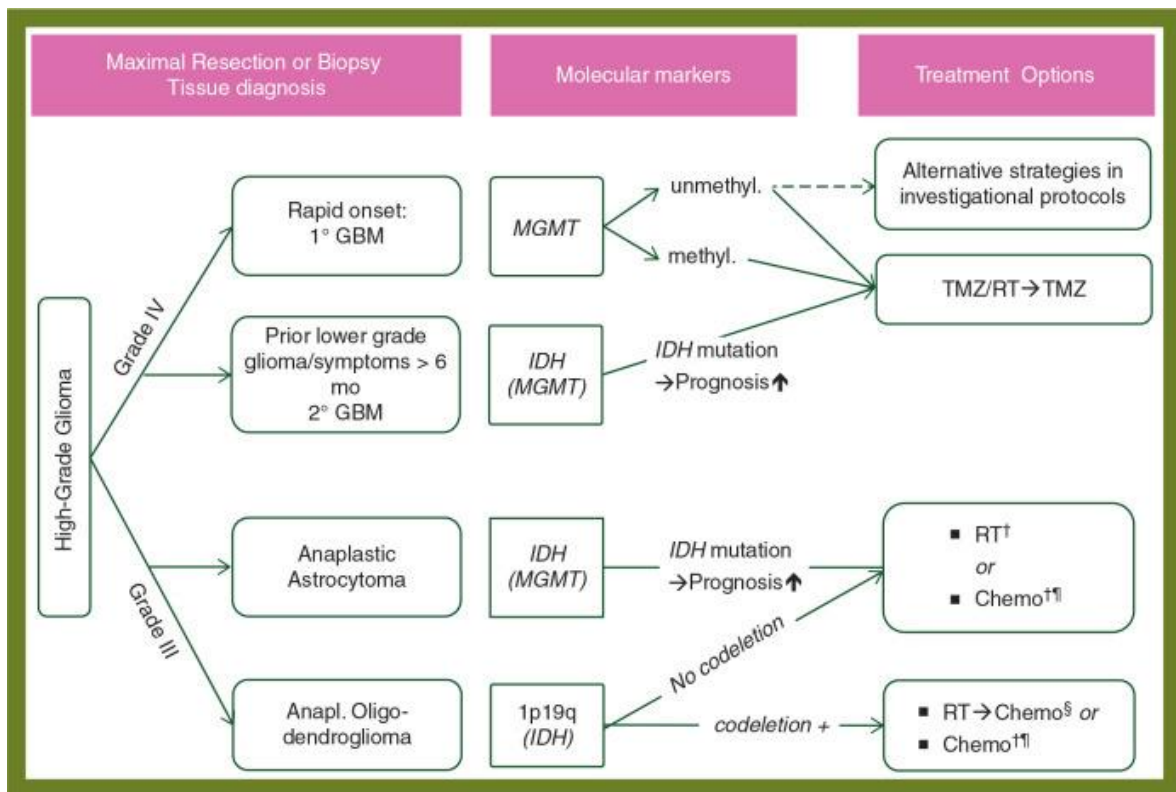


Figure 1.1.10 : Algorithmes de traitement pour les tumeurs gliales de haut grade. 1° : Primitif. 2° : Secondaire. GBM : Glioblastome. MGMT : méthylation du promoteur du gène du methyl-guanine methyltransferase. IDH mutation dans le gène de l'isocitrate déshydrogénase. 1p/19q : codéletion des chromosomes 1p et 19q. RT : radiothérapie. Chemo : chimiothérapie au Témzolomide ou Procarbazine/Lomustine/Vincristine. TMZ : Témzolomide. † RT ou chimio en premier puis l'autre traitement si nécessaire. ‡ : pas de données randomisées pour l'oligodendriome. § : des essais randomisés ont démontré des effets prolongés sur la survie des patients traités avec Procarbazine/Lomustine/Vincristine après radiothérapie. (R. Stupp et al. 2014b)

Dans le cas du glioblastome qui est un type de tumeur très infiltrant, utiliser des balistiques très précises peut s'avérer contre-productif. En effet, un traitement parfaitement délimité ne permettra pas de détruire les cellules tumorales infiltrées dans les tissus sains, qui ne sont pas visibles à l'imagerie. L'utilisation de traitements combinés permet généralement d'améliorer l'efficacité du traitement.

1.1.2.3. Traitement des métastases

En ce qui concerne les métastases cérébrales, la chimiothérapie est considérée comme étant peu efficace. En effet, peu d'études ont montré une amélioration du pronostic des patients après chimiothérapie. (Nicole A. Shonka 2015). Lorsque la localisation de la

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

tumeur ne permet pas la chirurgie, la radiochirurgie stéréotaxique (SRS) ou la radiothérapie stéréotaxique hypofractionnée (hSRT) sont utilisées. Ces deux techniques cherchent à maximiser le gradient de dose entre la tumeur et les tissus sains environnants, à l'aide d'une irradiation de haute précision utilisant des faisceaux multiples. Ainsi les tissus périphériques reçoivent peu de doses alors que la tumeur reçoit une dose élevée.

Lors de ces traitements, les patients sont également installés dans un cadre stéréotaxique, tel que décrit précédemment. Les structures anatomiques sont identifiées par imagerie médicale (scanner X, IRM), ce qui permet de cibler la tumeur avec précision, une fois ses coordonnées connues. (Green 2015). Cette précision dans le positionnement est essentielle autant pour la SRS que pour la hSRT.

La radiochirurgie est un traitement délivré en une seule fraction, qui est fortement focalisé sur la tumeur et qui utilise de multiples faisceaux permettant de limiter l'irradiation des tissus sains à la périphérie. La radiothérapie hypofractionnée permet de délivrer une dose élevée en un nombre limité de séances. Typiquement, un traitement de hSRT peut délivrer 33 Gy à la tumeur en 3 fractions. Il permet de combiner les avantages du fractionnement temporel de la dose avec les forts gradients de la radiochirurgie. Le délai entre les fractions est plus grand que pour un traitement traditionnel (2 ou 3 jours pour la hSRT, contre journalier pour les traitements conventionnels).

L'irradiation panencéphalique ou WBRT (*Whole Brain Radiation Therapy*) a été historiquement le traitement standard pour la plupart des patients présentant des métastases cérébrales. Cette radiothérapie consiste en une irradiation de tout le cerveau du patient et elle est très facile à mettre en place (Figure 1.1.11). Une dose de 30 Gy (ou 36 Gy) est délivrée en 10 séances (ou 18 séances), réparties en 5 séances par semaine, et permet d'atteindre un contrôle tumoral dans 60 à 80% des cas. (Nicole A. Shonka 2015).

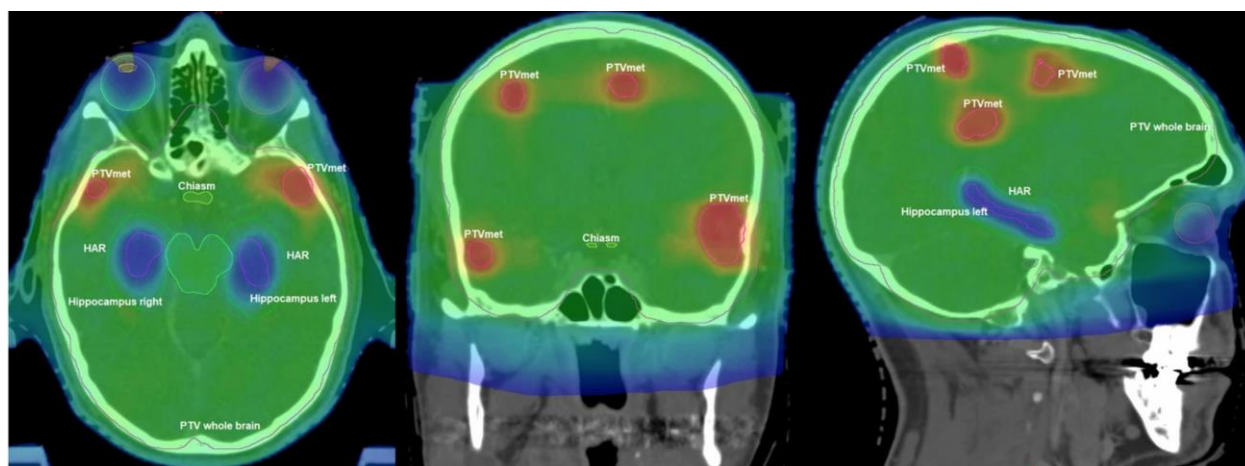


Figure 1.1.11 : Cartes de dose pour d'une irradiation panencéphalique pour le traitement de plusieurs métastases cérébrales (Grosu et al. 2020)

Cette méthode tend à être remplacée par la SRS à cause de ses effets secondaires sur la cognition (fatigue, somnolence et troubles de la mémorisation et de l'apprentissage). Le traitement combiné de la WBRT et de la SRS a été envisagé pour la diminution du risque de récurrence, mais les conséquences sur la qualité de vie globale penchent en défaveur de

l'utilisation de la WBRT. (Achrol et al. 2019). Cependant la WBRT est toujours utilisée lorsque le nombre de métastases est élevé (>4 tumeurs).

Un type de traitement expérimental pour des métastases multiples a été testé avec succès au CHU de Grenoble Alpes. Celui-ci combine une WBRT avec une injection de nanoparticules de gadolinium ayant pour objectif d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie. (Camille Verry et al. 2019). Ce type de traitement combiné suscite de plus en plus d'intérêt, et les nanoparticules ont pour vocation d'occuper une place de choix en oncologie.

Dans la partie suivante, nous allons détailler l'utilisation des nanoparticules en médecine oncologique.

1.2. Intérêt des nanoparticules en oncologie

Les nanotechnologies sont un domaine d'étude très récente, avec un vocabulaire sujet à de fréquentes modifications. L'organisation internationale de normalisation (ISO) définit les termes relatifs aux nanotechnologies dans la norme ISO /TS 80004-2. Selon cette norme, un nano-objet est un matériau dont au moins une des dimensions externes est à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire entre 1 et 100 nm. Les nanoparticules sont des nano-objets dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique. Sinon on parle de nanofibres (2 dimensions nanométriques) ou de nanoplaques (1 dimension nanométrique), comme représenté dans la Figure 1.2.1 (ISO/TS 80004-2:2015[fr] 2015).

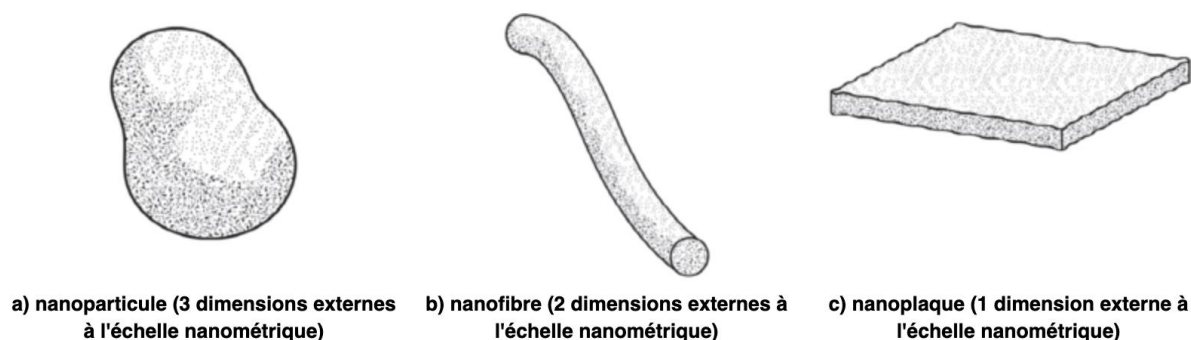


Figure 1.2.1 : Illustration représentant quelques formes de nano-objets (ISO/TS 80004-2:2015[fr] 2015).

Du fait de leurs dimensions, les nanoparticules ont des propriétés physico-chimiques uniques. Dans une première partie, nous allons décrire les propriétés générales des nanoparticules, puis nous discuterons de leurs applications, en particulier en médecine.

1.2.1. Description des nanoparticules

Une nanoparticule est une particule dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ. C'est donc un assemblage d'atomes dont les dimensions se situent à l'échelle nanométrique, entre l'Angström (échelle de l'atome) et le micromètre ou micron (échelle des bactéries) (Figure 1.2.2). Les nanoparticules peuvent être fabriquées par l'homme ou être d'origine environnementale. Leur utilisation remonte à l'Antiquité, mais ce n'est que depuis le XX^e siècle, avec l'arrivée de la microscopie à haute résolution. (Krukemeyer et

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

al. 2015; Mappes et al. 2012) que l'on a commencé à étudier et synthétiser des nanoparticules en exploitant leurs propriétés particulières.

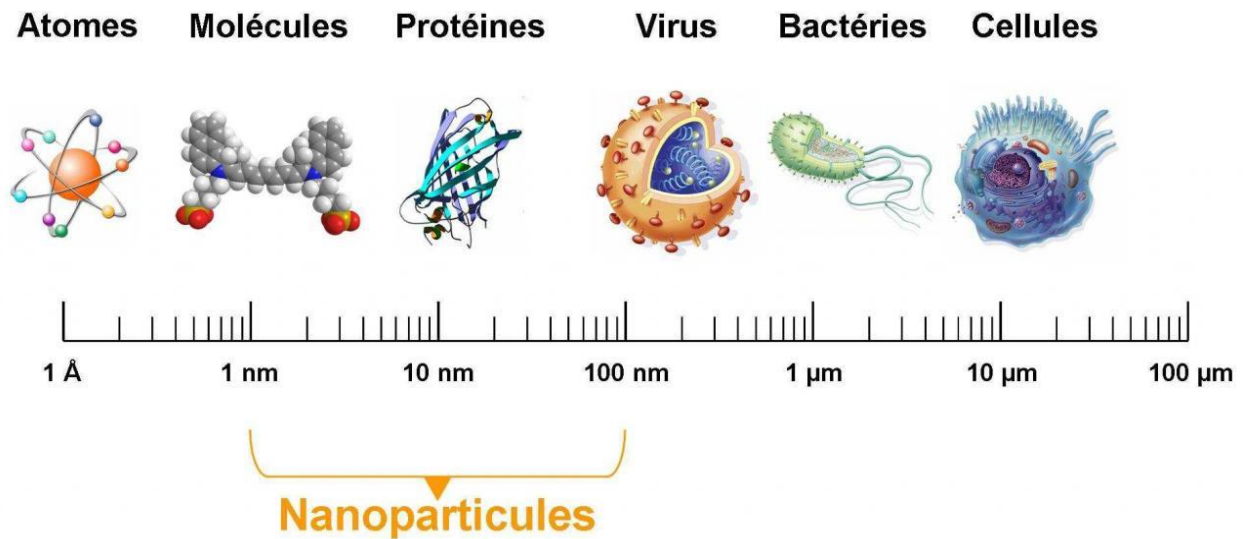


Figure 1.2.2 : Nanoparticules au sein de l'échelle du vivant (Goutayer 2008).

Il existe de nombreux types de nanoparticules, avec des propriétés physico-chimiques différentes (Pisani 2017) et des morphologies très différentes, afin de répondre à des usages spécifiques (Figure 1.2.3).

- A. Les liposomes sont des vésicules formées d'une bicouche lipidique permettant d'encapsuler des médicaments ;
- B. Les nanoparticules polymériques peuvent former des matrices comme des nanosphères, ou des réservoirs comme des nanocapsules ;
- C. Les micelles sont des agrégats lipidiques avec un cœur hydrophobe et une surface hydrophile ;
- D. Les dendrimères sont des assemblages de molécules en arbre à partir d'un cœur ;
- E. Les nanoparticules de silice ont une forte capacité de fonctionnalisation ;
- F. Les nanoparticules métalliques ont un cœur en métal sur lequel sont fixés d'autres éléments. Ce sont les nanoparticules les plus communément utilisées ;
- G. Les Quantum dot sont nanostructures de semi-conducteurs qui ont des propriétés optiques particulières ;
- H. Les nanostructures de carbones ou fullerènes (nanotubes et nanosphères).

Les nanoparticules peuvent aussi être constituées d'un assemblage de matériaux différents en combinant les propriétés des différents matériaux.

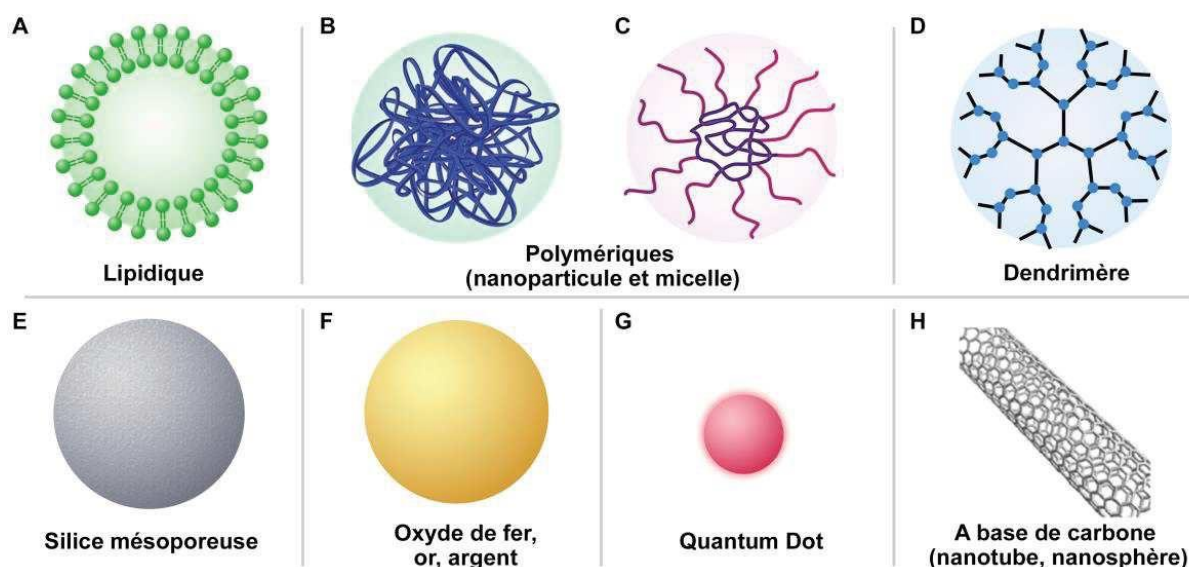


Figure 1.2.3 : Les différents types de nanoparticules étudiés en thérapie et diagnostic (Pisani 2017).

Les propriétés physiques (température de fusion, dureté, durabilité) de la matière changent lorsque la taille des objets se rapproche du nanomètre. La taille des nanoparticules leur confère des propriétés spécifiques d'intérêt pour un usage thérapeutique. Les fonctions spécifiques des nanoparticules sont principalement dépendantes de leur structure et de leur fonctionnalisation. Leur capacité à combiner des molécules ayant des propriétés spécifiques permet d'adapter leur fonction à la cible. Par exemple, pour permettre un meilleur ciblage thérapeutique, des ligands spécifiques comme des anticorps peuvent être fixés à la surface des nanoparticules. (K. Sokolov et al. 2003). D'autres nanoparticules vont jouer sur leur enrobage pour augmenter leur stabilité (Evrin Umut 2013).

1.2.1.1. Structure des nanoparticules

La structure des nanoparticules est en général composée de 3 parties : un cœur qui porte les propriétés d'intérêt de la nanoparticule, un enrobage qui va stabiliser la nanoparticule et la protéger et potentiellement des ligands de fonctionnalisation qui viennent rajouter des fonctions biologiques à la nanoparticule.

1.2.1.2. Taille

La taille des nanoparticules est leur caractéristique principale. En raison de leur petite taille, les propriétés physico-chimiques changent par rapport à leur équivalent à plus grande échelle. Ces propriétés sont principalement dues à l'augmentation du rapport surface/volume. Les réactions chimiques se déroulant en surface, les nanoparticules ont une réactivité plus importante.

De plus, en fonction de leur taille, les voies d'internalisation cellulaire changent (Zhu et al. 2013). Comme illustré dans la Figure 1.2.4, les nanoparticules peuvent pénétrer directement dans les cellules lorsque leur taille est inférieure à 10 nm. Pour les plus grosses nanoparticules, cinq voies d'accès pour pénétrer dans les cellules de mammifère ont été identifiées : la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose clathrine

dépendante, l'endocytose cavéoline indépendante, et l'endocytose clathrine-cavéoline indépendante. (Zhu et al. 2013). À chacune de ces voies d'accès correspond des dimensions spécifiques. Les plus grosses particules seront internalisées par phagocytose (uniquement par les macrophages). Les nanoparticules possédant des ligands spécifiques pourront être internalisées par la voie clathrine dépendante, uniquement si elles ne dépassent pas 120 nm. (Gao, Shi, and Freund 2005; Dobrovolskaia and McNeil 2007).

La taille va aussi influencer les voies métaboliques des nanoparticules. Les nanoparticules de plus petites tailles seront éliminées rapidement par excrétion rénale. Les nanoparticules plus grosses auront une plus grande rétention dans le sang et seront principalement métabolisées par la voie hépatique. (Soo Choi et al. 2007; Yoshioka et al. 2014).

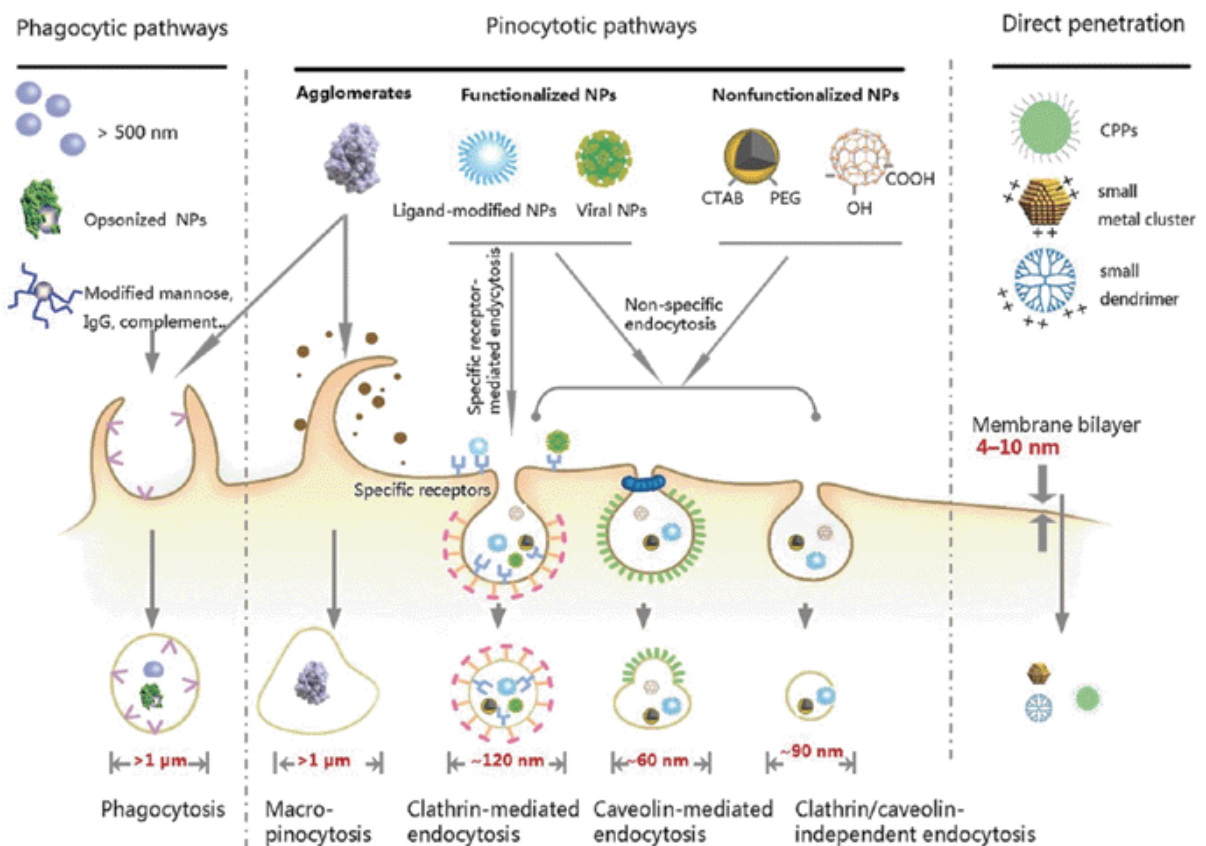


Figure 1.2.4 : Voies d'internalisation en fonction de la taille et de la composition des nanoparticules (Zhu et al. 2013).

1.2.1.3. Surface et charge électrique

La réactivité et la stabilité des nanoparticules vont dépendre des propriétés de surface de la nanoparticule (Evrin Umut 2013). C'est un aspect important des nanoparticules, et de nombreux travaux ont été réalisés pour rendre les nanoparticules adaptées aux organismes vivants, grâce aux enrobages. Une propriété importante de la surface des nanoparticules est la charge de surface des nanoparticules. En effet, la charge de la nanoparticule peut jouer sur les aspects de répulsions entre les nanoparticules et la formation d'agrégats ou d'agglomérats. (Kornberg et al. 2017).

Les agglomérats sont des nanoparticules qui sont liées entre elles par des liaisons faibles, alors que dans les agrégats, elles sont liées par liaisons covalentes, donc plus fortement liées (Figure 1.2.5). Dans le premier cas, les nanoparticules peuvent se séparer facilement en utilisant des forces mécaniques comme la sonication (utilisation d'ultrasons pulsés pour séparer les nanoparticules). Dans les agrégats, le processus est irréversible. (S. Sokolov, Tschulik, and Jurkschat 2015).

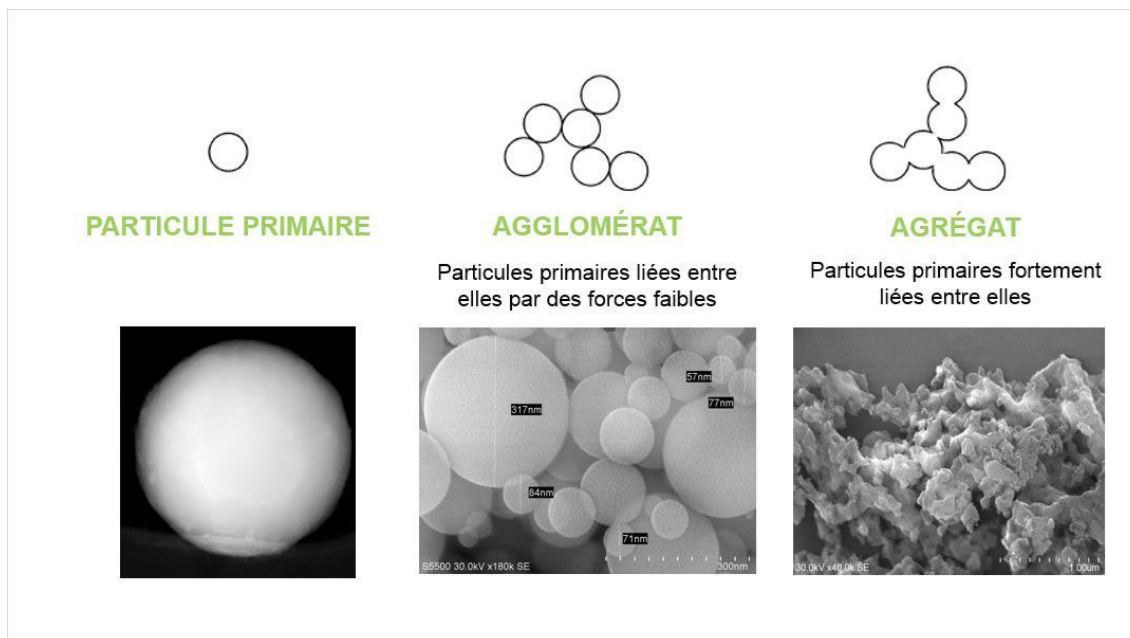


Figure 1.2.5 : Agglomération et agrégation des nanoparticules (d'après <http://www.nanosafety-platform.com>)

La charge électrique des nanoparticules peut être évaluée par le potentiel zêta. Lorsqu'une nanoparticule chargée est en suspension dans un liquide, elle s'entoure d'ions qui vont la recouvrir sous la forme d'une « double couche électrique » :

- Une première couche d'ions adhérents de charge opposée à la nanoparticule qui forment la couche dense ;
- Une seconde couche d'ions non liés qui forme la couche diffuse.

Le plan de cisaillement correspond à la limite entre ces deux couches. Le potentiel zêta (en mV) mesure la différence de potentiel électrique entre la couche adhérente et la couche diffuse au niveau du plan de cisaillement.

Le potentiel zêta représente l'intensité d'attraction ou de répulsion entre les particules. Ainsi il est l'un des paramètres les plus utilisés pour évaluer la stabilité des nanoparticules. On peut modifier la propension des nanoparticules à s'agglomérer, ce qui peut jouer sur la taille finale des nanoparticules et sur le potentiel zêta. (Hanaor et al. 2012; Skoglund et al. 2017).

La forme des nanoparticules peut aussi poser un problème toxicologique. Il a par exemple été démontré que les nanoparticules que sont les nanotubes vont être moins bien internalisées, et sont plus toxiques que les nanoparticules sphériques. (Shin, Song, and Um 2015).

1.2.2. Applications biomédicales des nanoparticules

Bien que d'émergence récente, les nanoparticules ont déjà trouvé de nombreuses applications biomédicales. Un des premiers médicaments à base de nanoparticule à avoir été commercialisé est le nab-paclitaxel, en 2005. Cette nanoparticule possède un cœur hydrophobe contenant un agent chimiothérapeutique, le paclitaxel, recouvert d'une couche protéique d'albumine. Cette formulation a permis d'augmenter la dose de médicament administrée au patient avec moins d'effets secondaires. (Cucinotto et al. 2013). Le paclitaxel est un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules, ce qui empêche la mitose des cellules. Depuis, l'utilisation de nanoparticules n'a cessé d'augmenter. Parmi les utilisations principales, il y a la vectorisation de médicament, le diagnostic clinique, la thérapie, et les applications théranostiques.

1.2.2.1. Vectorisation

La pharmacocinétique particulière des nanoparticules en fait d'excellents vecteurs de médicaments. On utilise généralement des matériaux inertes, stables chimiquement et biocompatibles, qui sont le plus souvent conjugués à d'autres molécules pour mieux cibler l'organe à traiter.

Kruckemeyer et ses collaborateurs décrivent le développement pharmacologique des nanoparticules à visée de vectorisation. Ce développement est passé par plusieurs étapes, reflétant les difficultés rencontrées avec le temps. (Krukemeyer et al. 2015) :

- 1^{re} génération : encapsulation des médicaments par les nanoparticules qui s'accumulent naturellement dans le foie (liposomes, Nanoparticules polymérique) ;
- 2^e génération : enrobages des nanoparticules optimisant la furtivité des nanoparticules contre le système immunitaire et permettant un ciblage passif. Ceci s'est fait principalement par PEGylation (enrobage de Poly-Éthylène Glycol) qui protège les nanoparticules des macrophages. Le ciblage passif dans les tumeurs se fait grâce à l'effet EPR (voir section 1.1.1.3) ;
- 3^e génération : fonctionnalisation des nanoparticules et ciblage moléculaire actif. En liant les nanoparticules avec des ligands spécifiques des cellules tumorales, on peut augmenter l'efficacité de l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur. Les ligands sont souvent des anticorps, mais aussi des peptides se liant à des récepteurs membranaires. La difficulté est de trouver des ligands se liant spécifiquement ou majoritairement dans les cellules tumorales. De plus la localisation en surface du ligand va affecter la stabilité et la furtivité des nanoparticules ;
- 4^e génération : Les nanoplateformes stimuli-responsives. Ces nanoparticules sont capables de libérer l'agent anticancéreux qu'elles contiennent après un stimulus exogène ou endogène. Ces nanoparticules vont activer leurs effets après un stimuli extérieur comme par photothermie, par exemple. Certaines nanoparticules superparamagnétiques peuvent être guidées à l'aide d'un champ électromagnétique.

1.2.2.2. Diagnostic

Les nanoparticules peuvent être utilisées pour des applications en imagerie et en diagnostic. Les propriétés superparamagnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer ou de gadolinium les rendent intéressantes comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (voir Section 1.4.2). Les nanoparticules métalliques peuvent aussi être utilisées en imagerie par rayons X (angiographie, tomographie) grâce à leur composition en éléments de numéro atomique élevé, voir être chargées d'éléments radioactifs pour l'imagerie nucléaire. (Liang et al. 2010).

Des nanoparticules fluorescentes ont aussi été fabriquées à partir de nanoparticules de silice chargées avec des molécules fluorescentes (Santra 2010), ou les quantum dots, qui sont capables d'émettre une fluorescence très intense et stable avec un large choix de fluorochromes (Smith et al. 2006; Parveen, Misra, and Sahoo 2012).

Ces modalités de détection sont souvent combinées en assemblant les différentes propriétés citées, et fonctionnalisées pour mieux cibler la tumeur ou l'organe cible.

1.2.2.3. Thérapies

Plusieurs thérapies innovantes sont basées sur l'utilisation de nanoparticules. La principale utilisation reste la vectorisation de molécules antinéoplasiques dans le cadre de thérapies ciblées, mais d'autres thérapies utilisant les nanoparticules sont basées sur un stimuli externe qui active l'effet de la nanoparticule.

La thérapie photodynamique (PDT) (Lucky, Soo, and Zhang 2015) utilise des molécules photosensibles, qui absorbent la lumière visible et la convertissent en radicaux libres, en particulier des oxygènes singulets 1O_2 . Cette thérapie utilise de plus en plus de nanoparticules pour vectoriser les molécules photosensibles. (Lucky, Soo, and Zhang 2015), mais aussi pour potentialiser l'effet des molécules photosensibles à l'aide de fonctionnalisation de la nanoparticule en amont, à l'aide de transducteurs d'énergie comme des scintillateurs (W. Chen and Zhang 2006), ou des quantum dots (L. Shi, Hernandez, and Selke 2006; Hsu et al. 2013). Certaines nanoparticules peuvent avoir des propriétés photosensibilisantes comme les fullerènes (J. Liu et al. 2007; Liao, Saitoh, and Miwa 2011) ou les nanoparticules d'oxyde de zinc ou d'oxyde de titane (Chatterjee, Fong, and Zhang 2008).

Une autre application pour le traitement du cancer, repose sur l'hyperthermie. En effet, en élevant la température entre 42 et 47°C pendant une dizaine de minutes, on peut détruire les cellules tumorales. (Svaasand, Gomer, and Morinelli 1990; Palanisamy and Wang 2019).

L'irradiation de nanoparticules par de la lumière visible permet d'augmenter la température. La thérapie photo-thermale par exemple, convertit l'énergie lumineuse en énergie vibrationnelle ce qui chauffe et détruit les cellules tumorales. (X. Huang et al. 2008). Ce phénomène est basé sur la résonance plasmonique de surface. Quand la lumière est émise sur une nanoparticule métallique, la nanoparticule forme un dipôle oscillant dans la direction du champ électrique. La fréquence à laquelle l'oscillation atteint son

maximum est appelée fréquence de résonance plasmonique de surface. (Mayer and Hafner 2011). Pour cela, des nanoparticules d'or sous forme de nanotiges (*nanorods*) (X. Huang et al. 2006) ou de nanobilles (*nanoshells*) (Loo et al. 2004) ont été développées. La longueur d'onde d'absorption des nanoparticules dépend de la taille et des proportions de la nanoparticule et peut être réglée pour absorber davantage dans le domaine spectral de la lumière infrarouge, qui a une plus grande pénétration dans la matière que la lumière visible. (X. Huang et al. 2008).

Une autre stratégie pour augmenter la température des tissus tumoraux repose sur la thérapie par hyperthermie magnétique, qui utilise un champ magnétique alternatif pour chauffer des nanoparticules superparamagnétiques (Mahmoudi et al. 2018). Un essai clinique de phase II de thérapie par hyperthermie magnétique a été réalisé pour le traitement du glioblastome à l'aide de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques en combinaison avec la radiothérapie (Maier-Hauff et al. 2011; Mahmoudi et al. 2018). Ce traitement a débouché sur une autorisation de mise sur le marché de ces nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes d'aminosilane, sous le nom de Nanotherm®. Dans cet essai clinique, 59 patients atteints de glioblastome ont reçu une injection de nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 , localement dans la tumeur. La concentration était de 112 mg Fe/mL et le volume médian de 4,5 mL. Un champ magnétique alternatif de 100 kHz avec une intensité allant de 2 à 15 kA/m a été utilisé pour le traitement hyperthermique (délivré pendant 60 min et deux fois par semaine pendant 3 semaines). Une température moyenne de 51,2°C a été obtenue et aucun effet secondaire à long terme n'a été observé. La survie médiane des patients a été améliorée (23,2 mois à partir du premier diagnostic) par rapport au traitement de référence (14,6 mois) (Roger Stupp et al. 2005). Ce traitement présente tout de même des limitations. Il est en effet nécessaire d'enlever tous les éléments métalliques, ce qui contre-indique ce traitement pour les patients porteurs de pacemakers et défibrillateurs. De plus, la concentration très élevée de nanoparticules rend l'IRM impraticable à cause des artefacts provoqués. Enfin, l'injection stéréotaxique est difficile à mettre en place.

Les applications des nanoparticules en radiothérapie recouvrent en partie ce qui a été cité précédemment. En effet, les nanoparticules peuvent être utilisées pour transporter des médicaments radio-sensibilisants ou radio-protecteurs en fonction de l'objectif thérapeutique.

Une autre utilisation des nanoparticules métalliques et des quantum dots vient de leur capacité à augmenter localement la dose grâce à leur numéro atomique élevé (Figure 1.2.6). Les principales nanoparticules étudiées sont les nanoparticules d'or et il existe une ample littérature sur leurs propriétés. (Schuermann et al. 2016; S. Rosa et al. 2017). Il existe d'autres métaux utilisés, parmi lesquels : le fer (X. Li et al. 2020) et ses oxydes (Ali et al. 2016; G.-H. Choi et al. 2012), le gadolinium (Lux et al. 2015), l'argent (P. Liu et al. 2013), le platine (Cheng and Liu 2017).

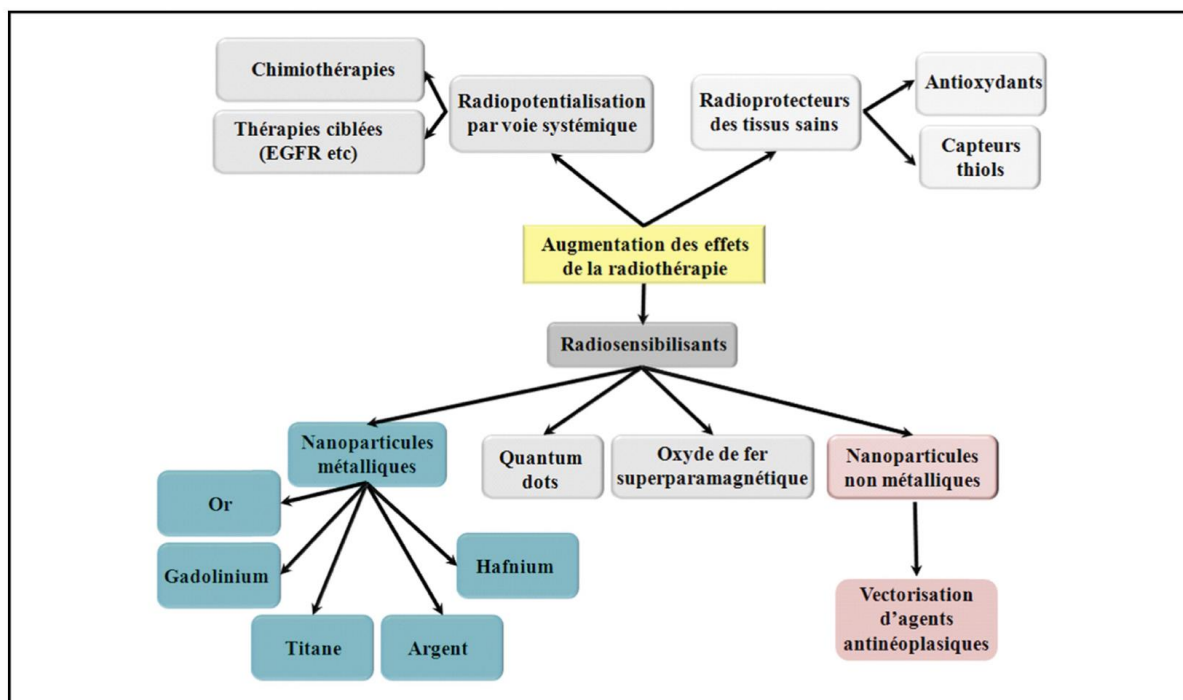


Figure 1.2.6 : Utilisation des nanoparticules en radiothérapie : les nanoparticules peuvent être utilisées comme vecteurs de médicaments de chimiothérapie, pour la radiosensibilisation, jouer un rôle dans la radioprotection, ou être utilisées pour faire du renforcement de dose (Calugaru et al. 2015).

1.3. Radiothérapies combinées pour le traitement des tumeurs cérébrales

Dans cette partie, nous allons décrire le principe des radiothérapies combinées visant à augmenter la dose. En premier lieu, nous allons nous pencher sur les spécificités de ces radiothérapies combinées et détaillerons l'intérêt qu'elles apportent par rapport à une irradiation seule. Ensuite, nous discuterons de l'intérêt du rayonnement synchrotron pour cette approche thérapeutique.

1.3.2. Thérapies combinées : de la radiosensibilisation au renforcement de dose

Le concept de combiner des traitements différents avec la radiothérapie vise à augmenter le contrôle tumoral et ainsi améliorer le traitement. Comme nous l'avons vu dans la section 1.1.2, le traitement concomitant de la radiothérapie avec le témozolomide permet par exemple d'augmenter la survie des patients traités et ainsi mieux contrôler la tumeur en agissant sur les mécanismes de réparation des cellules tumorales. (R. Stupp et al. 2014b).

Il existe 2 modes principaux d'action pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie en utilisant des composés chimiques adjuvants :

- La radiosensibilisation : action d'agents chimiques sur les mécanismes biochimiques des cellules tumorales qui modifient la réponse cellulaire aux rayonnements. Littéralement « qui sensibilise les cellules aux rayonnements » ;
- Le renforcement de dose : augmentation physique de la dose dans la tumeur, en créant un différentiel entre les sections efficaces d'interaction des tissus

tumoraux et des tissus environnants. Par exemple, pour la radiothérapie photonique, on utilisera des éléments de Z élevés que l'on irradiera à basse énergie. Idéalement, la tumeur est chargée de composés contenant des éléments de numéro atomique élevé avant l'irradiation. On profite de la section efficace d'interaction plus élevée des éléments lourds par rapport à celle des tissus sains. On peut aussi utiliser des molécules contenant du Bore dans le cadre de la thérapie par capture neutronique (NCT). Les neutrons ont une faible section efficace avec la matière biologique, mais auront des interactions avec le bore.

Dans les 2 cas, les médicaments doivent être délivrés de manière spécifique à la tumeur pour pouvoir créer un effet différentiel entre la tumeur et les tissus normaux. Le ciblage peut être de nature mécanique, telle que, par exemple, l'injection locorégionale de l'agent dans la tumeur ou par la mise en place de microsystèmes implantables lors d'une chirurgie. (Chakroun et al. 2018). Les différentes voies d'administration possibles seront développées dans la section 2.1.

Dans le cas des tumeurs cérébrales, la BHE fait office de barrière naturelle empêchant la plupart des médicaments de passer dans le cerveau. Comme décrit précédemment, le tissu tumoral en croissance désorganisée, provoque une néoangiogénèse qui désorganise la structure de la BHE. Cette lésion de la BHE dans la tumeur permet d'accumuler préférentiellement l'agent dans la tumeur que dans le cerveau sain (effet EPR). Le ciblage peut aussi être biochimique, en utilisant des biomarqueurs spécifiques des tumeurs *via* l'immunothérapie. (Nelson, Fisher, and Robinson 2014). Des transporteurs comme les nanoparticules (Calugaru et al. 2015) ou les cellules immunitaires (J. Choi et al. 2012; Madsen et al. 2015) peuvent également être utilisés pour cibler les cellules tumorales.

1.3.2.1. Principe de la radiosensibilisation

La radiosensibilisation concerne tous les mécanismes qui vont permettre de rendre les cellules tumorales biologiquement plus sensibles aux rayonnements. Les radiosensibilisants sont traditionnellement classés en 5 catégories, en fonction de leur cible cellulaire. (H. Wang et al. 2018) :

- Les suppresseurs de substances radio-protectrices endogènes, notamment les espèces antioxydantes comme le glutathion, ou des enzymes métabolisant les espèces réactives de l'oxygène ;
- Les précurseurs de molécules cytotoxiques. Certains radiosensibilisants sont inactifs dans leur état normal, mais peuvent former des molécules cytotoxiques par radiolyse ;
- Les inhibiteurs de la réparation des macromolécules ;
- Les dérivés halogénés de la thymine comme l'iododéoxyuridine (IUdR) qui viennent s'insérer dans l'ADN lors de la réplication et qui vont perturber les fonctions de l'ADN ;
- Les analogues de l'oxygène. Ce sont des molécules électrophiles qui vont imiter le comportement du dioxygène et former des radicaux libres.

1.3.2.2. Renforcement de dose ciblée

Une autre approche consiste à augmenter artificiellement (en utilisant des agents exogènes) la dose physique délivrée aux cellules tumorales. L'idée n'est alors pas de rendre les cellules plus vulnérables, mais d'amplifier la dose de rayonnement délivrée. Augmenter physiquement la dose est donc un principe distinct de la radiosensibilisation. Cependant, certains agents qui permettent d'augmenter la dose peuvent également avoir des effets radio-sensibilisants, c'est par exemple le cas de l'IUdR. (Bayart et al. 2017). Dans la littérature, l'augmentation de dose est souvent catégorisée par abus de langage comme de la radiosensibilisation (Calugaru et al. 2015).

Comme vu dans la section 1.1.2.1.3, la dose est un élément clé de la radiothérapie. La dose délivrée à un matériau irradié par un faisceau de rayons X va dépendre :

- Du nombre de photons incidents sur le volume d'intérêt,
- De l'énergie de ces photons,
- De la composition du matériau traversé.

Pour un faisceau monochromatique de photons et sous la condition d'équilibre électronique (les nombres d'électrons entrants et sortants du volume considéré sont égaux), la dose est exprimée par l'équation suivante :

$$D(E) = \Phi \times E \times \frac{\mu_{en}}{\rho}(E) \times 1000 \quad 1.2$$

Avec D la dose (Gy), Φ la fluence du faisceau entrant dans le volume considéré (photons.cm⁻²), E l'énergie d'un photon (J) et μ_{en}/ρ , le coefficient d'absorption massique (cm².g⁻¹) du matériau traversé (Podgorsak 2005).

Pendant longtemps, l'objectif d'optimisation en radiothérapie a été de maximiser le flux de photons et leur énergie. Pour maximiser la différence du flux de photons traversant les tissus normaux et les tissus tumoraux, la tumeur est irradiée selon plusieurs incidences. Ainsi la tumeur reçoit la somme des doses déposées par les différents faisceaux, alors que les tissus normaux, traversés par un seul faisceau, ne reçoivent qu'une dose partielle. De plus, le champ du faisceau (la forme du profil) est adapté à la zone à traiter par modulation d'intensité à l'aide d'un collimateur multilames. Cette méthode permet d'adapter l'intensité du faisceau et ainsi de diminuer la dose délivrée dans les tissus sains.

Le coefficient d'absorption massique du milieu traversé, noté μ_{en}/ρ , ainsi que le coefficient d'atténuation massique, noté μ/ρ , sont des paramètres clés pour l'évaluation de la dose. Ils dépendent de l'énergie des photons incidents ainsi que de la composition élémentaire du matériau (Figure 1.3.1). Le coefficient μ/ρ caractérise l'atténuation totale du matériau, due à toutes les interactions du rayonnement avec la matière, que ce soit par diffusion ou par absorption. Le coefficient μ_{en}/ρ caractérise l'absorption massique d'énergie du matériau.

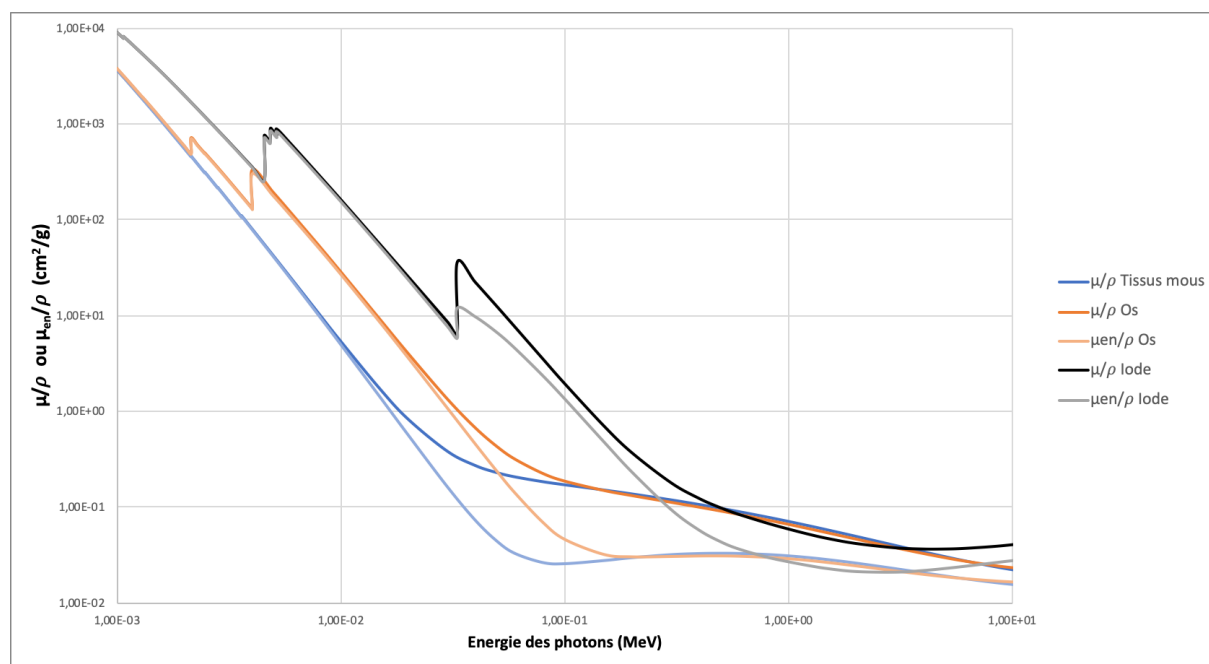


Figure 1.3.1 : Représentation des coefficients d'atténuation massique (μ/ρ) et coefficients d'absorption massique (μ_{en}/ρ) des tissus mous, de l'os et de l'iode en fonction de l'énergie des photons incidents. Les valeurs des coefficients d'atténuation et d'absorption diminuent avec l'énergie du rayonnement photonique, sauf au niveau des seuils d'absorption des éléments.

Aux basses énergies, les photons interagissent principalement par effet photoélectrique et le coefficient d'atténuation ainsi que le coefficient d'absorption massique dépendent fortement de la composition des matériaux traversés. On observe un fort contraste entre les tissus mous et les os ou les agents de contraste comme l'iode. C'est pourquoi cette gamme d'énergie (20-200 keV) est utilisée en imagerie médicale. Les éléments de Z élevés comme l'iode vont fortement atténuer le faisceau et sont donc utilisés comme agent de contraste.

À haute énergie, l'effet Compton prédomine et ce processus dépend peu de la composition du matériau traversé.

Aux débuts de la radiothérapie, les rayonnements utilisés étaient de basse énergie, et cette énergie a augmenté au fil des progrès techniques. Aujourd'hui, la radiothérapie est généralement réalisée avec des énergies supérieures à 1 MeV. Cela permet d'atteindre les tumeurs profondes, et de diminuer la dose dans les tissus sains en amont. En effet, l'irradiation collatérale des tissus normaux peut provoquer des effets indésirables, ce qui limite la dose maximale déposée dans la tumeur.

Un des désavantages de la radiothérapie classique est qu'il n'existe pas de contraste entre les tissus sains et les tissus tumoraux. Pour augmenter le différentiel de dose entre les tissus normaux et la tumeur, on peut chercher à modifier la composition élémentaire de la tumeur, en injectant des éléments de numéro atomique élevé, tels que des agents de contraste, et travailler dans la gamme d'énergie où l'effet photoélectrique est prédominant. Ainsi, la tumeur va absorber davantage de dose que les tissus environnants et cela permettra un meilleur contrôle tumoral. Pour cela, il faut travailler aux basses énergies pour générer un contraste entre les tissus tumoraux ayant absorbé l'agent de contraste et les tissus sains.

Cette stratégie a été proposée à la fin des années 70 par l'équipe de Norman (Norman, Adams, and Riley 1978). Ils ont remarqué que les lymphocytes de patients ayant effectué une angiographie cardiaque présentaient des dommages chromosomiques inattendus. L'angiographie cardiaque est une technique d'imagerie par rayons X qui utilise un agent de contraste iodé pour opacifier les vaisseaux. Après avoir écarté la génotoxicité de l'agent de contraste seul et en prenant en compte la concentration en iode utilisée, ces chercheurs ont émis l'hypothèse que la dose délivrée était augmentée en présence d'atomes lourds (iode dans le cas présent), à cause de l'effet photoélectrique. Cette hypothèse a d'abord été confirmée *in vitro* (Norman, Adams, and Riley 1978; Dawson et al. 1988). Ces chercheurs ont démontré une augmentation de la cytotoxicité induite en présence de l'agent de contraste lorsque le rayonnement utilisé est de basse énergie par rapport à un faisceau de haute énergie.

Ces auteurs ont également calculé le rendement en profondeur dans un fantôme représentant le patient avec une tumeur chargée en iode. Ils montrent qu'en irradiant avec un faisceau de basse énergie (tube X de 250 kVp, gamme d'énergie dans laquelle l'effet photoélectrique est prédominant) la dose déposée dans la tumeur chargée en iode (4mg/mL) est comparable à celle obtenue en utilisant un faisceau de haute énergie (faisceau de cobalt 60 d'énergie 1,25 MeV), mais la dose délivrée aux tissus sains est plus faible (Figure 1.3.2).

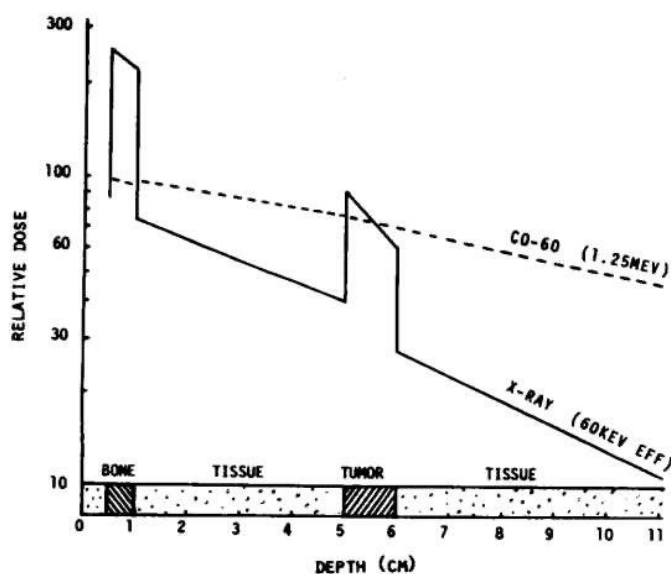


Figure 1.3.2 : Rendement en profondeur dans un fantôme représentant une tête d'homme avec une tumeur contenant 4 mg/mL d'iode. Les courbes sont obtenues pour une irradiation avec un faisceau polychromatique d'énergie effective 60 keV (trait plein), en comparaison avec une irradiation avec une source de cobalt-60 à 1,25 MeV (trait pointillé). Avec le contraste de dose généré par l'iode, on peut obtenir la même dose à la tumeur qu'avec la source de cobalt-60, mais avec moins de dose délivrée aux tissus sains, à l'exception de l'os. D'après (Mello et al. 1983).

Ainsi, avec le contraste de dose généré par la présence de l'iode, on peut obtenir une dose délivrée à la tumeur comparable à celle obtenue avec la source de cobalt-60, mais avec moins de dose délivrée aux tissus sains, à l'exception de l'os. Plusieurs études précliniques réalisées chez le rongeur et chez le chien ont permis de valider cette approche. (Iwamoto et al. 1990; 1993).

Cette équipe a ensuite conduit des essais cliniques à l'aide d'un appareil de tomographie modifié, qui a montré des effets significatifs sur un petit nombre de patients. L'utilisation d'un appareil de tomographie à des fins thérapeutiques présente de nombreuses limitations. Cet appareil possède un faisceau polychromatique et nécessite un refroidissement de la source pendant toute la durée d'irradiation. De plus, le faible débit de dose d'une telle source induit des temps d'irradiation longs par rapport au temps de circulation de l'iode dans les tissus.

Pour caractériser l'augmentation de dose à l'échelle macroscopique dans un milieu homogène, on utilise un facteur nommé « DEF » pour *Dose-Enhancement Factor*, qui est calculé selon le rapport de la dose dans le milieu contenant l'élément lourd, rapporté à la dose dans le milieu sans élément lourd :

$$DEF = \frac{D_{\text{milieu avec élément lourd}}}{D_{\text{milieu sans élément lourd}}} \quad 1.3$$

Avec D la dose mesurée en Gy.

Si l'on prend l'exemple d'un mélange d'eau et d'iode, on peut en première approximation obtenir le DEF en fonction des coefficients d'absorption massiques des éléments μ_{en}/ρ à l'aide de l'équation 1.2:

$$DEF(E) = \frac{(\mu_{en}/\rho)_{\text{eau+iode},E}}{(\mu_{en}/\rho)_{\text{eau},E}} \quad 1.4$$

En première approximation, le coefficient d'absorption massique d'un mélange $(\mu_{en}/\rho)_{\text{total},E}$ (en cm^2/g) correspond à la somme des coefficients d'absorption massique $(\mu_{en}/\rho)_{i,E}$ des n éléments i composant le mélange, pondérés par leurs fractions massiques ω_i (m_i/M). Avec m_i (en g) la masse de l'élément i rapportée à la masse totale M (en g) :

$$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{\text{total},E} = \sum_i^n \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{i,E} \times \omega_i \quad 1.5$$

Si l'on connaît la fraction massique d'iode dans le mélange et que la fraction massique en iode est très petite ($\omega_{\text{iode}} \ll 1$), on peut faire l'approximation :

$$DEF(E) \approx 1 + \frac{(\mu_{en}/\rho)_{\text{iode},E}}{(\mu_{en}/\rho)_{\text{eau},E}} \times C_{\text{iode}} \quad 1.6$$

Avec C_{iode} la concentration en iode (en mg/L)

Les coefficients d'absorption massique dépendent étroitement de l'énergie du faisceau d'irradiation. L'énergie optimale théorique pour le renforcement de dose est ainsi déterminée par la composition des agents utilisés. Sur la Figure 1.3.3 sont représentées les courbes de coefficients d'absorption pour l'eau et l'iode pur, ainsi que le DEF correspondant à une solution contenant 10 mg/mL d'iode calculé selon l'équation 1.6. On

observe alors un pic d'augmentation de dose relativement large (de 40 keV à 80 keV) pour les énergies supérieures au K-edge. Le maximum de DEF est observé vers 50 keV.

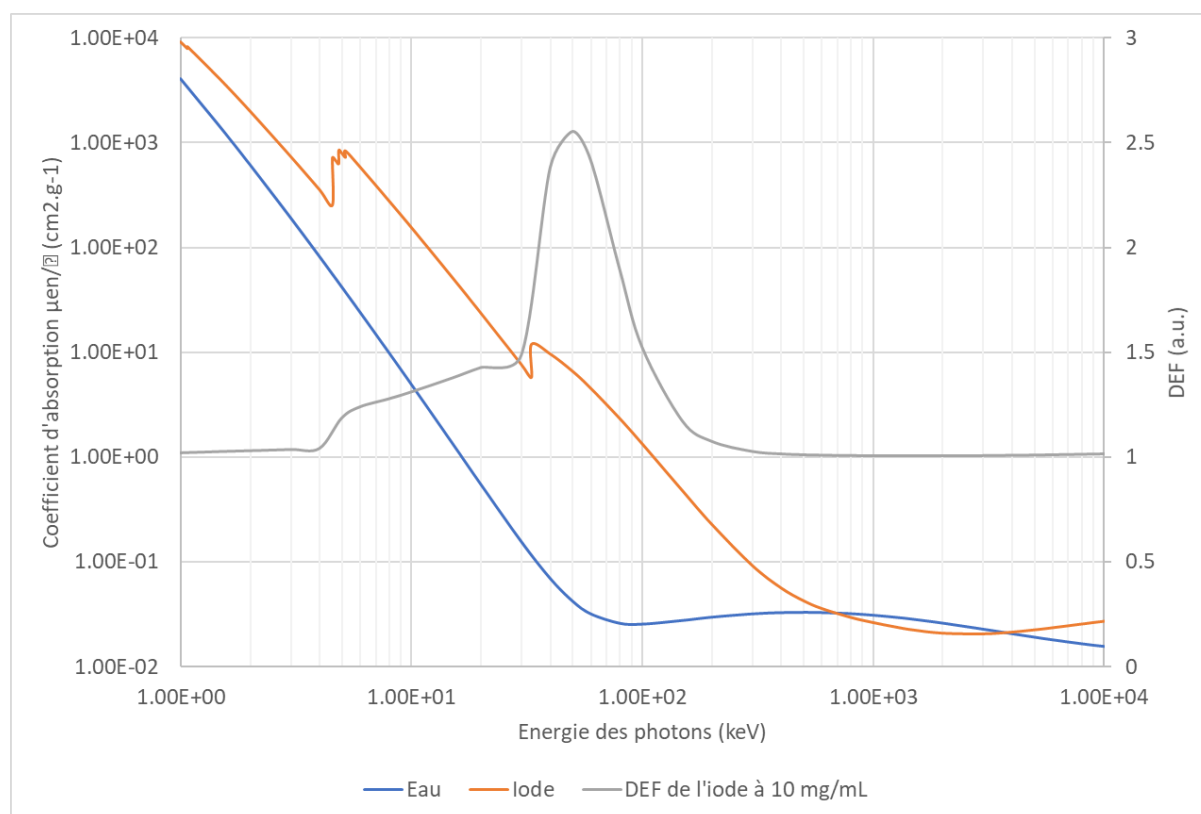


Figure 1.3.3 : Coefficients d'absorption massique de l'eau (bleu), de l'iode pur (orange), exprimée en $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$ et le DEF correspondant à une concentration de 10 mg/mL d'iode (courbe grise et axe de droite), en fonction de l'énergie d'irradiation (keV). On observe un maximum de renforcement de dose autour de 50 keV. Les courbes sont obtenues à partir de la base de données du NIST. (Seltzer 2004).

L'énergie optimale sera différente en fonction de l'élément utilisé (Figure 1.3.4). Des éléments de numéro atomique très élevé comme l'iode ($Z=53$), le gadolinium ($Z=64$) ou l'or ($Z=79$) ont été étudiés (Hainfeld et al. 2013; J.-F. Adam et al. 2003; Delorme et al. 2017), mais cet effet peut également être obtenu avec des éléments de Z plus faible comme le fer ($Z=26$) (G.-H. Choi et al. 2012; Reymond 2018).

Le second facteur important qui déterminera le facteur d'augmentation de dose est la concentration en élément élevé dans le milieu. En effet, le DEF augmente avec la concentration de l'élément considéré (Équation 1.6).

Pour résumer, cette approche présente les avantages et inconvénients suivants :

- Un contraste de dose entre la tumeur chargée en éléments lourds et les tissus sains.
- Un renforcement de dose qui dépend directement de la concentration en agent de contraste ;
- L'utilisation de photons de basse énergie provoque une forte absorption de dose dans l'os ;
- Les photons de basses énergies pénètrent moins profondément dans les tissus que les photons de haute énergie à cause de la forte atténuation.

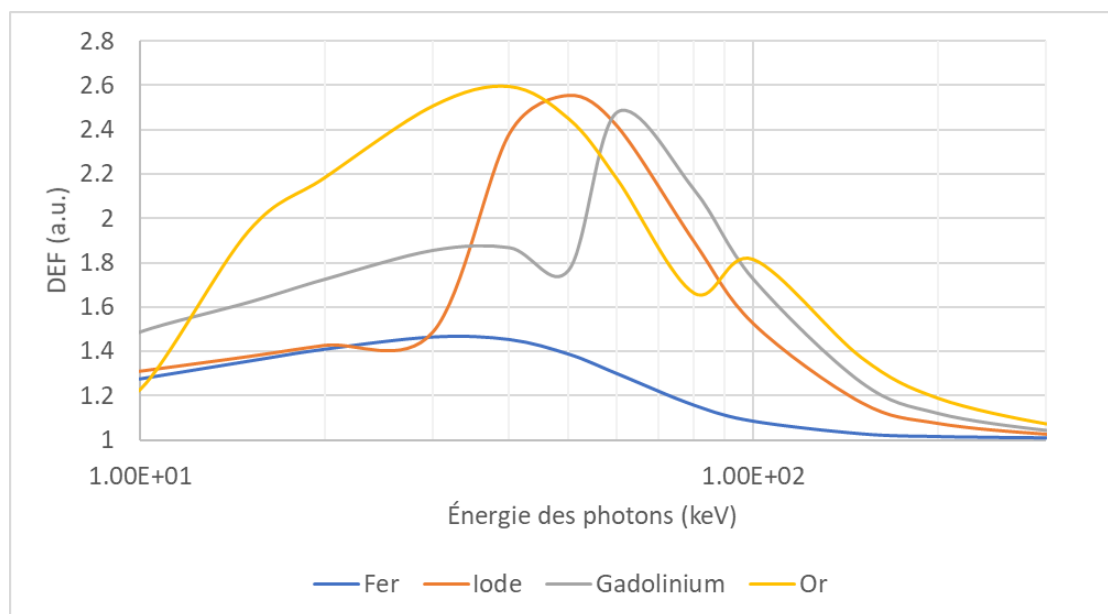


Figure 1.3.4 : Facteurs d'augmentation de dose pour le fer, l'iode, le gadolinium et l'or par rapport à l'eau, en fonction de l'énergie des photons incidents. Les courbes sont obtenues à partir de la base de données du NIST en considérant des éléments purs. (Seltzer 2004).

Dès les premiers essais cliniques, il a été proposé par Solberg et al. d'optimiser cette méthode en utilisant un rayonnement monochromatique. L'utilisation d'un faisceau monochromatique permet de s'affranchir des composantes les plus basses des faisceaux polychromatiques qui sont rapidement atténués dans les tissus et en particulier par l'os du crâne. De plus, un faisceau monochromatique délivré à l'énergie correspondant au maximum du DEF permet d'optimiser l'effet de l'augmentation de dose.

La technique qui nous intéressera au cours de cette thèse est la Radiothérapie stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (SSRT), renforcée par éléments lourds. Cette technique combine une radiothérapie par faisceau monochromatique de photons dans la gamme des interactions photoélectriques avec l'administration de molécules ou de nanoparticules dans la tumeur, afin d'obtenir un différentiel de dose entre la tumeur et les tissus sains environnants.

1.3.3. Thérapies combinées au Synchrotron européen

Le rayonnement synchrotron possède des qualités uniques qui en font un outil inestimable pour la radiothérapie. Cette source produit un faisceau quasi parallèle de rayons X cohérents dans une gamme d'énergie allant de 25 à 200 keV environ avec un flux 10^5 fois plus élevé qu'un appareil de radiologie standard en ce qui concerne la ligne ID17.

1.3.3.1. Principe du rayonnement synchrotron

Le rayonnement synchrotron est un rayonnement électromagnétique qui est émis lorsqu'une particule chargée est déviée de sa trajectoire par un champ magnétique. Selon les équations de Maxwell, toute particule chargée se déplaçant de façon non uniforme

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

émet un rayonnement électromagnétique. Ce phénomène est similaire au rayonnement de freinage, qui se produit lorsque les électrons sont déviés par le champ magnétique induit par les noyaux des atomes constituant la cible dans les tubes à rayons X.

Ce rayonnement est produit par des électrons de haute énergie dans les anneaux de stockage des sources synchrotron comme à l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*). À l'ESRF, ces électrons sont produits de la manière suivante. Un paquet d'électrons est d'abord accéléré par un LINAC (*LI*Near *AC*célérateur) de 16 m de long jusqu'à atteindre une énergie cinétique de 200 MeV. Ils sont ensuite injectés dans un *booster*, qui est un accélérateur circulaire de 300 m de circonférence, composé d'aimants qui guident la trajectoire des électrons et de cavités radiofréquences, qui vont accélérer les électrons. Après plusieurs accélérations dans les cavités radiofréquences, les électrons atteignent une énergie de 6 GeV et sont alors injectés dans un anneau de stockage de 844 m de circonférence, comme représenté Figure 1.3.5 (Chavanne et al. 1992). Cette description correspond à l'état de l'instrument avant les travaux d'amélioration de 2019-2020.

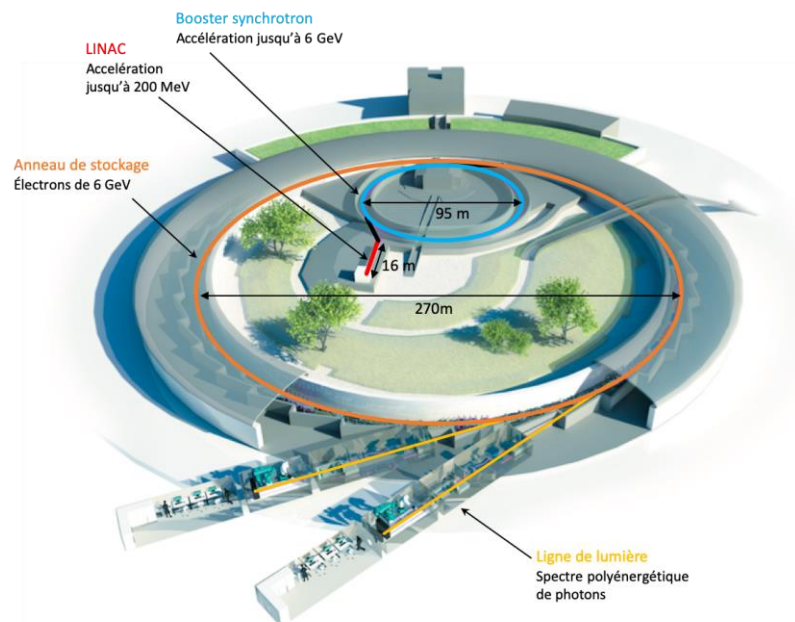


Figure 1.3.5 : Production du rayonnement synchrotron à l'ESRF. Les électrons sont d'abord accélérés dans le LINAC jusqu'à une énergie de 200 MeV. Ils sont ensuite injectés dans le booster Synchrotron où ils sont accélérés jusqu'à atteindre une énergie cinétique de 6 GeV. Ils sont alors injectés dans l'anneau de stockage, où ils émettent des rayons X lorsqu'ils sont déviés de leurs trajectoires par des structures magnétiques le long de leurs parcours. Le rayonnement X émis est exploité dans les lignes de lumière. (Modifié d'après esrf.eu)

L'anneau de stockage est constitué de 32 sections, composées d'éléments magnétiques destinés à contrôler le flux d'électrons. Chaque section possède une partie rectiligne et une partie courbe. Dans la partie courbe, on trouve les aimants de courbure, qui modifient la trajectoire du flux d'électrons pour la diriger dans la section suivante. Dans la partie rectiligne, on trouve des aimants de focalisation qui maintiennent les électrons dans la trajectoire de l'anneau de stockage. Dans la partie rectiligne, on trouve également des éléments d'insertion qui servent à produire du rayonnement synchrotron avec une plus forte brillance que les aimants de courbure. La brillance correspond au flux photonique par unité d'angle solide et par unité de surface de la source, rapportée à une bande

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

passante égale à 0,1% de l'énergie considérée (photons/s/mrad²/mm²/0,1%BW). (Figure 1.3.6,(P. Elleaume 1992)).

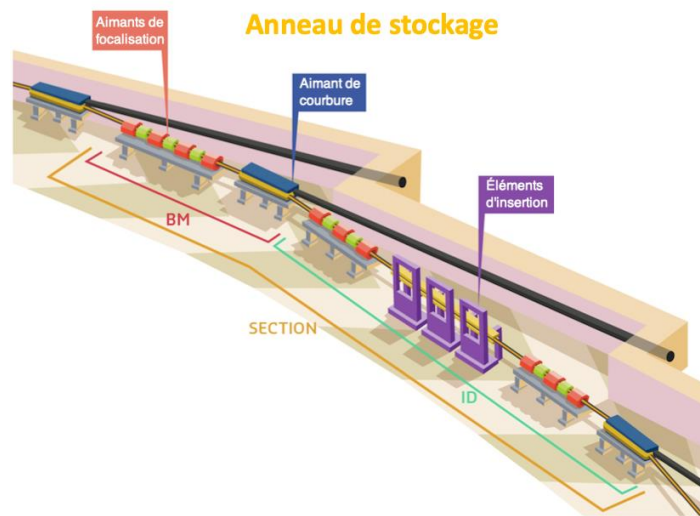


Figure 1.3.6 : Éléments composant chaque section de l'anneau de stockage. Les aimants de courbure ou Bending Magnets (BM) modifient la trajectoire des électrons, tandis que les éléments d'insertion ou « insertion device » (ID) permettent d'obtenir un faisceau de forte brillance (Modifié d'après esrf.eu).

Le rayonnement X synchrotron est émis lorsque les électrons sont déviés de leur trajectoire par les aimants de courbure ou par les éléments d'insertion. Les aimants de courbure, ou *bending magnet*, dévient les électrons pour les garder dans l'anneau de stockage. Ils créent un faisceau de spectres continus. Les éléments d'insertion sont de 2 types : les onduleurs et les *wigglers*. Le mécanisme est le même : les électrons traversent une série d'aimants de polarité alternée. Ils se mettent à osciller sur leur parcours dans l'élément d'insertion et produisent du rayonnement synchrotron. La différence entre ces deux éléments d'insertion vient principalement de la périodicité des aimants :

- Le *wiggler* produit un spectre continu comme dans les aimants de courbure, mais avec une intensité plus élevée ;
- Dans les onduleurs, les rayonnements produits par les différents aimants interfèrent à chaque période, le spectre du rayonnement est discret et composé d'une fréquence fondamentale et d'harmoniques. Les onduleurs sont des sources de rayonnement X très intenses.

Dans chaque section, le faisceau synchrotron est conduit à travers les « lignes de lumière », qui sont des sections rectilignes permettant d'utiliser le rayonnement X dans les cabines expérimentales. Ce faisceau de rayons X possède des caractéristiques particulières. Il possède une forte brillance et une importante cohérence spatiale et temporelle. Il est également très stable, polarisé, pulsé, et de faible divergence. (Thomlinson et al. 2000).

Le rayonnement synchrotron a de nombreuses applications, allant de l'étude de la composition des matériaux à la cristallographie des protéines, en passant par la microtomographie et la microfluorescence X. Chaque ligne de lumière est composée d'une installation particulière pour son usage spécifique.

Le travail effectué dans cette thèse a été réalisé sur la ligne de lumière ID17 (*Insertion Device 17*) de l'ESRF. Cette ligne est spécialisée dans les applications biomédicales du rayonnement synchrotron, en imagerie médicale et en radiothérapie. Des techniques innovantes d'imagerie y ont été développées comme l'angiographie coronarienne, la tomographie quantitative à deux énergies. (Taupin 2013) et par soustraction K-edge (H. Elleaume et al. 2002), et l'imagerie par contraste de phase (Bravin, Coan, and Suortti 2013b).

La recherche en radiothérapie est divisée en trois axes de recherche principaux : la radiothérapie par micro-faisceaux (MRT) (Prezado et al. 2010; Braeuer-Krisch et al. 2015), la radiothérapie par effet « FLASH » (Montay-Gruel et al. 2018b), et la radiothérapie synchrotron par renforcement de dose (DE-SSRT) (Prezado et al. 2010; 2011).

Les systèmes d'insertion sur cette ligne de lumière sont deux *wigglers* qui produisent un faisceau avec une très faible divergence, environ 1 mrad horizontalement et 0,1 mrad verticalement (H. Elleaume et al. 1999).

Le faisceau de rayons X produit est polychromatique avec une brillance très élevée (Figure 1.3.7). Ce faisceau est 5 ordres de grandeur plus intense que celui produit par un tube à rayons X conventionnel. Ceci permet de sélectionner à l'aide d'un monochromateur une bande passante en énergie très fine, tout en gardant une intensité suffisante pour les applications d'imagerie ou de radiothérapie médicale.

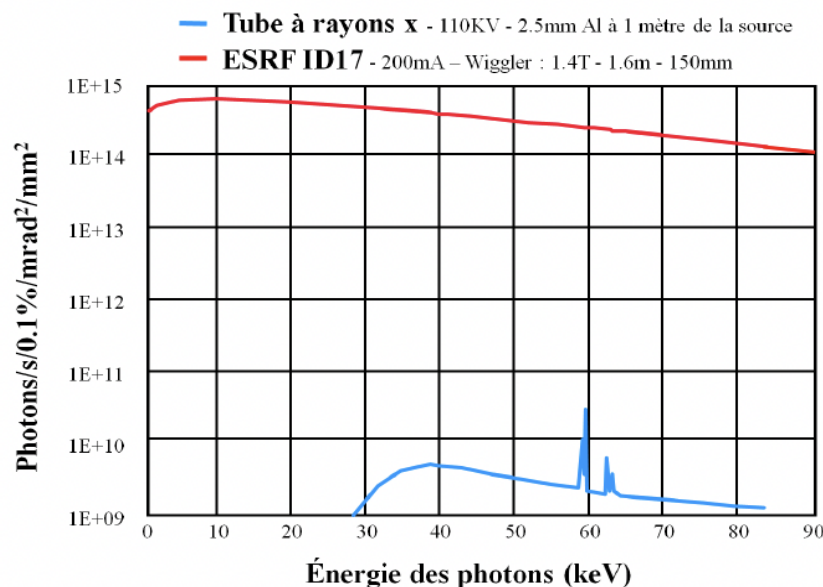


Figure 1.3.7 : Spectre énergétique du rayonnement synchrotron sur la ligne ID17 comparé avec le spectre d'un tube à rayons X utilisé en imagerie. Le flux de photons sur la ligne id17 est 10^5 fois plus intense que sur un tube conventionnel et sur une plus grande bande d'énergie. (H. Elleaume et al. 1999).

La ligne de lumière ID17 est composée de 2 cabines expérimentales. La première est située à 40 m de la source et est spécialisée dans les applications en MRT et radiothérapie FLASH. La seconde est située à 150 m de la source et est utilisée pour la radiothérapie par renforcement de dose, ainsi que pour l'imagerie médicale (Figure 1.3.8).

Les applications d'imagerie et de SSRT reposent sur l'utilisation d'un monochromateur pour sélectionner une bande d'énergie très fine ($[E/E = 10^{-3}]$). Cet appareil est basé sur l'utilisation de 2 cristaux de silicium d'orientation cristalline [111] montés en géométrie de Laue. (Suortti et al. 2000). Le faisceau polychromatique est réfracté par le premier cristal et le second cristal permet de ramener le faisceau dans le plan horizontal. Ce dispositif permet de sélectionner la longueur d'onde désirée en jouant sur l'angle entre le faisceau et les cristaux. La formule de Bragg prédit la réflexion de certaines harmoniques. L'harmonique la plus importante est la troisième harmonique Si(333) qui contribue à la hauteur d'environ 1% du faisceau. (Suortti et al. 2000). Le taux relatif d'harmoniques peut cependant augmenter lorsque le champ magnétique du *wiggler* augmente. Il peut aussi augmenter lorsqu'on utilise des filtres ou quand l'objet irradié est grand avec le durcissement de faisceau, les rayons X de plus basses énergies étant rapidement atténués. (Suortti et al. 2000; Obeid 2016).

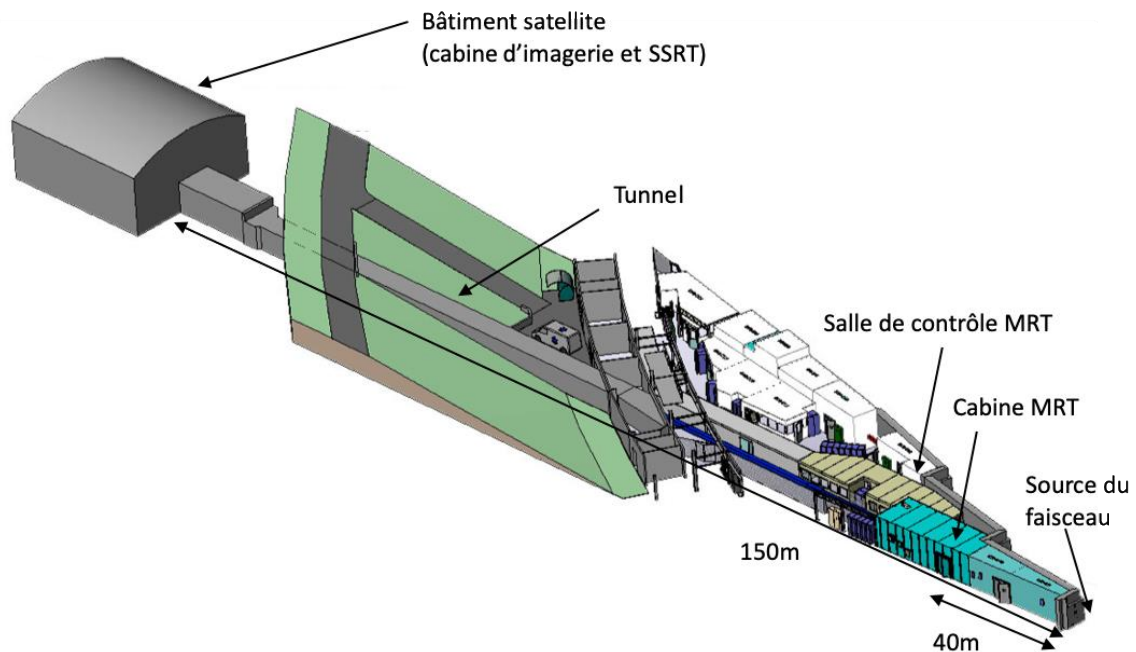


Figure 1.3.8 : Ligne de lumière ID17. La ligne est composée de 2 cabines expérimentales, la cabine MRT située à 40 m de la source et la cabine SSRT située à 150 m de la source. Cette distance permet d'avoir un faisceau large (15 cm) (d'après esrf.eu).

1.3.3.2. Applications biomédicales du rayonnement synchrotron.

Le faisceau synchrotron offre plusieurs avantages qui le rendent unique dans plusieurs modalités de radiothérapie :

- La radiothérapie par micro-faisceaux (MRT) utilise des faisceaux de taille micrométrique pour augmenter l'effet dose-volume. L'effet dose-volume découvert par Withers et al. (Rodney Withers, Taylor, and Maciejewski 1988) repose sur la plus grande tolérance des tissus sains lorsque le volume irradié est plus petit ;
- La radiothérapie par effet FLASH est basée sur la tolérance des tissus sains aux hauts débits de dose ($> 40 \text{ Gy/s}$). Cet effet a été mis en évidence récemment par Favaudon *et al.* Ces études ont été réalisées sur des rongeurs irradiés par des

faisceaux d'électrons. (Favaudon et al. 2014). Le faisceau synchrotron offre également de très hauts débits de dose lorsqu'on utilise un large spectre (Montay-Gruel et al. 2018a) ;

- La radiothérapie stéréotaxique synchrotron avec renforcement de dose (DE-SSRT) cherche à augmenter le différentiel de dose entre la tumeur et les tissus sains environnants en utilisant des éléments de numéro atomique élevé localisés dans la tumeur. Le rayonnement synchrotron permet d'utiliser un faisceau monochromatique avec un débit de dose suffisant pour faire de la radiothérapie et de sélectionner l'énergie optimale.

Le faisceau synchrotron est aussi utilisé pour l'imagerie médicale par rayons X. Ces modalités peuvent également bénéficier de l'utilisation d'un faisceau monochromatique :

- L'imagerie quantitative par rayonnement synchrotron permet de mesurer et de quantifier la présence d'un agent de contraste dans l'organisme. Cette technique est basée sur l'acquisition de plusieurs images dans des conditions différentes que l'on va combiner, pour quantifier les concentrations des différents éléments ;
 - Soustraction temporelle : on acquiert 2 images avant et après l'ajout d'un agent de contraste. Cette méthode ne peut pas être utilisée pour imager des structures qui se déplacent dans le temps, à moins d'utiliser des techniques de recalage d'images sophistiquées.
 - Soustraction K-edge : en utilisant un monochromateur dédié, il est possible d'acquérir deux images simultanément à deux énergies différentes, réglées de part et d'autre du K-edge de l'élément d'intérêt. On profite de l'augmentation brutale de l'absorption de l'agent de contraste lorsqu'on passe au-dessus de l'énergie de liaison des électrons de la couche K de l'agent de contraste. L'utilisation du K-edge de l'agent de contraste, plutôt que deux énergies éloignées, permet de séparer par simple soustraction l'agent de contraste dans des matériaux ayant des propriétés d'absorptions différentes (H. Elleaume et al. 2002),
- L'imagerie par contraste de phase est basée sur la mesure du déphasage des photons cohérents lorsqu'ils traversent la matière. Cette modalité d'imagerie permet d'observer des délimitations de structures dont les coefficients d'atténuation sont similaires en imagerie d'absorption. (Bravin, Coan, and Suortti 2013a).

1.3.3.3. La Radiothérapie stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron

La radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron ou SSRT (*Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy*) se base sur la photoactivation d'éléments de numéro atomique élevé qui sont préalablement accumulés dans la tumeur, pour provoquer un renforcement local de la dose (voir section 1.3.2.2). Nous avons vu que pour optimiser le renforcement de dose, un faisceau de faible largeur de bande d'énergie permet de diminuer le durcissement du faisceau en s'affranchissant des photons de plus basse énergie, ce qui permet de ne garder que les énergies pour lesquelles le différentiel de dose entre la tumeur et les tissus sains est le plus élevé. Nous avons vu aussi que les sources synchrotron permettent de fournir un faisceau suffisamment intense pour sélectionner avec un monochromateur une longueur d'onde spécifique tout en conservant un débit suffisant pour des applications de radiothérapie. De plus la possibilité de sélectionner

l'énergie du faisceau permet de se placer à l'optimum du renforcement de dose (Figure 1.3.4).

Sur ID17, les premières études *in vitro* et précliniques sur le renforcement de dose ont été réalisées au début des années 2000 (J.-F. Adam et al. 2006; Corde 2002; Magali Edouard 2010; Bobyk et al. 2013; Boudou 2006), à la suite des premiers essais cliniques de tomothérapie de phase I avec renforcement de dose par l'iode, réalisés par Norman *et al.* en utilisant un générateur de rayons X conventionnel (scanner modifié) (Rose et al. 1999).

La radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron combine les effets d'une radiothérapie stéréotaxique, avec le renforcement de dose. Comme le phénomène a été découvert lors d'utilisation d'agents de contraste iodés, ces médicaments ont été les premières molécules à être utilisées. (Mello et al. 1983). De plus, les agents de contraste iodés s'accumulent suffisamment dans les tumeurs ce qui permet d'obtenir le contraste entre la tumeur et les tissus sains, et le profil toxicologique de ces produits était déjà connu.

La SSRT renforcée par le ioméprol (agent de contraste iodé) est en cours d'essai clinique de phase I-II (essai clinique NCT01640509). Ces essais sont réalisés en conditions stéréotaxiques, en multipliant le nombre de faisceaux, ce qui permet d'optimiser l'effet différentiel entre la tumeur et les tissus sains : en augmentant le nombre de faisceaux, chaque faisceau individuel déposera une dose plus faible sur son parcours, ce qui réduira la dose aux tissus sains, mais les faisceaux se croisant dans la tumeur, cette dernière recevra une dose plus élevée.

D'autres agents contenant des éléments de numéro atomique élevé peuvent aussi être utilisés pour augmenter la dose locale et obtenir un meilleur contrôle tumoral. Le développement récent des nanoparticules dans les applications médicales a permis le développement de nombreuses recherches pour cette application.

Ces agents peuvent être divisés en 3 catégories. Les agents de contraste, les intercalants de l'ADN et les nanoparticules :

- Les agents de contraste sont utilisés en imagerie. Parmi ceux-ci, on trouve les molécules iodées comme l'ioméprol (Iomeron®) ou le Magnevist® un agent de contraste IRM à base de gadolinium. (Corde 2002; J. F. Adam et al. 2005; le Duc et al. 2004; Taupin et al. 2015);
- Les intercalants de l'ADN sont des molécules qui pénètrent dans le noyau des cellules et se fixent à l'ADN. Parmi ceux-ci, on trouve l'IUdR (Bayart et al. 2017), qui est un analogue de la thymidine et qui s'incorpore dans l'ADN en formation. On trouve aussi les sels de platine qui sont des agents alkylants de l'ADN, c'est-à-dire qu'ils s'attachent sur les bases guanines de l'ADN. Parmi ceux-ci, on peut citer le cisplatine. (Julia Rousseau et al. 2010) et le carboplatine (Corde 2002) qui ont montré une radiosensibilisation plutôt qu'un effet dû au renforcement de dose : leur effet n'étant pas dépendant de l'énergie du rayonnement, il s'agirait plutôt d'une action de chimioradiothérapie, les intercalants empêchant les réparations de l'ADN :
- L'utilisation de nanoparticules en radiothérapie a commencé par les nanoparticules d'or (Hainfeld, Slatkin, and Smilowitz 2004). Leur avantage en

radiothérapie est dû à leur stabilité, ce qui permet d'accumuler une quantité plus importante d'éléments de Z élevé. La plupart des métaux lourds sont hautement toxiques et nécessiteront des études de toxicité poussées avant leur emploi en clinique. Les nanoparticules ont beaucoup été étudiées pour profiter de l'effet EPR (voir section 1.1.1.3) et pénétrer la barrière hémato-tumorale. (Krishnan 2020; Smilowitz et al. 2018; Hainfeld et al. 2019).

On peut également citer les nanoparticules de gadolinium (Camille Verry et al. 2019), l'oxyde de fer (G.-H. Choi et al. 2012) et les nanoparticules d'iode (Hainfeld et al. 2019). Les nanoparticules d'or (AuNP) ont montré une très bonne efficacité pour le traitement de carcinome mammaire (lignée EMT-6) implantée dans le flanc de souris (Hainfeld, Slatkin, and Smilowitz 2004) mais le passage à la clinique est limité par le métabolisme des nanoparticules dans l'organisme (Hainfeld et al. 2019) :

- Les AuNP de plus petites tailles (< 5 nm) sont rapidement éliminées par les reins, et ne s'accumulent pas en quantité suffisante dans la tumeur (Schuermann et al. 2016; Soo Choi et al. 2007) ;
- Les AuNP sont absorbés par les macrophages, mais ne sont pas digérés parce que les AuNP sont insolubles. La rétention des nanoparticules dans tout l'organisme bloque les autorisations de mise sur le marché. (Sadauskas et al. 2009; Hainfeld et al. 2019) ;
- Les AuNP sont aussi très colorées et les cellules de la peau peuvent les absorber ce qui provoque une coloration de la peau et du pelage quasi permanente, comme représentée sur la Figure 1.3.9 (Fleming et al. 1996; Hainfeld et al. 2013).

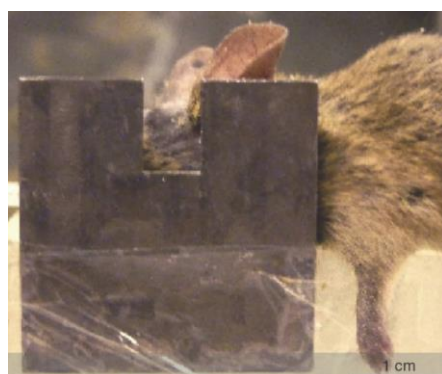


Figure 1.3.9 : Souris ayant subi une injection de nanoparticules d'or ayant coloré son pelage (Hainfeld et al. 2013).

De nombreux atomes lourds montrent un effet radiosensibilisant en plus du renforcement de dose. Les mécanismes d'action des nanoparticules ne sont pas totalement élucidés et plusieurs explications sont suggérées. La détermination des effets biologiques est complexe. Par ailleurs, il est difficile de comparer entre elles les études, car elles utilisent des nanoparticules fabriquées localement, avec des enrobages différents, pouvant affecter l'activité biologique des nanoparticules. (Krishnan 2020).

Une nanoparticule hybride silicium-gadolinium (AGuIX) est en cours d'essais cliniques de phase II pour radiosensibiliser des métastases cérébrales lors d'une irradiation panencéphalique de 6 MV (spectre polychromatique avec une énergie maximale de 6 MeV) (Camille Verry et al. 2019; C. Verry et al. 2019). Un autre type de nanoparticule à base d'oxyde d'hafnium, NBTXR3, est aussi en phase d'essais cliniques pour faire de la

radiosensibilisation à haute énergie pour plusieurs types de cancers (ORL, Rectum, carcinome hépatocellulaire, prostate, sarcome des membres). Des résultats encourageants de phase II/III ont été publiés pour le traitement des sarcomes des membres, avec une radiothérapie de 50 Gy délivrée en 25 fractions et un faisceau de 6 à 18 MV. Les nanoparticules d'oxyde d'hafnium ont été injectées en intratumoral. (Bonvalot et al. 2017; 2019).

D'autres nanoparticules ont montré des résultats d'augmentation de survie *in vivo*. Parmi celles-ci on peut noter les nanoparticules d'iode. (Hainfeld et al. 2019) utilisées chez des souris ayant un glioblastome humain (lignée U87-MG), les nanoparticules d'oxyde de fer (G.-H. Choi et al. 2012) utilisées chez des souris ayant un adénocarcinome de côlon murin (lignée CT26). L'irradiation des tumeurs a été réalisée à des énergies qui prennent en compte le renforcement de dose physique : 100 kVp pour les nanoparticules d'iode et 7,1 keV pour les nanoparticules d'oxyde de fer.

1.3.4. Modélisation pour le renforcement de dose par les nanoparticules

Le calcul de dose par la simulation informatique est une étape fondamentale en radiothérapie. La simulation d'un traitement est liée aux modèles physiques qui représentent les interactions des rayonnements avec la matière. (Ahnesjö and Aspradakis 1999). La modélisation informatique est nécessaire dans 2 domaines :

- Le calcul de dose dans un volume géométrique donné. La radiothérapie externe nécessite un plan de traitement qui cherche à optimiser la balistique d'irradiation de la tumeur. Cette balistique est dépendante du volume à traiter et de la physique régissant le transport des particules. La description de la planification de traitement sera développée dans le Chapitre 3 ;
- L'étude des interactions des rayonnements avec la matière à l'échelle cellulaire et des réactions chimiques qui en découlent. Cette approche est importante dans l'évaluation de la dose autour des nanoparticules. Leur distribution microscopique influe sur la dosimétrie.

Les calculs de dose sont souvent réalisés par la méthode de Monte-Carlo qui est basée sur des procédés stochastiques. (Ahnesjö and Aspradakis 1999) Cette méthode permet d'étudier les interactions rayonnement-matière à plusieurs échelles : macroscopiques, microscopiques ou nanoscopiques (Magali Edouard 2010; McMahon et al. 2011). Dans le cadre de l'évaluation de l'augmentation de dose en présence d'éléments lourds, les études macroscopiques supposent en général un mélange homogène de tissus avec l'agent renforceur de dose, tandis que les études nano- ou microscopiques prennent en compte la géométrie particulière des nanoparticules et leur distribution, à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

Les études réalisées à l'échelle macroscopique ne permettent pas toujours d'expliquer la totalité des résultats biologiques (Reymond 2018; Cho 2005). Des simulations effectuées à l'échelle des nanoparticules ont montré que la taille des nanoparticules peut avoir une influence sur la distribution de dose (Keshavarz and Sardari 2019; Delorme et al. 2017).

Dans le contexte de la radiothérapie synchrotron combinée avec les nanoparticules métalliques, le calcul de dose a été étudié extensivement (Magali Edouard 2010; Delorme

2013). (Delorme et al. 2017; M. Edouard et al. 2010; Prezado et al. 2009). Des travaux qui ont été menés au sein de l'ESRF ont montré l'intérêt des nanoparticules métalliques pour le renforcement de dose (Delorme 2013). Après avoir réalisé des essais sur des molécules ayant des atomes de Z élevés comme le ioméprol et le cisplatine, les essais se sont développés sur des nanoparticules d'or et de gadolinium. Enfin des essais sur des nanoparticules d'oxyde de fer ont été testés. (Reymond 2018).

Dans cette dernière partie nous allons nous intéresser aux nanoparticules d'oxyde de fer, ou IONP et décrire leur intérêt pour la radiothérapie par renforcement de dose.

1.4. Les nanoparticules d'oxyde de fer et leur utilisation en médecine

1.4.1. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'oxyde de fer

Le fer est largement utilisé sous forme de nanoparticules (Palanisamy and Wang 2019), car il est très accessible et il existe de nombreuses méthodes de synthèse faciles à mettre en œuvre (Ali et al. 2016). En médecine, il est principalement utilisé sous forme d'oxyde de fer, car il présente sous cette forme des propriétés superparamagnétiques qui sont utilisées en imagerie et en thérapie.

L'aimantation décrit le comportement magnétique d'un matériau au niveau macroscopique. Les matériaux sont caractérisés par la façon dont leur aimantation réagit quand on applique un champ magnétique.

Les matériaux paramagnétiques s'aimantent uniquement en réponse à un champ magnétique, dans la même direction que ce champ. Contrairement au ferromagnétisme, l'aimantation des matériaux paramagnétiques n'est pas assez forte pour vaincre l'agitation thermique et l'aimantation globale devient nulle en l'absence de champ magnétique externe. (Dormann 1981).

Les matériaux ferromagnétiques gardent une aimantation non nulle, même en l'absence d'un champ magnétique. Cela est dû à leur susceptibilité magnétique plus élevée, qui conserve les moments magnétiques des atomes alignés et provoque une aimantation globale. (Dormann 1981).

Les matériaux ferrimagnétiques ressemblent macroscopiquement aux matériaux ferromagnétiques, mais possèdent une structure magnétique interne différente (Aimantation antiparallèle pour les matériaux ferrimagnétiques et parallèle pour les matériaux ferromagnétiques) (Dormann 1981). Ces matériaux deviennent paramagnétiques à une température élevée, au-dessus d'une température seuil appelée la température de Curie.

Le superparamagnétisme est une propriété des matériaux ferromagnétiques et ferrimagnétiques qui apparait lorsque la taille de l'objet diminue (Dormann 1981). Une caractéristique de ces matériaux est le temps de relaxation de Néel qui est le temps au bout duquel l'aimant change de polarité. Si ce temps de Néel est court par rapport à la durée d'une mesure de l'aimantation du matériau, l'aimantation globale paraîtra nulle, la nanoparticule ayant changé plusieurs fois de polarité pendant le temps de mesure. En

l'absence de champ magnétique externe, le temps de relaxation de Néel est donné par l'équation :

$$\tau_N = \tau_0 \times \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad 1.7$$

Avec τ_N , le temps moyen entre 2 retournements de l'aimantation du grain (s), τ_0 est un temps d'essai compris entre 10^{-9} et 10^{-10} s, K est l'anisotropie magnétique du grain ($J \cdot m^{-3}$), V le volume (m^3), k_B la constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23} J \cdot K^{-1}$), et T la température (K). Le temps de relaxation augmente exponentiellement avec la taille. Pour avoir un comportement superparamagnétique il faut que $\tau_N \ll t_m$ avec t_m (s), le temps de mesure (Dormann 1981; Palanisamy and Wang 2019). Les IONPs acquièrent leurs propriétés superparamagnétiques en dessous de 20 nm et ont en moyenne une taille entre 10 et 15 nm (Palanisamy and Wang 2019).

1.4.1.1. Structure cristalline

Les IONP se présentent sous deux formes principales : Fe_3O_4 (magnétite) de degré d'oxydation (II, III), et $\gamma-Fe_2O_3$ [maghémite], de degré d'oxydation III. La forme naturelle stable de l'oxyde de fer, ainsi que le minerai de fer le plus abondant, est l'hématite $\alpha-Fe_2O_3$ de structure cristalline rhomboédrique. Il existe aussi des nanoparticules de fer zérovalent qui perdent leurs propriétés superparamagnétiques et qui sont aussi plus toxiques. (Lei et al. 2018). Les principales formes du fer sont notées dans le Tableau 1.4.1.

Nom minéral du fer	Formule chimique	Degré d'oxydation	Structure cristalline
Fer métallique	Fe	0	Cubique centrée
Wustite	FeO	II	Cubique
Magnétite	Fe_3O_4 ou $(FeO)(Fe_2O_3)$	II, III	Cubique à face centrée
Maghémite	$\gamma-Fe_2O_3$	III	Cubique à face centrée
Hématite	$\alpha-Fe_2O_3$	III	Rhomboédrique

Tableau 1.4.1 : Formes de principaux cristaux formés d'oxydes de fer. Le fer métallique est aussi appelé fer zérovalent. (Greenwood and Earnshaw 1997).

$\gamma-Fe_2O_3$ est la forme oxydée de Fe_3O_4 et ces deux matériaux ont la même structure cristalline. Ils forment une structure de type spinelle inverse et sont constitués d'un réseau cristallin cubique à face centrée d'anion oxygène O^{2-} [Figure 1.4.1]. Dans ce réseau, les cations Fe^{2+} occupent les sites octaédriques du cristal et les Fe^{3+} sont répartis entre les sites octaédriques et tétraédriques pour le Fe_3O_4 . (Wu et al. 2015). Pour le $\gamma-Fe_2O_3$, tous les sites sont remplis par des ions Fe^{3+} cependant une lacune apparaît dans les sites octaédriques toutes les trois mailles ce qui permet de respecter l'équilibre chimique entre les cations et les anions (Teja and Koh 2009).

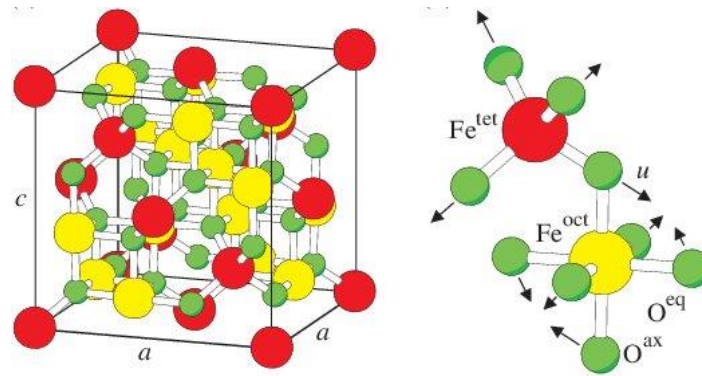


Figure 1.4.1 : Structure cristallographique de la Magnétite (Friák, Schindlmayr, and Scheffler 2007)

Le fer lorsqu'il est situé à la surface des nanoparticules agit comme un acide de Lewis, ce qui peut permettre de créer des liaisons covalentes avec des donneurs d'électrons. Avec un point isoélectrique de 6,8, ces nanoparticules peuvent être chargées positivement ou négativement en fonction du pH, ce qui a une influence sur l'enrobage qui va être utilisé. (Teja and Koh 2009). Les propriétés de surface des IONPs sont très importantes pour les applications biologiques, en particulier pour la captation cellulaire.

1.4.1.1. Synthèse de nanoparticules

Il existe de nombreuses techniques pour synthétiser des IONPs qui vont se différencier en fonction de leur facilité de mise en œuvre. Les différentes techniques vont influencer la taille et la forme finale des nanoparticules ainsi que sur leur fonction. La synthèse de nanoparticules est principalement réalisée par voie chimique, mais il existe aussi des méthodes physiques et biologiques. Ces méthodes de synthèse sont résumées dans le Tableau 1.4.2 extrait de la publication de Ali et al. (Ali et al. 2016).

Techniques		Product morphology	Advantages	Disadvantages
Physical	Deposition of gas phase	Spheres and irregular spheres	Easy to execute	Problematic in controlling the size of particle
	Electron beam lithography	Spheres and rods	Well-controlled interparticle spacing	Requires expensive and highly complex machines
Chemical	Sol-gel method	Spheres, irregular spheres, porous and nonporous spheres, or spindles	Aspect ratio, precisely controlled in size, and internal structure	High permeability, weak bonding, low wear resistance
	Oxidation	Irregular elongated and small spheres	Narrow size distribution and uniform size	Ferrite colloids of small size
	Chemical coprecipitation	Spheres	Simple and effective	Inappropriate for the synthesis of high untainted, precise stoichiometric phase
	Hydrothermal	Elongated, compact irregular spheres, and numerous shapes	Particle size and shapes are easily controllable	High pressure and reaction temperature
	Flow injection	Small rods, irregular spheres, sheets, or rhombic shapes	Homogeneity with high mixing with a accurate control of the procedure and good reproducibility	Under a laminar flow regime in a capillary reactor, it requires continuous or segmented mixing of reagents
	Electrochemical	Spherical NPs, nanorods, hexagonal nanocrystals, and facets	Controllable particle size	Inability to reproduce
	Aerosol/vapor phase	Mesoporous single crystals and small particles, octahedral cages	Large-scale products	Requires very high temperatures
	Sonochemical decomposition	Bipyramids, spheres, or truncated rods	Size distribution in narrow particle	Still, mechanism is not well understood
	Supercritical fluid method	Mesoporous single crystals, elongated irregular nanotubes	No organic solvents involved and efficient control of the particle size	Requires high temperatures and critical pressure
	Using nanoreactors	Spheres, hollow and spherical NPs	Likelihood to specifically control the size of NPs	Complicated conditions
Biological	Microbial incubation	Small platelets, spherical or rod-like spheres, irregular spheres	Good reproducibility and scalability, high yield, and low cost	Slow and laborious

Tableau 1.4.2 : Comparaison des principales techniques de synthèse des IONP (Ali et al. 2016)

1.4.1.2. Matériaux d'enrobage

Les IONPs ont naturellement tendance à s'agréger en raison de leur grand rapport surface/volume. En effet, ces nanoparticules présentent de fortes attractions superparamagnétiques, des forces de Van der Waals importantes et une énergie de surface élevée. (Wu et al. 2015). Pour une meilleure stabilité en milieu aqueux, la surface des nanoparticules est en général modifiée par un matériau de revêtement ou d'enrobage. Différents matériaux peuvent être utilisés pour stabiliser les nanoparticules, mais aussi pour leur conférer des fonctionnalités supplémentaires, ou bien diminuer leur toxicité. Ces enrobages permettent de modifier le caractère hydrophile de la nanoparticule, d'ajouter des ligands qui vont permettre de fixer des biomarqueurs ou des médicaments de chimiothérapie. (Evrin Umut 2013).

L'enrobage peut être appliqué pendant la synthèse, comme dans le cas de la coprecipitation, ou a posteriori, comme dans le cas de la technique de la décomposition thermique.

Il existe 3 familles principales de matériaux d'enrobage, les matériaux inorganiques, les molécules à chaînes longues et les polymères organiques :

- Les matériaux inorganiques les plus utilisés sont l'or (Au) et la silice (SiO₂), qui ont l'avantage d'être relativement biocompatibles et qui offrent une très bonne

stabilité au noyau de fer magnétique. L'encapsulation par ces matériaux permet en outre d'utiliser des propriétés spécifiques à ces matériaux. L'encapsulation par l'or permet de profiter de la résonance plasmonique de surface (voir Section 1.2.2.3) (C. W. Huang et al. 2010; E. Umut et al. 2012) ;

- Les molécules à chaînes longues comme l'acide oléique sont utilisées pour augmenter la solubilité des nanoparticules (Evrin Umut 2013) ;
- Enfin, les polymères organiques peuvent être des polysaccharides, comme le dextran et le chitosan, qui ont l'avantage d'être non immunogéniques, mais d'autres polymères synthétiques sont également couramment utilisés, comme le polyéthylène glycol.

Le Tableau 1.4.3, extrait de la publication de Umut (Evrin Umut 2013), indiquent les polymères les plus utilisés et leurs propriétés.

Polymers / organic molecules	Properties	Advantages / Disadvantages
Chitosan	Natural, cationic, hydrophilic, linear, biodegradable	Can be used in non-viral gene delivery
Dextran	Natural, branched, hydrophilic, biocompatible	Permits the anchoring of biovectors and drugs when functionalized with amino groups
Polyethyleneimine (PEI)	Synthetic, cationic, linear or branched, nonbiodegradable, toxic	Forms strong covalent bonds with MNP's surface, can be used for DNA and RNA delivery, but exhibit cytotoxicity
Polyvinylealcohol (PVA)	Synthetic, hydrophilic, biocompatible	Irreversibly binds on MNP's surface but can be used in temperature sensitive heating or drug release applications due to its decomposition temperatures (40-50 °C)
Polyethyleneglycol (PEG)	Synthetic, neutral, hydrophilic, linear, biocompatible	Remains stable at high ionic strengths of solutions with varying PH values, enhances blood circulation time (a few hours), permits functionalization
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Synthetic, branched, hydrophilic	Forms covalent bonds with drugs containing nucleophilic functional groups

Tableau 1.4.3 : Propriétés des différents polymères d'enrobage (Evrin Umut 2013).

1.4.2. Applications biomédicales des nanoparticules d'oxyde de fer

Les IONPs présentent de nombreux avantages et sont considérés comme l'un des principaux nanomatériaux pour les applications biomédicales (Figure 1.4.2). Les IONPs sont biodégradables. (Okon et al. 1994; T. K. Jain et al. 2008), ont une faible toxicité et ont une longue rétention tumorale grâce à leur petite taille et à l'effet EPR (Gamarra et al. 2008). Les propriétés super paramagnétiques des IONPs permettent aussi leur application dans de nombreux domaines (Palanisamy and Wang 2019).



Figure 1.4.2 : Application biomédicale des IONPs (Hoskins 2014).

Historiquement, les IONPs ont tout d'abord été utilisées comme agent de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Le principe de l'IRM repose sur la résonance magnétique nucléaire, et mesure le temps de relaxation de l'aimantation des atomes dans un champ magnétique après qu'ils aient été mis en résonance par un signal électromagnétique. Les modalités d'IRM les plus utilisées sont l'imagerie pondérée en T1, qui mesure le temps de relaxation longitudinale (donc parallèle au champ magnétique imposé) et l'imagerie pondérée en T2, qui mesure le temps de relaxation transversale au champ magnétique. Dans un système idéalisé, c.-à-d. dans un champ magnétique homogène, tous les noyaux présents à la même fréquence. Cependant, dans les systèmes réels, les inhomogénéités du champ magnétique principal conduisent à une dispersion des fréquences de résonance autour de la valeur théorique (effet d'off-résonance). Au cours du temps, ces irrégularités accentuent le déphasage de l'aimantation transversale et la perte de signal. La relaxation transversale observée est donc décrite par un temps T2*, généralement beaucoup plus petit que le T2 « vrai ».

Le paramagnétisme des IONPs provoque des inhomogénéités dans le champ magnétique, ce qui réduit les temps de relaxation T1, T2 et T2*. En conséquence, lors d'une imagerie T1, les nanoparticules apparaissent en hypersignal, alors qu'elles provoquent un hyposignal très important sur les séquences d'imagerie T2 et T2*. Cet hyposignal est plus large que le volume occupé par les nanoparticules, ce qui permet d'augmenter la visibilité de l'agent de contraste. (Korchinski et al. 2015b). Cependant ce phénomène peut poser un problème pour imager des structures contenant de grandes quantités de nanoparticules.

En clinique, Les IONPs sont utilisées depuis 1996 pour le diagnostic des tumeurs hépatiques par IRM T2*, en complément de l'imagerie au gadolinium. Il a été montré que les IONPs permettent de mieux différencier les différents types de lésions hépatiques. (Y.-X. J. Wang 2011). Des études ont aussi été faites pour suivre par IRM le parcours des macrophages ayant accumulé des nanoparticules de fer dans différents types de maladies : inflammation (Y. X. J. Wang et al. 2008), ischémie (Saleh et al. 2004), glioblastome (Neuwelt et al. 2004; R. Yang et al. 2018).

Dans une approche théranostique, ces nanoparticules ont également été utilisées comme agent de contraste T2, combiné avec un photosensibilisant, le BPD (Benzoporphyrin derivative monoacid ring A) pour traiter une tumeur mammaire orthotopique de souris par thérapie photodynamique (PDT) (Yan et al. 2019). Les nanoparticules ont été construites avec un cœur en oxyde de fer et un enrobage composé de BPD conjugué au dextrane (Figure 1.4.3-D). Le cœur métallique sert d'agent de contraste IRM (Figure 1.4.3-A,B) et le BPD de photosensibilisant pour la PDT (Figure 1.4.3-C). Sur la Figure 1.4.3-C, on observe également que l'efficacité du traitement PDT+BPD sous forme de nanoparticules est améliorée par rapport au traitement avec la BPD sous forme libre. Ceci est dû à une plus grande concentration de BPD dans la tumeur lorsqu'elle est injectée sous forme nanoparticulaire, par rapport à une injection sous forme libre. Cette augmentation a été confirmée par des mesures de fluorescence, le signal de fluorescence était 3,7x plus élevés pour les nanoparticules que le BPD libre. (Yan et al. 2019).

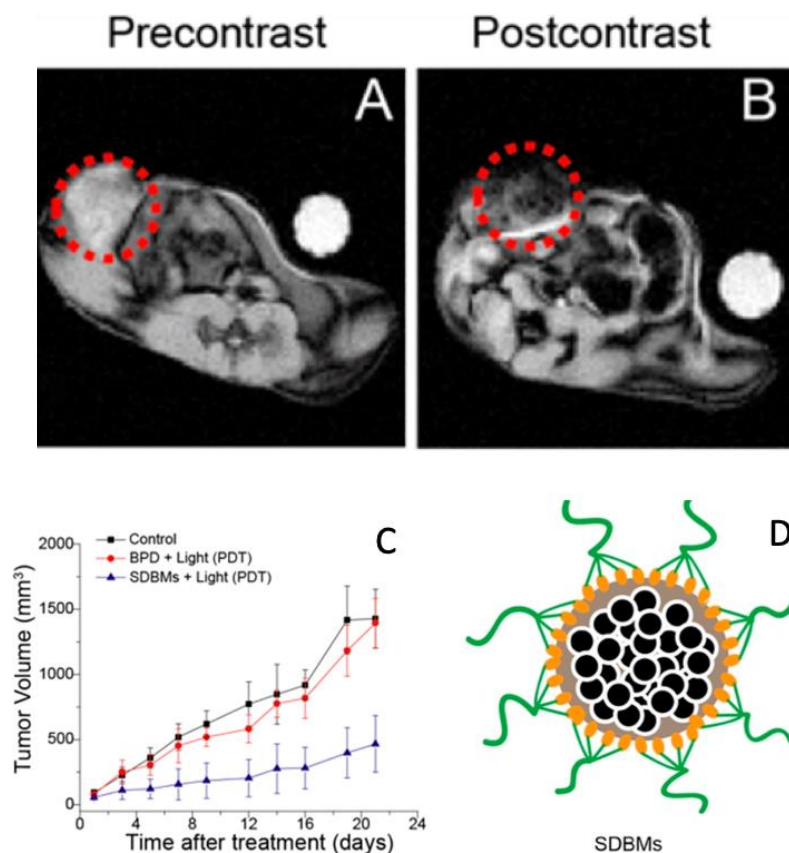


Figure 1.4.3 : Nanoparticules théranostiques SDBM (SPION loaded Dextran-BPD Micelles) utilisées comme agent de contraste IRM et photosensibilisant pour la thérapie photodynamique (PDT). (A, B) IRM pondérée en T2 de souris ayant une tumeur mammaire 4T1 (cercle rouge pointillé) avant injection des SDBM (A) et 24h après injection intraveineuse de 20 mg Fe /g p.c. (poids corporel) de SDBM (B). (C) Réponse tumorale in vivo après injection intraveineuse de PBS (contrôle), BPD (benzoporphyrine derivative) libre ou SDBM à la concentration de 2,5 mg BPD /g p.c. Les conditions de la PDT sont : $\lambda = 690$ nm, Débit de fluence : 75 mW/cm², Fluence : 135 J/cm². (D) Schéma des SDBM utilisés dans cette étude. Les micelles sont formées par l'assemblage de SPION (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle, billes noires) et de BPD (Benzoporphyrin derivative monoacid ring A, en jaune) conjugué au dextrane (vert). Les propriétés amphiphiles du Dextrane-BPD leur permettent de recouvrir le cœur métallique. (Yan et al. 2019).

Une autre utilisation spécifique des nanoparticules de fer en médecine est la thermothérapie. En utilisant leurs propriétés superparamagnétiques, les nanoparticules

de fer sont chauffées par l'action d'un champ magnétique externe. Le traitement peut être systémique ou local en faisant un ciblage magnétique. L'agitation magnétique des nanoparticules permet d'élever la température entre 42 et 47 °C, ce qui provoque l'apoptose cellulaire jusqu'à 46 °C et une nécrose à partir de 46 °C (Palanisamy and Wang 2019). Les cellules tumorales étant plus sensibles aux changements de température que les cellules normales, on peut créer un différentiel et réduire les dommages aux tissus sains. (Figure 1.4.4) (Maier-Hauff et al. 2011)

Cette hyperthermie peut aussi être activée par résonance plasmonique de surface en activant les nanoparticules optiquement avec un rayonnement électromagnétique (Palanisamy and Wang 2019).

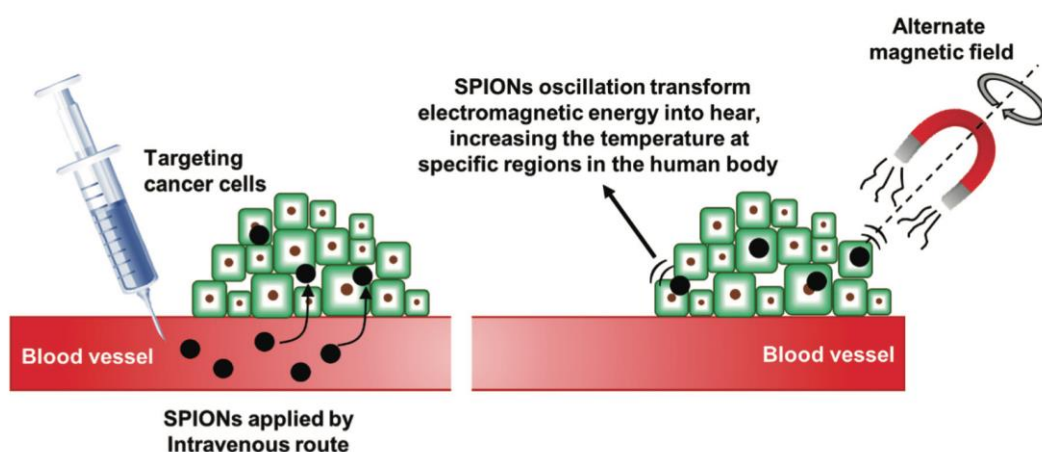


Figure 1.4.4 : Principe de la thermo thérapie par agitation magnétique (Palanisamy and Wang 2019) .

Les IONPs sont également souvent utilisées comme vecteurs de médicament, notamment des molécules anticancéreuses pour la chimiothérapie. Ces nanoparticules pouvant se lier à des molécules hydrophobes, elles permettent une meilleure absorption de celles-ci par les cellules tumorales.

Le ciblage des cellules tumorales est un facteur déterminant (voir Section 1.2.2). Il peut être obtenu soit passivement, en utilisant la circulation sanguine et l'effet EPR, soit par une approche active, qui est de plus en plus utilisée. Des ligands spécifiques des cellules tumorales sont souvent ajoutés. (Y. X. J. Wang et al. 2008). L'avantage principal des nanoparticules superparamagnétiques est ciblage magnétique qu'elles permettent (Chertok et al. 2008; Zhi et al. 2020).

Si de nombreuses applications médicales des IONPs existent, elles sont pour la plupart récentes (environ 20 ans) et encore au stade de la recherche. Il existe cependant un certain nombre d'indications pour lesquelles elles ont reçu une autorisation de mise sur le marché, principalement en tant qu'agent de contraste IRM pour la détection des tumeurs et pour la supplémentation en fer en cas d'anémie ferriprive (Tableau 1.4.4). Parmi ces agents on peut souligner le FerInject, qui est constitué de nanoparticules d'hydroxyde de fer (FeOOH) de structure akaganéite, avec un enrobage de carboxymaltose. Ce médicament est utilisé en solution injectable dans le traitement de l'anémie ferriprive, c'est-à-dire causée par une carence en fer.

Date	Events	indication	Size (nm)	Administration
1996	Lumirem (Gastromark (US)): approved by FDA	Contrast agent for MRI for the gastrointestinal tract	50	Oral
1996	Ferumoxides (Emdorem (EU) or Feridex 1.V.): approved by the FDA	Contrast agent for MRI of liver lesions	120-180	Injectable solution
2001	Ferucarbotran (Resovist or Cliavist(EU)): approved for European Market	Contrast-enhanced MRI of the liver	45-60	Injectable solution
2005	Ferumoxtram (Sinerem (EU) or Combidex (US)): AMAG Pharma received an approvable letter from the FDA	Detection and characterization of metastatic lymph nodes in patients with pelvic cancer	10-40	Injectable solution
2006	Sinerem: submitted European Marketing Authorization Application	Detection and characterization of metastatic lymph nodes in patients with pelvic cancer	10-40	Injectable solution
2009	Feraheme (Ferumoxytol): approved by the FDA	Iron replacement therapy for the treatment of iron deficiency anemia in adult patients with chronic kidney disease.	20-50	Intravenous
2012	Feraheme (Ferumoxytol): approved by the EC	Iron replacement therapy for the treatment of iron deficiency anemia in adult patients with chronic kidney disease.	20-50	Intravenous

Tableau 1.4.4: Médicaments à base d'IONPs approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et/ou la Commission européenne (CE) (Cortajarena et al. 2014).

1.4.3. Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer

Connaître le comportement des nanoparticules dans l'organisme est nécessaire lorsqu'on s'intéresse à son utilisation en tant que médicament. La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'une substance active après son administration dans l'organisme. Cette discipline est souvent désignée par son acronyme ADME qui renvoie aux 4 grands processus qui la composent : Administration, Distribution, Métabolisme et Élimination. Nous allons décrire, dans les paragraphes suivants, les voies principales d'administration et leur influence sur la distribution, puis le métabolisme et l'élimination dans l'organisme des nanoparticules.

1.4.3.1. Administration

En fonction de l'utilisation envisagée des nanoparticules, plusieurs voies d'administration sont possibles. La recherche d'un effet local ou systémique est un facteur déterminant pour ce choix :

Plusieurs voies principales existent pour l'administration de médicaments (Turner et al. 2011).

- Les voies entérales (à travers le système digestif) concernent les voies orales, buccales et rectales. Elles ont pour avantage une grande facilité d'utilisation. Elles sont prédominantes pour les médicaments distribués sur le marché ;

- Les voies parentérales (en dehors du système digestif) concernent les injections intraveineuses, ou les injections directement dans l'organe cible (intracérébral, intramusculaire, etc.). Les voies parentérales permettent de contourner l'imprévisibilité associée aux processus d'absorption entérale, et ont une meilleure biodisponibilité. Ces voies sont privilégiées dans la recherche en laboratoire, afin d'optimiser le traitement.

De nombreux médicaments sont injectés par voie intraveineuse. Les IONPs, utilisées pour le traitement et le diagnostic des tumeurs, sont dans la plupart des études administrées par cette voie. Un médicament contenant des nanoparticules de magnétite [N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyl] silylées et ayant une autorisation de mise sur le marché utilise la voie orale, le Lumirem, mais sa cible est le système digestif (Cortajarena et al. 2014).

1.4.3.2. Distribution des nanoparticules d'oxyde de fer et absorption cellulaire

La distribution des nanoparticules dépend de la voie d'administration de celles-ci. Lorsqu'elles sont injectées par voie systémique, les nanoparticules peuvent s'accumuler dans la tumeur grâce à l'effet EPR (Section 1.1.1.3). Une fois dans la tumeur, les nanoparticules pourront être internalisées par les cellules.

Dans une étude récente, Kim et al. (J. K. Kim et al. 2012) ont mesuré chez la souris porteuse de tumeurs sous-cutanées (CT26), l'évolution de la concentration de nanoparticules d'oxyde de fer (et d'or) dans le sang, le muscle et la tumeur, après injection par voie intraveineuse. Les rats ont été sacrifiés et les organes prélevés pour analyse ICP-MS à plusieurs points dans le temps, entre 30s et 24h après injection. Comme indiqué dans la Figure 1.4.5, la concentration dans le sang est élevée au temps d'injection puis décroît de façon exponentielle. Dans la tumeur, la concentration augmente puis atteint un plateau entre 6h et 24h après l'injection, alors que la concentration dans le muscle reste limitée. La concentration dans la tumeur est proportionnelle à la quantité injectée. L'accumulation, représentée par le rapport de concentration tumeur/muscle, est optimale à 24h avec des concentrations dans la tumeur allant jusqu'à 88 fois la concentration musculaire pour les IONPs, 24 h après injection.

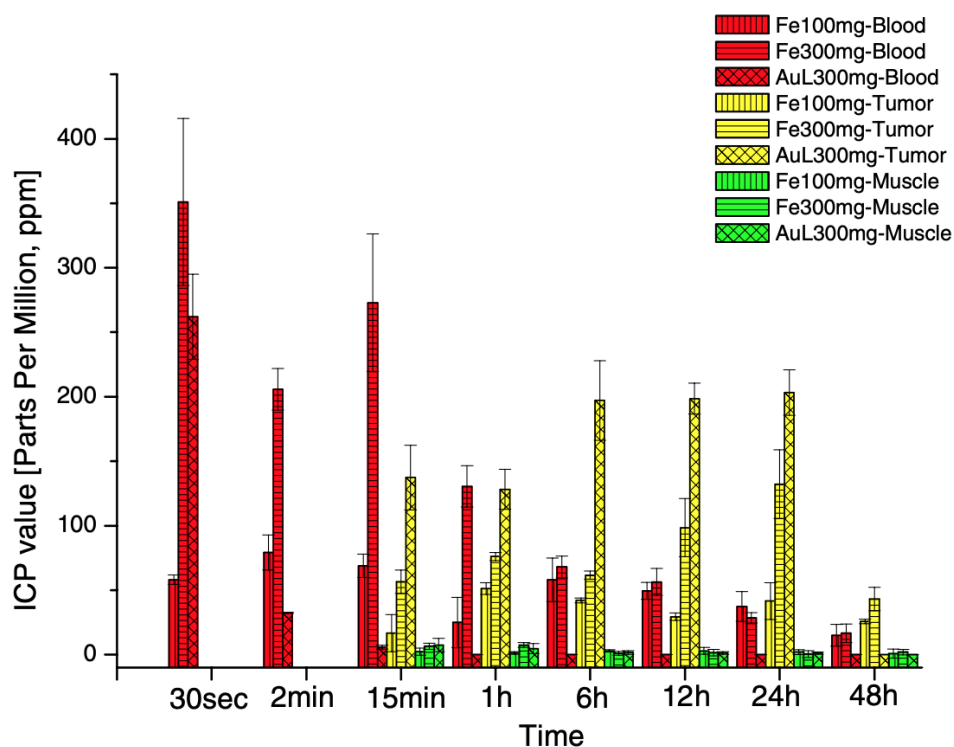


Figure 1.4.5 : Mesure des concentrations de nanoparticules de fer (et d'or) mesurées par ICP-MS dans le sang, la tumeur et le muscle en fonction du temps chez la souris porteuse d'une tumeur sous-cutanée CT26 après injection intraveineuse. Entre 15 minutes et 24h après l'injection, les nanoparticules s'accumulent préférentiellement dans la tumeur, alors qu'il y a peu de nanoparticules mesurées dans le muscle. Au bout de 24h le rapport de concentration tumeur sur muscle vaut 169 pour l'or et 88 pour le fer (J. K. Kim et al. 2012).

Dans une autre étude, cette équipe a mesuré la distribution des nanoparticules de fer dans un modèle de glioblastome de rat C6 (S.-J. Seo et al. 2013). Une dose de 300 mg Fe_3O_4/kg p.c. (poids corporel) a été injecté en intraveineuse dans la veine caudale et les concentrations ont été mesurées par spectroscopie de masse après résection de la tumeur. Le rapport entre la quantité de fer dans la tumeur et dans le cerveau sain est aussi maximal à 24h avec un rapport de 5,1 contre 2,1 une heure après injection des nanoparticules (Tableau 1.4.5).

	Tissue	300 mg/kg	
		1 h	24 h
Tissue concentration (μg of Fe/g tissue)	Tumor	26.2 \pm 4.1	37.6 \pm 6.3
	Normal	12.5 \pm 3.8	7.4 \pm 3.7
Uptake/injection (%)		0.6	

Data are presented as average \pm standard deviation (n = 3).

Tableau 1.4.5 : Concentrations de nanoparticules de fer dans une tumeur cérébrale (glioblastome de rat C6) ou dans le cerveau sain, mesurées par ICP-MS (S.-J. Seo et al. 2013).

In vitro, Solveig Reymond (Reymond 2018) a mesuré la concentration de ces nanoparticules de fer dans les cellules F98 après incubation des cellules dans le milieu de culture dopé avec les nanoparticules. On observe une concentration cytoplasmique allant jusqu'à 120 pg/cellule pour une concentration dans le milieu de culture de 0,3 mg/mL et

un temps d'incubation de 24h. Elle estime que 100 pg/cellule correspond approximativement à une concentration de fer de 100 mg/mL. Ces travaux concordent avec ceux de Choi et al. (G.-H. Choi et al. 2012) qui trouvent une concentration en fer de 168 $\mu\text{g}/10^6$ cellules (≈ 168 mg/mL) avec une concentration d'incubation de 2 mg/mL de nanoparticules pendant une nuit.

Il a été observé que les nanoparticules s'accumulent dans les vésicules du cytoplasme en plus grande quantité, lorsque les nanoparticules sont de grandes dimensions, en présence d'agglomérats de nanoparticules (Reymond 2018). L'étude de la localisation cellulaire des nanoparticules par SR-XRF (Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence Spectrometry) a permis de visualiser la présence des nanoparticules dans les vésicules cytoplasmiques (Figure 1.4.6). La SR-XRF est une technique qui analyse la fluorescence des rayons X par l'échantillon. En utilisant un faisceau très fin (50×50 nm²), l'échantillon est scanné pixel à pixel et le spectre de fluorescence émis par le pixel de l'échantillon est mesuré par 4 détecteurs de fluorescence. Ainsi les raies caractéristiques de chaque élément composant le pixel peuvent être séparées, ce qui permet de quantifier la quantité de cet élément.

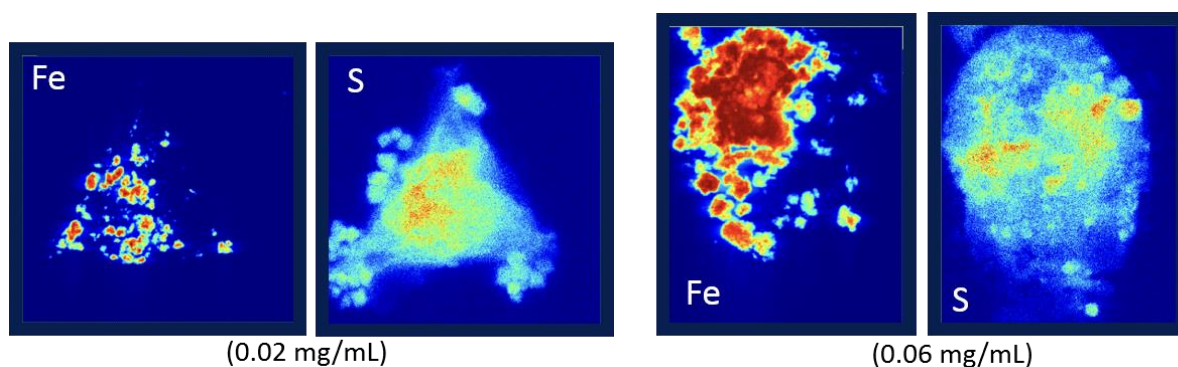


Figure 1.4.6 : Présence de fer et de soufre dans les cellules F98 (glioblastome de rat) pour deux conditions d'incubation. Les nanoparticules étaient présentes dans le milieu de culture des cellules à 0.02 mg Fe/mL et 0.06 mg Fe/mL pendant 24h le soufre permet de délimiter le contour des cellules et du noyau. Les nanoparticules sont internalisées par les cellules dans des vacuoles cytoplasmiques. L'accumulation de nanoparticules de fer augmente avec la concentration. Images obtenues par SR-XRF (Reymond 2018)

1.4.3.3. Métabolisme et élimination

Une fois dans le corps du patient, les nanoparticules vont être métabolisées et excrétées par l'organisme. Il existe deux voies principales pour l'excrétion des nanoparticules : l'élimination rénale et l'excrétion hépatobiliaire. (Akashi, Akagi, and Michiya 2014). L'élimination rénale est dépendante de la taille des nanoparticules ; les nanoparticules d'une taille inférieure à 5 nm sont rapidement excrétées par cette voie (Askri 2018; Krishnan 2020). Les cellules du système immunitaire, en particulier les cellules capables de phagocytose (macrophages, neutrophiles, cellules de Kupffer) jouent un rôle important dans le métabolisme des nanoparticules (Nelson, Fisher, and Robinson 2014; Nel et al. 2009). Le foie est l'organe qui accumule le plus les nanoparticules de fer de grande taille et est donc une voie d'excrétion importante (Cortajarena et al. 2014) (Figure 1.4.7).

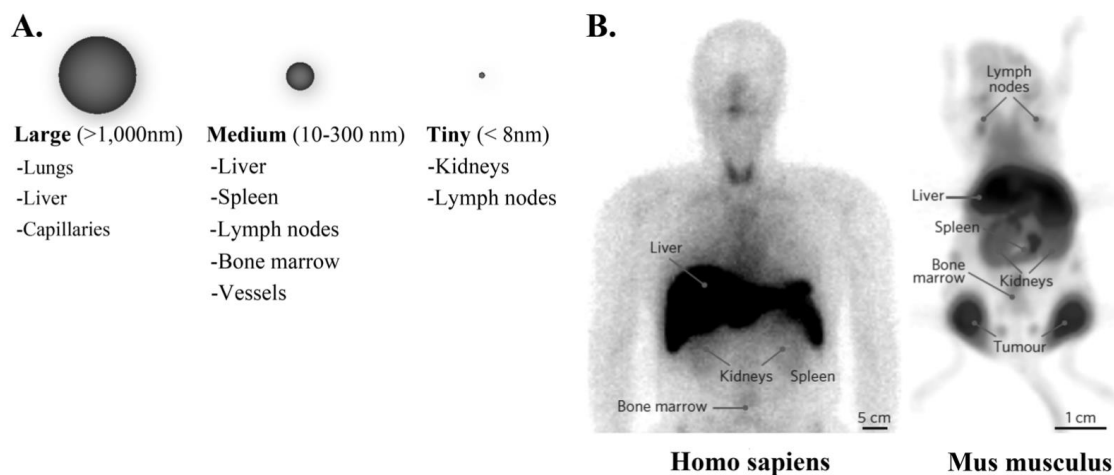


Figure 1.4.7 : Distribution des IONPs. A. Distribution habituelle en fonction de la taille des nanoparticules. B. IONPs marquée avec ^{99}Tc chez l'homme et ^{89}Zr pour un modèle tumoral de souris (modèle CT26 implanté en sous-cutané dans les deux flancs). Les nanoparticules s'accumulent fortement dans le foie et dans la tumeur. (Cortajarena et al. 2014; Weissleder, Nahrendorf, and Pittet 2014)

Dans les cellules ayant internalisé les nanoparticules (macrophages et cellules de Kupffer), la principale voie de métabolisme des nanoparticules de fer est la dégradation par les lysosomes, par hydrolyse à faible pH. Le fer est transformé sous sa forme ionique dans la cellule, Fe^{2+} et Fe^{3+} (Gupta and Curtis 2004). Il est alors stocké à l'aide de protéines régulatrices du fer, la ferritine et l'hémosidérine (Nel et al. 2009; Zhu et al. 2013; 2011; 2009). L'absorption du fer est régulée par l'organisme pour prévenir un stress oxydatif qui serait causé par une accumulation excessive (Hauser et al. 2016; Emerit, Beaumont, and Trivin 2001).

1.4.4. Nanoparticules d'oxyde de fer et radiothérapie

Une application récente des nanoparticules de fer est le renforcement de dose pendant la radiothérapie dans le cadre d'un traitement combiné. En effet, le fer a une masse atomique et une densité plus élevée que les éléments constituant la matière biologique (H, C, N, O en majorité). De par ces caractéristiques, les nanoparticules de fer vont davantage arrêter les rayonnements de basses énergies que les tissus mous et se comporter comme des sources secondaires d'électrons qui augmenteront localement la dose (voir section 1.3.2). Le fer étant de façon générale, bien tolérée par l'organisme, il paraît un candidat pertinent avec de multiples possibilités de combinaison de traitements.

De nombreuses études combinant radiothérapie et IONP ont été réalisées (Kleinauskas et al. 2012; Anja Sommer 2014; Klein et al. 2014; 2012; Reymond 2018). Dans ces études, les nanoparticules ont été utilisées comme vecteurs de médicaments néoplasiques pour une chimioradiothérapie (Kang, Hong, and Kang 2018), comme radiosensibilisants, ou pour induire une hyperthermie magnétique combinée à la radiothérapie (Maier-Hauff et al. 2011).

Dans le cadre d'une radiothérapie combinée avec des IONPs, l'équipe de Jong-Ki Kim a publié des études associant IONP avec de thérapies par protons (J. K. Kim et al. 2010;

2012; S.-J. Seo et al. 2013; Jeon et al. 2016) ou par rayonnement X (G.-H. Choi et al. 2012; Kleinauskas et al. 2012; Jeon, Han, and Kim 2016; Jeon and Kim 2018).

1.4.4.1. Proton thérapie

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont été utilisées pour la radiothérapie avec faisceau de protons. Les travaux de Kim *et al.* (J. K. Kim et al. 2010) montrent une réduction significative du volume tumoral de tumeurs CT26 (carcinome de colon murin) implantées chez des souris en sous-cutanée, lorsqu'on leur injecte par voie intraveineuse 300 mg/kg de IONPs par rapport à une irradiation seule de protons de 45 MeV. L'injection des nanoparticules était réalisée par la veine caudale avec un volume de 50 μ L. Les travaux menés par la suite (J. K. Kim et al. 2010; S.-J. Seo et al. 2013; S. J. Seo et al. 2017) montrent que l'effet principal est dû à une augmentation du taux d'espèces réactives de l'oxygène due à l'émission d'électrons secondaires, principalement des électrons Auger. (Figure 1.4.8)

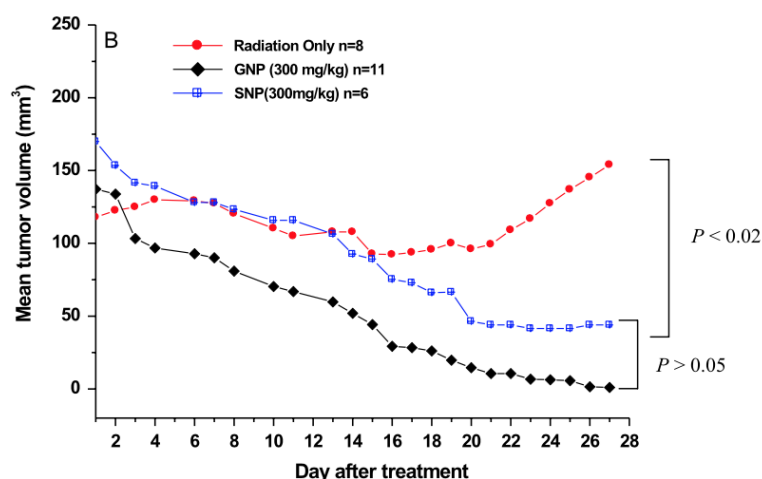


Figure 1.4.8 : Protonthérapie combinée avec nanoparticules : Évolution de la taille d'une tumeur sous-cutanée (modèle CT26, souris) après injection de nanoparticules de fer (SNP) ou d'or (GNP) couplé à une irradiation par protons de 45 MeV. Les nanoparticules de fer et d'or associées à la protonthérapie réduisent significativement la taille de la tumeur. (J. K. Kim et al. 2010).

1.4.4.2. Radiothérapie Synchrotron

Les premiers travaux en radiothérapie photonique ont été réalisés par Kim *et al.* en 2009 dans le cadre d'essais *in vitro* sur des cellules de gliome de rat (lignée C6) (H.-T. Kim et al. 2009). Les expériences de cette équipe ont été réalisées avec un rayonnement synchrotron de 7,1 keV, à l'énergie du seuil K du fer pour augmenter la quantité de photoélectrons et de photons Auger (Kleinauskas et al. 2012). Ces essais ont montré un effet avec une incubation de 0,1 mg/mL de IONP pendant 6h ou 12h (une nuit), avec une efficacité allant de 3 à 9 fois celle du traitement (Figure 1.4.9).

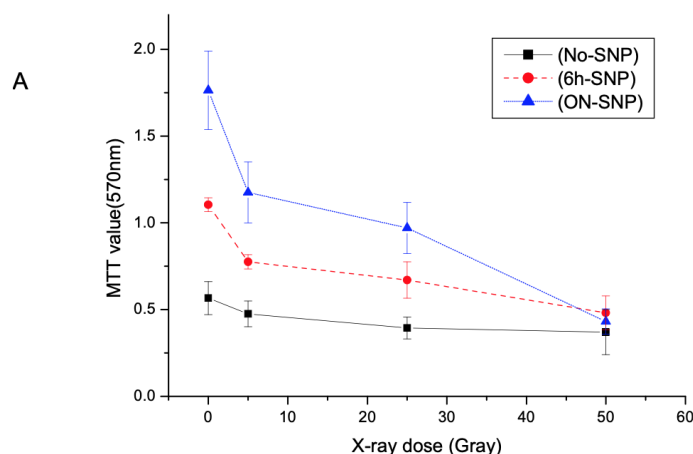


Figure 1.4.9 : Résultats de mesure de la viabilité cellulaire par test MTT. Des cellules C6 (gliome de rat) ont été irradiées par un rayonnement synchrotron de 6,89 keV uniquement (No-SNP), ou réalisées après incubation avec 0,1 mg/mL de nanoparticules pendant 6h (6h-SNP) ou pendant toute une nuit (ON-SNP) (H.-T. Kim et al. 2009)

Le premier essai préclinique de renforcement de dose par FeONP et rayonnement X à ce jour a été publié par la même équipe (G.-H. Choi et al. 2012). Cet essai a été mené sur un adénocarcinome de côlon CT26 (tumeur sous-cutanée) dans un modèle de souris Balb/c immunodéficiente. Dans cette expérience, les auteurs ont mesuré l'évolution de la taille des tumeurs en fonction du traitement conjoint ou non de radiothérapie synchrotron et de nanoparticules FeONP. Approximativement 50 μ L de FeONP à 25 mg/mL ont été injectés par voie intraveineuse dans la veine caudale, afin d'obtenir une quantité de nanoparticules de 100 mg/kg de poids corporel (p.c.). Cette injection a été réalisée 30 minutes avant la radiothérapie. La radiothérapie a consisté en un faisceau de rayonnement synchrotron monochromatique de 7,1 keV avec une dose de 10 ou 40 Gy. Les résultats de la progression tumorale sont résumés dans la Figure 1.4.10. On observe que les groupes ayant reçu les IONPs associés à la radiothérapie ont une régression tumorale plus prononcée que sans nanoparticules pour un traitement de 10 Gy ($p=0,023$), et pour 40 Gy ($p=0,051$). La concentration tumorale moyenne de nanoparticules a été mesurée par ICP-MS (*Induction coupled plasma mass spectroscopy*) et une valeur de $40,30 \pm 8,24$ μ g/g de tumeur pour une injection de 100 mg/kg p.c. a été obtenu.

Cet essai a utilisé un rayonnement de 7,1 keV qui correspond à l'énergie de liaison des électrons de la couche K, ce qui permettrait de maximiser l'émission d'électrons Auger. Cette énergie a été utilisée pour une preuve de concept, mais permettrait de traiter uniquement des tumeurs superficielles comme dans cette étude, la demi-atténuation de photons de 7 keV étant de 447 μ m dans les tissus.

Les concentrations de nanoparticules mesurées dans la tumeur suggèrent que les nanoparticules sont efficaces avec une faible concentration (< 0,1 mg/g de tissu). Cette preuve de concept a été réalisée sur un modèle de tumeur sous-cutanée plus facile à traiter qu'une tumeur cérébrale. En effet, les tumeurs cérébrales sont protégées par la barrière hématotumorale et la barrière hématoencéphalique, ce qui réduit l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur.

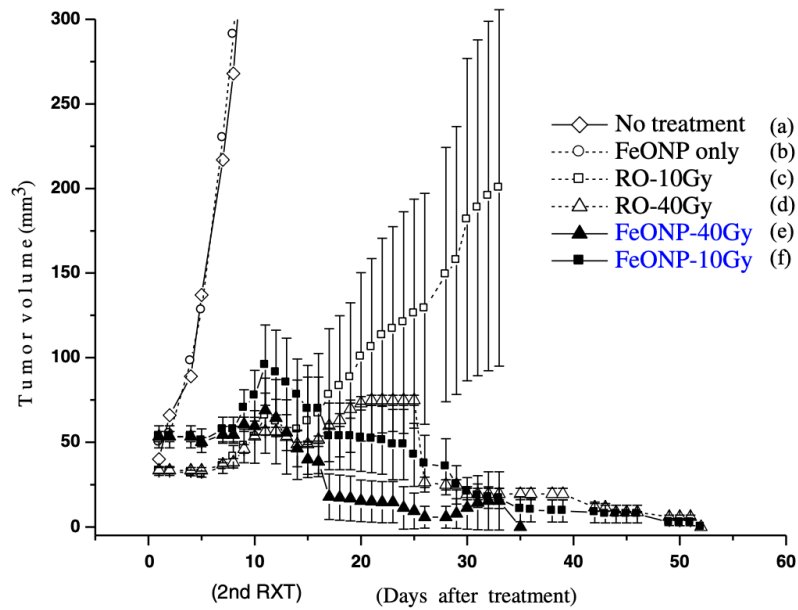


Figure 1.4.10 : Résultats précliniques de radiothérapie synchrotron après injection par voie veineuse de IONPs pour le traitement d'une tumeur CD26 implantée en sous-cutanée. Le volume tumoral a été mesuré en fonction du temps après différents traitements : (a) sans traitement (n=3), (b) 100 mg/kg p.c. de FeONP (n=3), (c) radiothérapie synchrotron (7,1 keV) — 10 Gy (n=5), (d) radiothérapie synchrotron (7,1 keV) — 40 Gy (n=5), (e) traitement combiné de radiothérapie (7,1 keV) 40 Gy et 100 mg/kg p.c. de FeONP (n=5), (f) traitement combiné de radiothérapie (7,1 keV) - 10 Gy et 100 mg/kg p.c. de FeONP (n=5). (G.-H. Choi et al. 2012)

Ces travaux ont mené à une collaboration entre l'équipe STROBE (anciennement RSRM) et l'équipe de Jong-Ki Kim (université catholique de Daegu, Corée du Sud) pour évaluer l'intérêt de ces nanoparticules pour la radiothérapie. Un premier travail de thèse a été réalisé par Paul Gimenez, pendant lequel deux méthodes ont été développées : la radiothérapie Mössbauer et le renforcement de dose avec les nanoparticules de fer. (Gimenez 2015a).

Une évaluation de l'augmentation de dose induite en présence de nanoparticules de fer pendant l'irradiation à faible énergie au synchrotron (30, 50 et 80 keV) a été réalisée, en mesurant le rapport de sensibilité cellulaire SER (*sensitivity enhancement ratio*). Le SER a été déterminé par 2 méthodes : la clonogénicité, qui mesure la croissance des cellules dans une boîte de pétri, et le test ATP-lite, qui mesure la production cellulaire d'ATP. Le SER est déterminé pour une dose donnée, ici 4 Gy, selon la formule :

$$SER_{4 Gy} = \frac{\bar{S}_{4 Gy, sans NP}}{\bar{S}_{4 Gy, avec NP}} \quad 1.8$$

Avec $\bar{S}_{4 Gy, sans NP}$ la survie moyenne des échantillons n'ayant pas reçu de nanoparticules, déterminée soit par clonogénicité, soit par ATP-lite, et $\bar{S}_{4 Gy, avec NP}$ la survie moyenne des échantillons ayant reçu les nanoparticules. Les résultats sont indiqués dans la Figure 1.4.11.

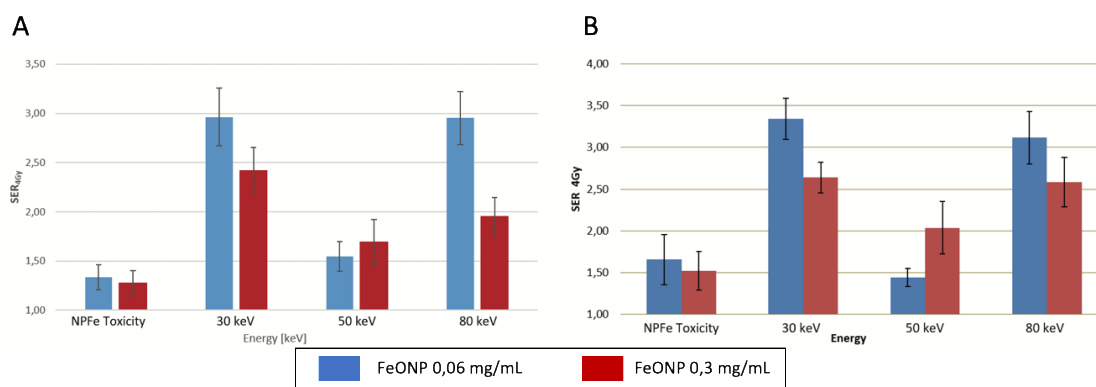


Figure 1.4.11 : SER_{4Gy} mesuré par test clonogénique (A) et par ATP-lite (B) pour une concentration de 0,06 mg/mL (bleu) et 0,3 mg/mL (rouge) de nanoparticules d'oxyde de fer, à 3 énergies. Les résultats obtenus par ATP-lite sont similaires aux résultats obtenus par clonogénicité. (Gimenez 2015a).

Ces résultats sont plutôt encourageants, et montrent une radiosensibilité des cellules aux nanoparticules à des énergies d'irradiation plus élevée que le K-edge, ce qui permettrait d'utiliser ces nanoparticules pour le traitement de tumeur plus profondes que des tumeurs cutanées.

La thèse de Solveig Reymond continue le travail sur les nanoparticules d'oxyde de fer dans le cadre du traitement du glioblastome. Sa thèse est centrée sur l'optimisation de la mesure du renforcement de dose des nanoparticules et sur une voie d'administration des nanoparticules via des macrophages infiltrants. (Reymond 2018).

Dans la première partie de sa thèse, différentes stratégies ont été mises en place pour optimiser l'étude du renforcement de dose. Plusieurs aspects ont été évalués afin de déterminer l'énergie optimale d'irradiation :

- Une caractérisation des nanoparticules a permis de diminuer l'agglomération des nanoparticules par sonication ;
- Une mesure de la localisation des nanoparticules a montré une forte internalisation des nanoparticules permettant d'augmenter l'efficacité de renforcement de dose ;
- Une mesure de SER a été faite par tests clonogéniques et par MTT par internalisation de nanoparticules soniquées (Figure 1.4.12). Les nanoparticules sont moins toxiques, mais le SER est moins élevé que celui obtenu dans le cadre de la thèse de Paul Gimenez. Cependant l'énergie optimale d'irradiation est confirmée comme étant à 30 keV.

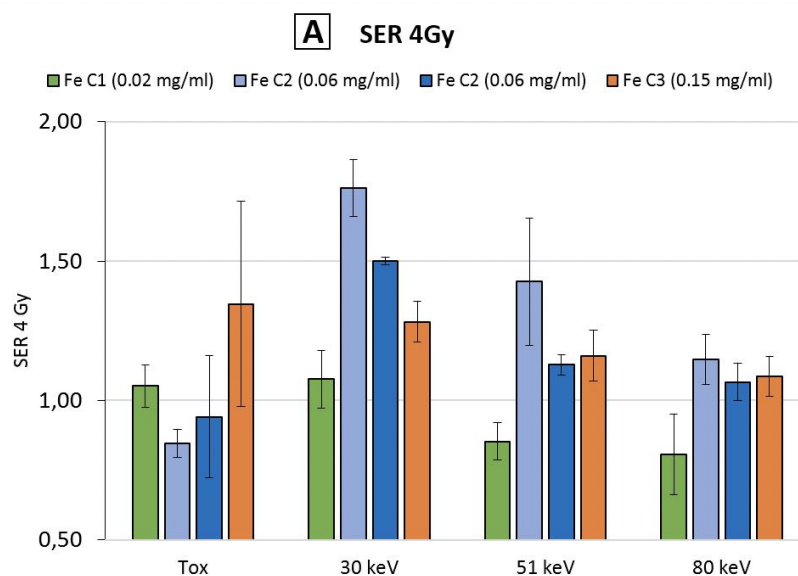


Figure 1.4.12 : Résultats *in vitro* de radiothérapie synchrotron avec nanoparticules de fer. Les 2 premières concentrations (C1 vert et C2 bleu clair) proviennent d'un lot différent de nanoparticules que les 2 autres concentrations (C2 bleu foncé et C3 orange). (Reymond 2018)

Dans une seconde partie, une étude de la distribution des nanoparticules a été réalisée *in vivo*. Une première approche a été l'approche « Cheval de Troie » : des macrophages sont chargés en nanoparticules qui vont s'infiltrer dans les parties nécrotiques de la tumeur. Si le chargement des cellules en nanoparticules a été un succès, les macrophages ne se répartissaient pas comme souhaité. Une autre approche a été d'ouvrir la BHE à l'aide de microbulles activées par ultrasons. Cette méthode a montré que l'ouverture de la BHE a permis la perméabilisation de BHE aux nanoparticules, mais la technique n'est pas encore bien maîtrisée.

1.5. Problématique de la thèse

Nous avons vu dans ce chapitre que les tumeurs cérébrales sont difficiles à traiter et sont le plus souvent malignes. Les tumeurs primitives de haut grade sont un type de cancer avec un pronostic vital sombre, en particulier le glioblastome, qui est le stade le plus avancé de tumeurs cérébrales. Le protocole de Stupp, couramment utilisé aujourd'hui, ne permet d'augmenter la survie que de quelques mois. Il combine chirurgie, chimiothérapie au témozolomide et radiothérapie. En ce qui concerne les métastases cérébrales, le bilan est un peu plus positif, mais reste une pathologie difficile à traiter. Le traitement de référence est la radiothérapie panencéphalique si les métastases sont nombreuses. Si le nombre de métastases est limité, on lui préférera la radiochirurgie stéréotaxique ou la radiothérapie stéréotaxique hypofractionnée.

De nombreux traitements expérimentaux sont en cours d'étude. Avec les progrès techniques, la radiothérapie permet de traiter des tumeurs de plus en plus efficacement. Mais la radiothérapie se heurte à la limite de sensibilité des tissus sains, en particulier dans le cerveau. Pour optimiser la survie des patients, une stratégie consiste à combiner les traitements.

Pour cela, on peut chercher à optimiser l'efficacité du rayonnement en augmentant la sensibilité des cellules tumorales, c'est la radiosensibilisation. Par ailleurs, on peut

chercher à augmenter la dose physique reçue par les cellules tumorales, on parle alors de renforcement de dose. Ces deux phénomènes nécessitent que l'on apporte un médicament préférentiellement dans la tumeur. Dans ce contexte, la radiothérapie par rayonnement synchrotron (SSRT) cherche à optimiser le renforcement de dose par l'utilisation d'un faisceau monochromatique de forte intensité et dont l'énergie se situe dans le domaine des interactions photoélectriques principalement.

Les nanoparticules métalliques ont de multiples possibilités d'utilisation et ont la faculté de combiner des modalités. Leurs utilisations peuvent être classées dans différentes spécialités : la vectorisation, le diagnostic et la thérapie. Le renforcement de dose par photoactivation est une application thérapeutique qui tirerait fortement profit des nanoparticules. Pour cette application, l'or est le matériau le plus utilisé, mais l'iode, le hafnium et le gadolinium sont aussi beaucoup étudiés.

Hors renforcement de dose, les IONPs sont les nanoparticules les plus utilisées. Elles possèdent des applications dans tous les champs de recherches biomédicales, en imagerie, thérapie et vectorisation. Le fer est un élément commun, naturellement présent dans l'organisme, et serait une piste biocompatible pour la thérapie par photoactivation qui a montré ses preuves dans le traitement des tumeurs sous-cutanées. Mais à l'heure actuelle, peu d'études utilisent ces nanoparticules pour cette utilisation.

Un essai préclinique et de nombreux essais préliminaires réalisés *in vitro* avec des cellules de glioblastome de rat F98 ont montré que cet élément est intéressant pour la radiothérapie par renforcement de dose. Les études *in vitro* à l'ESRF ont montré un accroissement de la sensibilité cellulaire des cellules F98 en présence de nanoparticules d'oxyde de fer, et que cet accroissement est dépendant de l'énergie d'irradiation, montrant le lien avec l'effet photoélectrique attendu.

Les travaux de cette thèse portent sur l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de la SSRT avec renforcement de dose par nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 . Les études précliniques ont été conduites sur un modèle de glioblastome (F98) implanté en intracérébral chez le rat. La suite du manuscrit est structurée en trois chapitres.

Dans le Chapitre 2, nous allons aborder une étude sur l'évolution de la distribution des nanoparticules d'oxyde de fer sur un groupe d'animaux afin d'optimiser le temps d'incubation des nanoparticules avant radiothérapie.

Une étude de suivi temporel des nanoparticules d'oxyde de fer par imagerie à haute résolution a été faite. Des animaux ayant reçu des nanoparticules d'oxyde de fer en intraveineuse et en CED ont été suivis pendant 2 jours et des images à haute résolution ont été faites pour évaluer l'influence du temps sur la distribution des nanoparticules de fer dans le cerveau. Ces images ont permis de déterminer quel temps de diffusion serait nécessaire pour optimiser le recouvrement de la tumeur par les nanoparticules.

La concentration des nanoparticules a ensuite été comparée avec des analyses histologiques en *post mortem* pour valider les résultats.

Dans le Chapitre 3, nous allons voir l'impact du renforcement de dose dans le traitement du glioblastome.

La planification de traitement est une étape commune à tout traitement de radiothérapie. Réalisée à l'aide d'un logiciel de planification de traitement ou TPS (*treatment planning system*), elle permet d'anticiper l'efficacité d'un traitement. Elle se déroule en 5 étapes :

- L'acquisition par tomographies des images, avant et après traitement (Figure 1.5.1) ;
- La segmentation des différents constituants du cerveau sur des images de radiothérapie synchrotron en biénergie.
- L'utilisation de 2 énergies de part et d'autre du K-edge de l'iode permet de différencier la distribution de l'iode caractérisant l'étendue de la tumeur, des nanoparticules de fer ;
- Un modèle virtuel de chaque animal et des faisceaux d'irradiation sont créés ;
- Ce modèle est utilisé comme base à un calcul de dose de Monte-Carlo pour déterminer une carte de dose et de cartographier l'irradiation des rats ;
- La dose absorbée par les différents organes est évaluée et analysée pour déterminer l'efficacité du traitement.

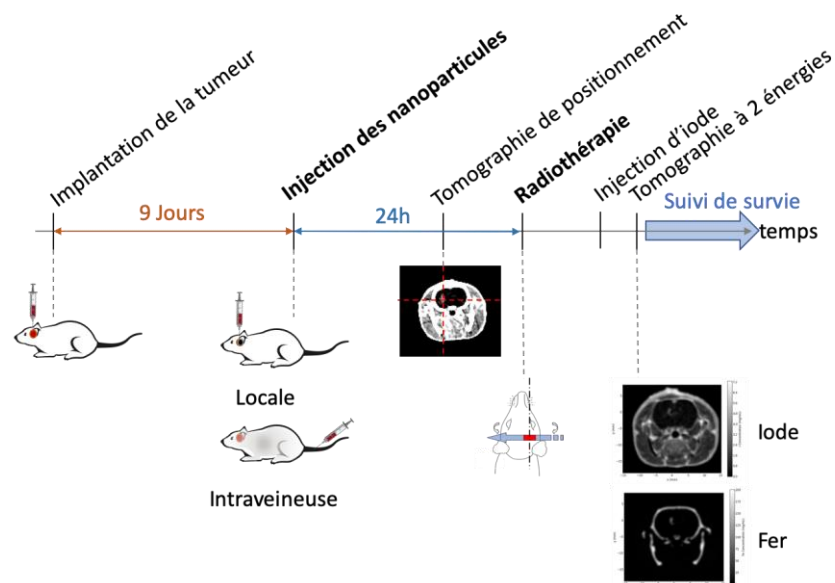


Figure 1.5.1 : Protocole de traitement pour la radiothérapie synchrotron avec renforcement de dose avec le fer. 9 jours avant le traitement, 5000 cellules tumorales sont implantées stéréotaxiquement dans le cerveau des rats. 24h avant l'irradiation, les rats reçoivent les nanoparticules soit en injection locale avec la méthode de distribution améliorée par convection, soit par injection intraveineuse via la veine caudale. Puis une tomographie de positionnement est faite, suivie du traitement radiothérapeutique. Enfin une injection d'iode est faite après le traitement pour localiser la tumeur grâce à l'effet EPR et la méthode de tomographie à 2 énergies.

Dans le Chapitre 4, nous allons détailler les protocoles de traitement et les résultats de l'efficacité du traitement. Le protocole cherche à évaluer l'efficacité de la combinaison de radiothérapie et de nanoparticules. Il est résumé dans la Figure 1.5.1. Différents groupes de rats ont reçu des traitements et ont été comparés entre eux. Deux modes d'injection ont été évalués. Une injection par intraveineuse dans la veine caudale a été testée ainsi qu'une injection intratumorale par convection dit *convection enhanced delivery* (CED). Pour ces deux modalités, différentes concentrations de nanoparticules ont été testées.

Pour la radiothérapie, l'irradiation a été testée à différentes énergies. Deux groupes ont reçu des conditions d'irradiation particulières : un groupe a été suivi en tomothérapie, et un groupe a reçu un traitement polychromatique en conditions FLASH, c'est-à-dire avec un débit de dose élevé. La survie de ces différents groupes a été suivie et une analyse post-mortem a été faite pour évaluer la quantité de nanoparticules de fer restantes.

Chapitre 2. Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer

2.1. Introduction	64
2.1.1. Modèle animal	65
2.1.2. Administration des nanoparticules	66
2.1.3. Objectif du chapitre	68
2.2. Matériel et méthodes	69
2.2.1. Modèle préclinique de gliome de rat	69
2.2.1.1. Préparation des cellules tumorales F98	69
2.2.1.2. Implantation des cellules F98	69
2.2.2. Préparation et injection des nanoparticules d'oxyde de fer	71
2.2.2.1. Synthèse et préparation des nanoparticules d'oxyde de fer	71
2.2.2.2. Injection des nanoparticules d'oxyde de fer	72
2.2.3. Suivi temporel des nanoparticules d'oxyde de fer après injection IV ou CED	73
2.3. Imagerie par résonance magnétique	74
2.3.1. Imagerie IRM pour l'étude de la distribution des nanoparticules d'oxyde de fer	76
2.3.2. Résultats des analyses qualitatives par imagerie de résonance magnétique	77
2.4. Tomographie quantitative par rayonnement synchrotron	80
2.4.1. Acquisition des images de tomographie	80
2.4.1.1. Acquisition des projections et construction du sinogramme	80
2.4.1.2. Correction des inhomogénéités du faisceau et du détecteur	81
2.4.1.3. Obtention des concentrations d'éléments lourds	83
2.4.2. Acquisition d'images par TQRS pour l'étude de la biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer	84
2.4.3. Résultat des analyses par tomographie quantitative par rayonnement synchrotron	86
2.5. Analyse post-mortem	93
2.5.1. Histologie	93
2.5.1.1. Matériel et méthodes	94
2.5.1.2. Résultats des études post mortem par histologie	94
2.5.2. Spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser	97
2.5.3. Résultats des études post mortem par LIBS	99
2.6. Discussion	103
2.6.1. Protocole d'injection intraveineuse	103
2.6.2. Protocole d'injection CED	105
2.6.3. Comparaison des deux techniques d'administration des nanoparticules	106
2.6.4. Conclusion	109

2.1. Introduction

La radiothérapie par renforcement de dose utilisant les nanoparticules nécessite que celles-ci soient concentrées en quantité suffisante dans la tumeur tout en restant à des niveaux négligeables dans les tissus sains irradiés. Une bonne connaissance de l'évolution de la biodistribution des nanoparticules est nécessaire pour optimiser la couverture tumorale et minimiser la dose dans les tissus sains. La biodistribution cérébrale des nanoparticules sera étudiée dans le temps chez le rat porteur d'un glioblastome après l'injection des nanoparticules d'oxyde de fer selon deux voies d'administration, la voie systémique et la voie intracérébrale.

Dans un premier temps nous présentons notre modèle d'étude du glioblastome, puis les modes d'administration. Enfin nous présenterons les expériences mises en place dans l'objectif d'étudier la distribution.

2.1.1. Modèle animal

La recherche en oncologie fait appel à l'expérimentation animale. Il existe différents modèles animaux, les rats et les souris étant les plus utilisés grâce à leur rythme de reproduction rapide et l'entretien simple et peu coûteux en comparaison avec d'autres animaux. Le rat est une espèce pertinente dans l'étude des tumeurs cérébrales. En effet, il a l'avantage d'avoir une plus grande taille de cerveau comparé à la souris, permettant une implantation plus précise de la tumeur. Aussi, la plus grande taille de cerveau permet d'obtenir des tumeurs de plus grande taille, ce qui permet également une localisation in vivo de la tumeur plus aisée avec les techniques d'imagerie. (R. F. Barth and Kaur 2009).

D'après Barth et Kaur, il existe 8 facteurs importants pour qu'une lignée de cellules tumorales soit un bon modèle pour l'étude du gliome et l'extrapolation des résultats chez l'homme (R. F. Barth and Kaur 2009) :

1. Les cellules tumorales doivent être dérivées de cellules gliales ;
2. Elles doivent pouvoir être mises en culture in vitro et être implantées in vivo ;
3. La croissance tumorale doit être prévisible et reproductible ;
4. La tumeur doit avoir les caractéristiques du gliome (neoangiogenèse, altération de la BHE, une croissance invasive, et absence d'encapsulation) ;
5. Le temps de survie après implantation doit être suffisant pour permettre de réaliser le traitement et de déterminer l'efficacité ;
6. La tumeur doit être faiblement immunogène pour les évaluations d'efficacité thérapeutique et de survie ;
7. La tumeur ne doit pas grandir dans l'espace épidual ou en dehors du cerveau ;
8. La réponse tumorale aux traitements conventionnels doit être comparable à celle observée chez l'homme.

Les différents modèles de tumeurs peuvent être des xénogreffes, lorsque la tumeur provient d'un individu génétiquement différent ou d'une espèce différente (en général une souche humaine). Ce type de tumeur est très immunogène et il faut donc travailler sur des individus immunodéprimés. C'est le cas de nombreux modèles développés chez la souris. (Simeonova and Huillard 2014).

Les tumeurs de rats ont été obtenues par induction avec des agents mutagènes. Les tumeurs du système nerveux central ont pu, depuis les années 1970, être induites de manière reproductible par l'injection répétée de N-nitroso-N-méthylurée (MNU) ou N-éthyl-N-nitrosourée (ENU) en intraveineuse chez la rate gestante. (R. F. Barth and Kaur 2009; Simeonova and Huillard 2014). Certaines de ces souches tumorales ont pu être caractérisées et ont été utilisées pour faire des greffes syngéniques sur les lignées de rats hôtes de ces tumeurs. Une tumeur est dite syngénique lorsque les cellules tumorales sont suffisamment proches génétiquement de l'hôte pour ne pas créer de réaction immunitaire. (R. F. Barth and Kaur 2009).

Ainsi plusieurs modèles de gliome existent chez le rat. Le modèle le plus utilisé expérimentalement est le gliosarcome 9L, qui a été produit par injection de 5 mg/kg de

MNU pendant 26 semaines chez des rats Fischer-344. (Benda et al. 1968). Un des principaux problèmes de cette souche est qu'elle est fortement immunogène. La lignée C6 est aussi beaucoup utilisée, mais provenant d'un rat Wistar sauvage, elle n'est pas syngénique à une lignée de rat de laboratoire et donc, fortement immunogène. (Benda et al. 1968).

Le gliome F98 a été créé en 1972 par Weschler et al. (Swenberg et al. 1972) et simule le comportement du glioblastome humain : c'est une tumeur à croissance très invasive et qui est faiblement immunogène (Barth and Kaur 2009). Ces caractéristiques impliquent qu'il est difficile d'obtenir des augmentations de survie significatives si la totalité des cellules tumorales ne sont pas éradiquées. L'injection d'une centaine de cellules suffit à provoquer la mort de 100% des individus. (R. F. Barth and Kaur 2009). De plus, ce modèle tumoral est résistant à la chimiothérapie systémique et répond faiblement à l'irradiation par les photons (R. F. Barth and Kaur 2009). Il a donc les caractéristiques les plus proches du glioblastome humain. D'où l'intérêt d'utiliser ce modèle pour chercher des traitements innovants qui permettraient de réussir là où les traitements traditionnels ont échoué.

La tumeur F98 est le modèle que nous allons utiliser dans cette thèse. De nombreux travaux de recherche ont été réalisés sur cette lignée au sein du laboratoire. Ce modèle a notamment été utilisé pour étudier la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) à l'Établissement Européen de Rayonnement Synchrotron (ESRF) (J.-F. Adam et al. 2003; Julia Rousseau et al. 2010; Taupin et al. 2015) et également pour les essais de photoactivation de nanoparticules de fer (Reymond 2018; Gimenez 2015b).

2.1.2. Administration des nanoparticules

Le choix du mode d'injection joue un rôle majeur dans la distribution des nanoparticules. Cette problématique est donc centrale pour la radiothérapie par renforcement de nanoparticules. (Besse 2011; J. F. Adam et al. 2005; Boateng and Ngwa 2019). Afin d'optimiser le traitement, il faut chercher le meilleur moyen pour acheminer les nanoparticules à la tumeur. Nous allons nous concentrer sur deux modes d'administration : l'administration systémique par voie intraveineuse, et l'administration locale par convection ou CED (Convection-Enhanced Delivery).

L'injection par voie intraveineuse (IV) est une méthode classique d'administration de médicaments. De plus, grâce à l'effet EPR (voir section 1.1.1.3), on peut espérer obtenir une concentration de nanoparticules dans la tumeur supérieure à celle observée dans les tissus sains environnants.

Cependant, l'un des inconvénients de la voie IV est la faible pénétration des nanoparticules dans les tumeurs cérébrales. Une méta-analyse de Wilhelm et al. a montré que la rétention tumorale médiane de nanoparticules était de 0,7 % de la dose injectée par voie IV, mais avec beaucoup de variabilité en fonction des études. (Wilhelm et al. 2016). Selon eux, la rétention tumorale est dépendante de plusieurs facteurs, notamment la taille hydrodynamique de la nanoparticule (les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm sont mieux accumulées), du ciblage (actif ou passif), de la composition de la nanoparticule (les nanoparticules inorganiques sont mieux accumulées) et du type tumoral. En revanche, ils soulignent que le potentiel zêta et la forme de la nanoparticule n'ont pas d'influence significative sur la rétention tumorale. Il faut noter que les études

répertoriées dans cet article ont été réalisées en majorité sur des souris. (Wilhelm et al. 2016).

Dans les études réalisées avec des nanoparticules d'oxyde de fer, l'accumulation des nanoparticules, observée dans divers modèles tumoraux, est du même ordre de grandeur qu'indiqué dans l'étude précédente. Seo et al. observent 0,60 % de rétention tumorale pour une tumeur cérébrale de rat et Choi et al. observent 0,40% ou 0,55% en fonction de la dose injectée (300 mg/kg de poids corporel (p.c.) ou 100 mg/kg p.c.) dans une tumeur sous-cutanée de souris. (S.-J. Seo et al. 2013; G.-H. Choi et al. 2012). Dans ces études, la rétention tumorale bien que faible a permis d'observer une diminution du volume tumoral de 65% à 79% dans le cadre d'une protonthérapie.

La CED est une technique d'injection locale et qui a été mise en place pour permettre l'administration de macromolécules dans le cerveau (Hunt Bobo et al. 1994). Cette technique consiste en une injection locale avec un débit faible et contrôlé. Le débit de la CED est en général compris entre 0,5 et 6,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. (Morrison et al. 1994). Le fluide injecté exerce une pression sur le liquide interstitiel et va déplacer les molécules ou nanoparticules avec le fluide. Ce phénomène s'appelle « la convection » et permet d'augmenter le volume de distribution par rapport à la diffusion.

L'intérêt de l'injection locale pour les tumeurs cérébrales est de contourner la BHE, permettant ainsi de cibler plus efficacement la tumeur, d'augmenter la concentration de l'agent thérapeutique et de diminuer la toxicité systémique (M. Shi and Sanche 2019). Cela permet d'obtenir un plus grand volume de distribution qu'une injection systémique, qui est dépendante de la diffusion des molécules (Allard, Passirani, and Benoit 2009).

Dans l'équipe STROBE, au sein de laquelle cette thèse a été effectuée, divers agents thérapeutiques ont été injectés par CED dans de nombreuses expériences, notamment pour l'administration de cisplatine ou carboplatine (Hélène Elleaume et al. 2020; Biston et al. 2004; Bobyk et al. 2012; W. Yang et al. 2011; Rolf F. Barth et al. 2011; J Rousseau et al. 2007; Julia Rousseau et al. 2010). Des nanoparticules d'or ont aussi été administrées avec succès par CED dans un protocole de renforcement de dose (Bobyk et al. 2013). Dans cette étude 5 μL de nanoparticules d'or à la concentration de 25 ou 50 mg/mL, ont été injectés par CED dans une tumeur cérébrale F98 chez le rat, ce qui a permis d'augmenter de manière significative la survie des rats ayant reçu les nanoparticules et la radiothérapie par rapport à la radiothérapie seule.

La CED a par ailleurs déjà été utilisée pour administrer des nanoparticules d'oxyde de fer dans les tumeurs cérébrales. Par exemple, dans une expérience de Jordan et al. (Jordan et al. 2006), des nanoparticules d'oxyde de fer ont été administrées par CED pour un traitement de thermo thérapie. Deux types de nanoparticules ont été testées, les premières sont des nanoparticules de 3 nm recouvertes de carboxydextrane, les secondes étant des nanoparticules de 15 nm recouvertes d'aminosilane. Les nanoparticules recouvertes de carboxydextrane se sont largement diffusées dans les tissus sains environnants, diminuant la concentration dans la région tumorale. Les nanoparticules recouvertes d'aminosilane ont été conçues pour interagir préférentiellement avec les cellules tumorales. Ces nanoparticules sont restées fortement concentrées dans la tumeur, même après la mort de l'animal, plus de 40 jours après le traitement.

2.1.3. Objectif

Dans ce chapitre, nous allons étudier la biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer dans le cerveau de rat porteur de glioblastomes, afin de comparer les deux modes d'administration décrits précédemment : les injections IV et CED. Les avantages et inconvénients des deux modes d'injections sont résumés dans le Tableau 2.1.1. Cette biodistribution sera suivie au cours du temps par deux techniques d'imagerie in vivo, la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron (TQRS) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Injection intraveineuse	Convection Enhanced Delivery
<p>Avantages</p> <ul style="list-style-type: none"> - Profite de l'effet EPR pour une accumulation préférentielle dans la tumeur - Facile à mettre en place 	<p>Avantages</p> <ul style="list-style-type: none"> - Possibilité d'administrer une grande quantité de nanoparticules - Non limitée par la BHE
<p>Inconvénients</p> <ul style="list-style-type: none"> - Limitée par la BHE - Accumulation tumorale inférieure à 1% de la dose injectée 	<p>Inconvénients</p> <ul style="list-style-type: none"> - Distribution indépendante du volume tumoral - Méthode invasive

Tableau 2.1.1 : Comparaison des modes d'administration, injection intraveineuse et Convection Enhanced Delivery.

L'IRM est connue pour l'excellent contraste obtenu dans les tissus mous tel que le cerveau. De plus, les nanoparticules d'oxyde de fer étant superparamagnétiques, elles peuvent être utilisées comme agent de contraste IRM. Cette technique est très sensible et permet d'étudier la distribution des nanoparticules même à faible concentration, mais elle n'est pas quantitative.

La TQRS présente deux avantages : elle permet d'une part de quantifier les concentrations des nanoparticules métalliques et d'autre part d'observer ces volumes avec une résolution élevée.

Après imagerie, les animaux sont sacrifiés et analysés par des techniques histologiques et par la technique de spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser (LIBS). L'observation histologique est la référence pour l'observation des tumeurs cérébrales dans les modèles précliniques et le LIBS est une technique qui permet de mesurer les concentrations tissulaires de nanoparticules avec une grande sensibilité.

Dans la partie suivante, nous allons détailler le modèle d'étude préclinique utilisé ainsi que les techniques d'exploration mises en œuvre.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Modèle préclinique de gliome de rat

Le modèle préclinique choisi est le modèle de glioblastome F98 qui est très utilisé pour évaluer l'efficacité de traitements des tumeurs cérébrales. Dans ce modèle, des cellules tumorales (1000 cellules) sont injectées dans le noyau caudé droit du cerveau des rats et un glioblastome va se développer et tuer son hôte au bout d'environ 25 jours.

2.2.1.1. Préparation des cellules tumorales F98

Les cellules F98 sont cultivées dans du DMEM Glutamax Pyruvate+ avec ajout de 10% de Sérum de veau fœtal (SVF) et 5% de Pénicilline/Streptomycine (PS). Elles sont conservées dans un incubateur qui maintient l'atmosphère à 37°C, 5% de CO₂ et un degré d'humidité compris entre 80 et 85%.

Les cellules sont préparées pour l'implantation selon le protocole suivant :

- Rinçage au PBS
- Trypsination des cellules pendant 5 minutes à 37°C
- Ajout du milieu de culture à la solution de cellules en suspension
- Un échantillon de 20µL est prélevé pour le comptage des cellules à l'aide d'un hématimètre de Neubauer
- Centrifugation des cellules à 1500 rpm
- Élimination du surnageant et reprise du culot avec du DMEM sans SVF et sans PS, pour obtenir une concentration de 2.10^6 cellules/mL.

Ce lot de cellules est conservé pendant 1h maximum pour l'implantation. Un nouveau lot est préparé à chaque heure de la procédure d'implantation.

2.2.1.2. Implantation des cellules F98

Pour cette étude, des rats Fischer-344 mâles de 9 semaines ont été utilisés (Charles River Laboratoires France, Saint-Germain-Nuelles, France). Les rats sont endormis dans une cuve à isofluorane à 1%, puis sont anesthésiés par une injection péritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine (64,5/5,4 mg/kg). Le crâne des animaux est alors rasé et les rats sont placés dans un cadre stéréotaxique (Figure 2.2.1). Le crâne est désinfecté et une incision de la peau du crâne de 1 à 2 cm est réalisée sur le plan médian du crâne. Une craniotomie est ensuite réalisée à 3,5 mm à droite du bregma (Figure 2.2.2). Une seringue Hamilton de Gauge 32 (0,108 mm de diamètre interne et 0,235 mm de diamètre externe) est montée sur le cadre stéréotaxique. L'aiguille est descendue à 6 mm de profondeur puis remontée de 0,5 mm pour créer une petite cavité. 2,5 µL de la préparation de cellules tumorales (soit 5000 cellules) sont déposés à l'aide d'un pousse-seringue KDS 310 Plus, avec un débit de 0,5 µL/min. Après l'implantation, le trou dans l'os du crâne est rebouché avec de la cire à os et la plaie refermée par suture. Une solution de lidocaïne (0,1 mL) est injectée localement pour apaiser la douleur de l'animal. Le rat est ensuite placé dans une couveuse jusqu'à son réveil.



Figure 2.2.1 : Cadre stéréotaxique Kopf utilisé pour l'implantation tumorale ainsi que pour l'injection en CED des nanoparticules.

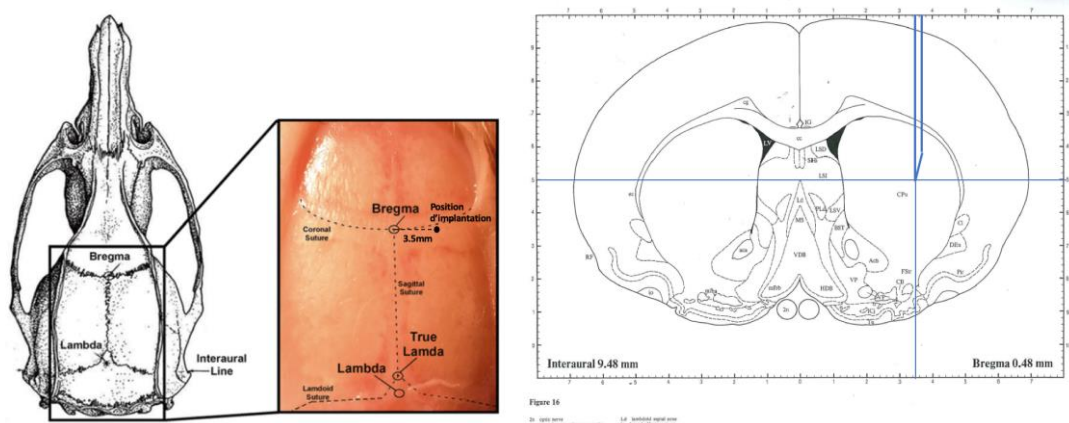


Figure 2.2.2 : À gauche : Position de l'implantation de la tumeur sur le crâne d'un rat. À l'aide d'un cadre stéréotaxique, une seringue est positionnée à 3,5 mm à droite du Bregma (position où les os du crâne se rejoignent dans la partie supérieure du crâne). À droite, schéma d'un cerveau de rat en coupe transversale. L'aiguille est représentée ici à 3,5 mm à droite du bregma, et à 5 mm de profondeur (ce qui correspond à 5,5 mm par rapport au-dessus de l'os du crâne).

La survie des rats dépend du nombre de cellules F98 injectées (Figure 2.2.3). Ainsi pour 5000 cellules, les rats survivent en moyenne 21 jours. Le traitement a eu lieu 9 jours après injection, lorsque la tumeur a un volume de l'ordre de 30 mm^3 , qui correspond à un diamètre d'environ 3 mm.

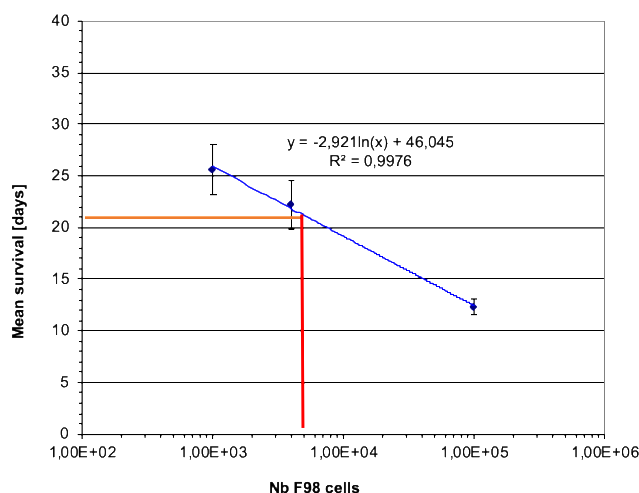


Figure 2.2.3 : Évolution de la survie en fonction du nombre de cellules F98 injectées. Pour une injection de 5000 cellules, on s'attend à une survie moyenne de 21 jours.

2.2.2. Préparation et injection des nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules de Fe_3O_4 ont été injectées soit par CED (injection directement dans la tumeur) soit par voie intraveineuse. Dans cette section nous allons d'abord expliquer le protocole de synthèse des nanoparticules puis les différents modes d'injection.

2.2.2.1. Synthèse et préparation des nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer (FeONP) ont été synthétisées par l'équipe de Jong-Ki Kim du département d'ingénierie biomédicale de l'Université Catholique de Daegu en Corée du Sud. Ce sont des nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 (magnétite). Elles mesurent individuellement environ 15 nm de diamètre et possèdent un revêtement en alginate (Choi et al. 2012). Elles ont été utilisées dans plusieurs études, in vitro, mais surtout in vivo (Kim et al. 2010, Choi et al. 2012, Seo et al. 2013, Jeon et al. 2016).

2.2.2.1.1. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

Le protocole de synthèse, explicité dans les publications de l'équipe collaboratrice, est le suivant : 1,72 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 4,70 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8,65 mmol Fe^{2+} /17,30 mmol Fe^{3+}) sont dissous dans 80 mL d'eau distillée. Un précipité magnétique noir est obtenu en chauffant la solution à 80°C sous atmosphère d'argon, tout en augmentant le pH à 10 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 nanoparticules précédemment obtenues sont dilués dans une solution contenant 60 mL d'eau salée et 25 mL d'acide alginique puis la solution est chauffée à 80°C. La solution est agitée de manière continue grâce à un barreau magnétique puis soniquée à 50 W pendant 30 minutes sous atmosphère d'azote. Les FeONP sont ensuite purifiées par lavage avec de l'eau salée alors qu'elles sont attirées par un aimant intense en néodyme (intensité du champ magnétique $B_r = 1,1 \text{ T}$).

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont concentrées à 25 mg Fe₃O₄/mL dans la solution finale. Cette concentration correspond à 18,09 mg Fe/mL.

2.2.2.1.2. Concentration par évaporation sous flux d'azote

Pour augmenter la concentration de nanoparticules, la solution de FeONP a été évaporée sous flux d'azote pendant 3 jours, jusqu'à atteindre la concentration désirée de 75 mg/mL de Fe₃O₄. L'évaporation sous flux d'azote consiste à envoyer un flux d'azote directement au-dessus du tube ouvert contenant la solution de nanoparticules : cela permet d'accélérer l'évaporation de l'eau dans le tube, et donc d'augmenter ainsi la concentration des nanoparticules. Cette opération a été réalisée par un collaborateur, Jean Luc Ravanat (équipe Symmes, CEA, Grenoble).

2.2.2.1.3. Sonication des nanoparticules

Préalablement à l'injection, les nanoparticules doivent être soniquées, car elles ont tendance à s'agréger entre elles (Reymond 2018). La sonication consiste en l'utilisation d'ultrasons afin d'agiter la composition d'une solution. Elle est ici utilisée afin de perturber l'agrégation des nanoparticules et d'obtenir des nanoparticules de taille plus homogène.

Pour réaliser la sonication, on utilise une station VCX 750 (Sonics & Materials, Inc.) remplie d'eau circulant dans un circuit à 4°C. Un tube Falcon de 15 mL contenant 2 mL de solution mère de FeONP est fixé de manière à maintenir le culot du tube au plus profond de la cupule de sonication sans la toucher. La sonication de la solution a été réalisée pendant 15 min à 600 W et à une fréquence de 20 kHz. Le refroidissement des nanoparticules pendant ce traitement est crucial, car la sonication mène à la production de chaleur, qui elle-même peut favoriser l'agrégation des nanoparticules en détruisant le revêtement de surface des nanoparticules.

2.2.2.2. Injection des nanoparticules d'oxyde de fer

Dans cette partie, les 2 méthodes d'administration étudiées, IV et CED, sont décrites. Dans la suite de ce chapitre, les volumes d'injection pour chacune des méthodes seront toujours les mêmes, seule la concentration en nanoparticules sera modifiée. Dans chaque cas, la concentration en équivalent fer sera précisée (en mg Fe/mL). Le protocole d'anesthésie sera également identique.

2.2.2.2.1. Voie intraveineuse

Après anesthésie, un cathéter de Gauge 24 est posé dans la veine caudale du rat, permettant l'injection de la solution de nanoparticules suivie d'un bolus de solution saline qui assure une bonne diffusion de la solution de nanoparticules dans la circulation sanguine. 1 mL de solution de nanoparticule d'oxyde de fer à la concentration de 54 mg Fe/mL a été injecté, suivi d'un bolus de 0,5 mL de solution saline.

2.2.2.2. Distribution améliorée par convection

Pour l'injection des nanoparticules par CED, le protocole est similaire à celui de l'implantation des cellules (Section 2.2.1.2). 20 μL de la solution de nanoparticules d'oxyde de fer sont déposés à l'aide d'une pompe, avec un débit de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figure 2.2.4).

Puisque le milieu interstitiel représente seulement 20% du volume cérébral (Syková and Nicholson 2008; Bobyk et al. 2013), on estime que la solution injectée occupera un volume de distribution 5 fois supérieur au volume injecté, soit environ 80 μL . Par ailleurs, la lésion causée par l'aiguille lors de l'implantation tumorale crée un chemin de moindre résistance qui peut provoquer un reflux des nanoparticules lors des injections intratumorales par CED. (Hunt Bobo et al. 1994; Krauze et al. 2005)

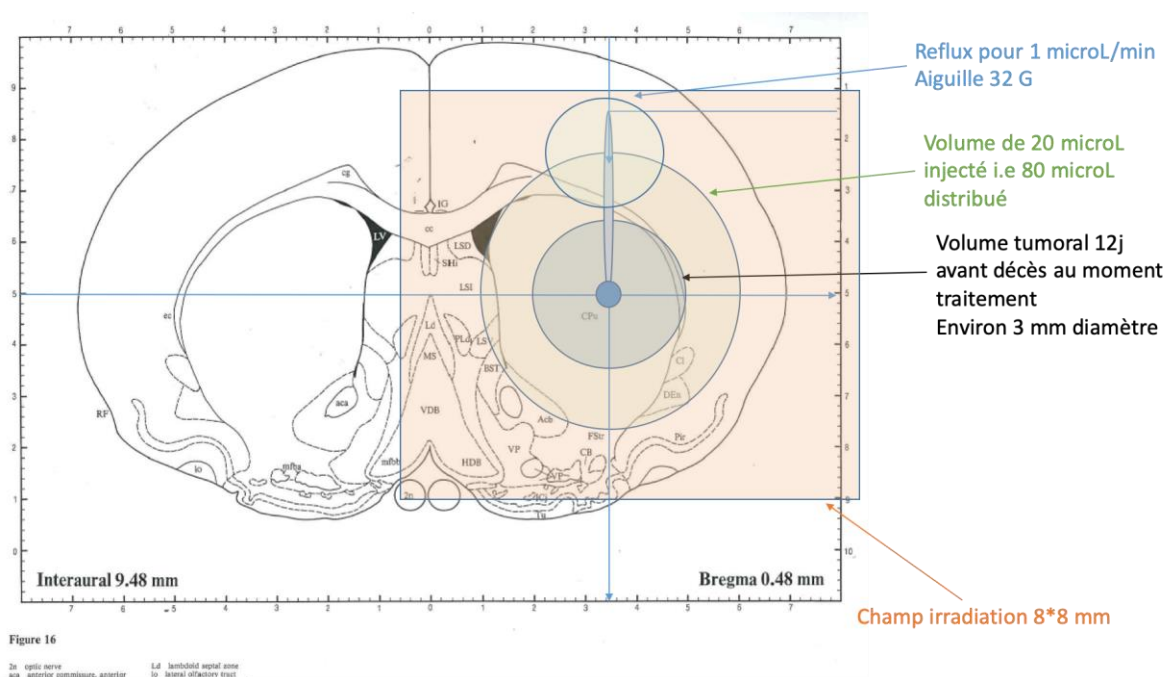


Figure 2.2.4 : Cartographie d'injection CED utilisée pour placer les nanoparticules de fer dans la tumeur. Le volume interstitiel dans lequel diffusent les nanoparticules occupe 25% du volume cérébral. Le volume de distribution sera alors d'environ 80 μL . La lésion causée par l'implantation crée un chemin de moindre résistance qui peut provoquer un reflux.

2.2.3. Suivi temporel des nanoparticules d'oxyde de fer après injection IV ou CED

Plusieurs expériences ont été réalisées pour évaluer la biodistribution des nanoparticules de fer in vivo. Chacune d'entre elles utilisant un mode de suivi différent des nanoparticules : l'imagerie par résonance magnétique (Section 2.3) d'une part, et la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron (Section 2.4) d'autre part. Ensuite, après le sacrifice des animaux, les cerveaux ont été analysés en coupes histologiques avec coloration à l'hématoxyline-éosine et au bleu de Prusse, et par spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser (Section 2.5).

2.3. Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non invasive et non destructive qui permet de mettre en évidence des structures non visibles par l'imagerie des rayons X, notamment les tumeurs cérébrales qui peuvent être visibles sans agent de contraste.

Le principe de l'IRM est basé sur la résonance magnétique nucléaire. Cette technique mesure l'aimantation des atomes d'hydrogène de l'eau qui va changer selon son degré de liaison. En effet, les molécules complexes (comme les protéines ou les lipides) vont modifier le champ magnétique local et modifier la réponse des atomes d'hydrogène.

Pour mesurer l'aimantation des atomes, on applique un champ magnétique \vec{B}_0 sur l'échantillon biologique. Tous les atomes qui composent l'échantillon vont alors s'orienter au niveau macroscopique dans la direction de ce champ magnétique. En réalité l'aimantation des atomes n'est pas strictement alignée avec \vec{B}_0 mais oscille autour de \vec{B}_0 avec une fréquence de rotation spécifique de l'atome considéré et proportionnel à l'intensité de \vec{B}_0 , la fréquence de Larmor :

$$f = B_0 \times \frac{\gamma}{2\pi} \quad 2.1$$

Avec f (MHz) la fréquence de Larmor, B_0 (T) l'intensité du champ magnétique et $\gamma/2\pi = 42,576 \text{ MHz/T}$, le rapport gyromagnétique réduit de l'hydrogène.

Pour mesurer l'aimantation des atomes d'hydrogène de l'échantillon, on applique une impulsion radiofréquence à la fréquence de Larmor f de l'hydrogène. Les atomes entrent alors en résonance avec l'onde électromagnétique et un champ magnétique effectif \vec{B}_1 apparaît, transversalement au champ \vec{B}_0 . Cela permet de créer une composante transversale de l'aimantation des atomes, qui est mesurable lors de son retour à l'équilibre.

La relaxation de l'aimantation n'est pas instantanée et il existe deux constantes définissant cette relaxation. Le temps de relaxation longitudinal, ou T1, représente le temps que l'aimantation met pour revenir dans l'orientation du champ \vec{B}_0 . Le temps de relaxation transversal, ou T2, représente le temps que met l'aimantation pour se déphaser totalement (Figure 2.3.1).

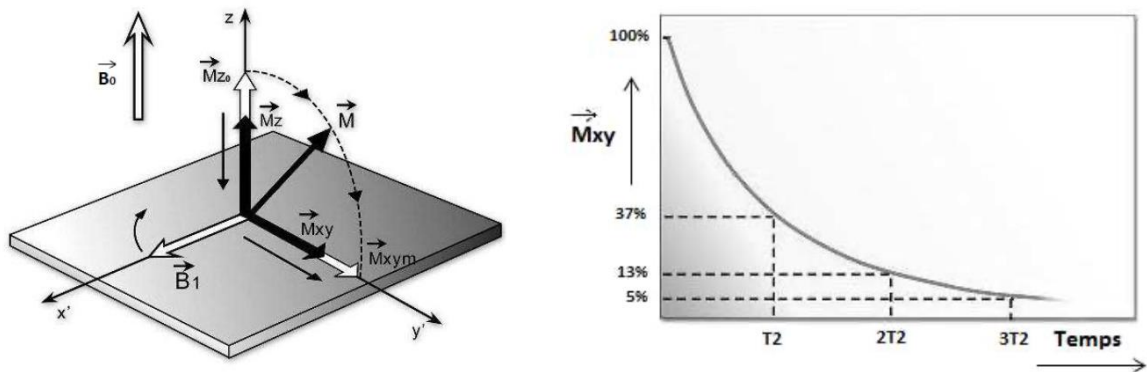


Figure 2.3.1 : Décomposition de l'aimantation \vec{M} créée par le champ \vec{B}_0 suite à l'application d'une impulsion radiofréquence créant un champ \vec{B}_1 perpendiculaire au champ \vec{B}_0 (à gauche). Décroissance exponentielle de l'aimantation transverse \vec{M}_{xy} en fonction du temps après l'impulsion radiofréquence. (D'après Taupin 2013).

Les paramètres T1 et T2 peuvent être obtenus à partir d'une séquence dite « d'écho de spin ». Dans ce type de séquence, une première impulsion d'excitation radiofréquence est émise pour faire tourner l'aimantation des atomes selon l'axe transversal puis, après une période de déphasage, une seconde impulsion d'inversion permet de remettre en phase les aimantations individuelles. Le temps total jusqu'à la mesure est appelé temps d'écho (TE). Un temps de répétition (TR) permet de laisser l'aimantation longitudinale se reconstruire selon \vec{B}_0 .

La modulation de TE et TR permet de pondérer le signal mesuré en fonction des constantes T1 et T2 des différents matériaux. En effet, lorsque TR est court, les tissus ayant un T1 plus élevé auront une aimantation longitudinale plus faible lors de l'impulsion d'excitation, ce qui va se traduire par une intensité de signal plus faible. Pour mesurer T1, on utilisera donc un TE court pour annuler la pondération en T2. Si on utilise un TE plus long, le signal provenant des tissus ayant un T2 plus faible va s'atténuer plus vite. On utilisera alors un TR court pour laisser l'aimantation longitudinale se reconstruire. L'intensité du signal obtenu dépendra des tissus dans lesquels la mesure est appliquée.

Les images obtenues de cette manière montrent les tissus avec des intensités différentes selon leur nature. L'IRM pondérée en T1 met en hypersignal les tissus ayant plus de graisse ou de protéines. L'IRM pondérée en T2 met en hypersignal l'eau extracellulaire, comme dans les œdèmes et les tissus tumoraux.

Il existe des facteurs qui peuvent venir perturber l'aimantation transversale : les inhomogénéités de champ, ou les perturbations du signal par des molécules magnétiques dans les tissus. En pratique, il existe donc un temps de relaxation transversal plus court que le temps T2. Ce T2 effectif est appelé T2*. Lors d'une séquence écho de spin, les inhomogénéités sont annulées par l'impulsion d'inversion et on mesure le T2 réel. Mais il est parfois intéressant de mesurer le T2* pour voir les perturbations dues à des matériaux ferreux, comme l'hémosidérine. Ce signal peut être déterminé par une séquence d'écho de gradient, qui n'a pas d'impulsion d'inversion.

Finalement, afin d'obtenir une image, on applique un gradient de champ magnétique dans les 3 directions de l'espace, ce qui va permettre de discrétiser le volume à imager. Chaque pixel ayant un champ magnétique local différent, on peut déterminer la valeur des paramètres T1, T2 et T2* dans un volume en 3 dimensions.

2.3.1. Imagerie IRM pour l'étude de la distribution des nanoparticules d'oxyde de fer

La distribution des nanoparticules dans les cerveaux de rats porteurs de tumeurs F98 a été étudiée par IRM après injection par voie veineuse ou par injection directe intracérébrale. Pour chaque voie d'injection, 3 rats ont été inclus dans l'étude.

Pour le groupe ayant reçu les nanoparticules en injection IV, nous allons dans un premier temps vérifier que les nanoparticules sont bien détectables dans le cerveau en IRM. Ensuite, nous chercherons à observer une accumulation préférentielle dans la tumeur au cours du temps, par une co-localisation de la tumeur mesurée en T2 et des nanoparticules mesurées en T2*.

Pour le groupe ayant reçu les nanoparticules en CED, nous chercherons à déterminer l'évolution temporelle du volume de distribution initial. Les résultats *in vitro* indiquent que les cellules F98 internalisent les nanoparticules de fer. Notre hypothèse est que les nanoparticules diffuseront dans les tissus normaux et se concentreront dans la tumeur. Une mesure du volume de la région d'intérêt correspondant à l'hyposignal des nanoparticules a été effectuée.

Six rats porteurs d'un gliome F98 ont reçu, 9 jours après l'implantation des cellules tumorales, une injection d'une solution de nanoparticules d'oxyde de fer. 3 rats ont reçu une injection intraveineuse de nanoparticules d'oxyde de fer (1 mL à 54 mg/mL) et 3 rats ont reçu une injection de nanoparticules de fer par CED (20 µL à 32 mg/mL). La tête des animaux a ensuite été imagée par IRM selon les pondérations en T1, T2, et T2*. L'expérience s'est déroulée sur la plateforme IRMaGe au Grenoble Institut des Neurosciences. Les paramètres d'acquisition sont résumés dans le Tableau 2.3.1.

Paramètres	Pondération T1	Pondération T2	Pondération T2*
Nom de la séquence	RARE T1	TurboRare T2	MGE T2*
Champs magnétiques (T)	4,7	4,7	4,7
Nombre de coupes	21	21	7 x 6
Dimension d'une coupe (pixels²)	128 x 128	256 x 256	256 x 256
Taille de champs (mm²)	30 x 30	30 x 30	30 x 30

Tableau 2.3.1 : Paramètres d'acquisition IRM

Les animaux ont été imagés juste après injection (5 à 10 minutes après injection), puis 2h et 24h après, comme représentés dans la Figure 2.3.2. L'objectif de l'expérience est de suivre de manière qualitative la présence de nanoparticules dans le cerveau en fonction du temps sur une période de 24h. Les nanoparticules d'oxyde de fer créent un hyposignal

en IRM, ce qui permet leur observation. L'IRM en pondération T2* est la séquence permettant d'avoir le meilleur contraste pour les nanoparticules dans le cerveau. Lorsque la concentration de nanoparticules est trop élevée, on peut observer un effet de « blooming » qui peut masquer le signal. (Korchinski et al. 2015b).



Figure 2.3.2 : Diagramme représentant les temps d'acquisition des images en IRM selon chaque groupe à partir du temps d'injection.

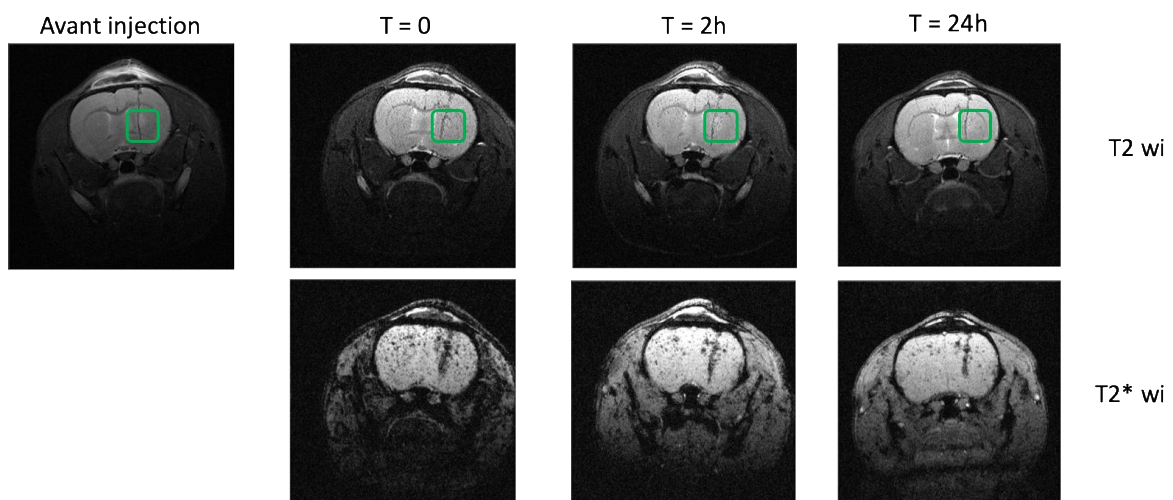
Les images en pondération T2 permettent aussi de localiser la tumeur, car celle-ci crée un hypersignal par rapport au cerveau sain. On espère ainsi mesurer et comparer les volumes de distribution des nanoparticules d'oxyde de fer et les volumes tumoraux.

2.3.2. Résultats des analyses qualitatives par imagerie de résonance magnétique

2.3.2.1. Groupe 1 : injection intraveineuse

Pour chaque rat, la lésion causée par le passage de l'aiguille d'injection est visible dans les images IRM et un fort signal induit par les nanoparticules de fer est observé. Deux des animaux du groupe IV n'ont pas pu être imagés jusqu'à 24h.

Les coupes centrales en pondération T2 et T2* du rat imagé jusqu'à 24h (voir Section 2.3.1) sont représentées dans la Figure 2.3.3. La tumeur est visible en pondération T2 alors que les nanoparticules sont davantage visibles en pondération T2*. On observe dans les images T2 et T2* la lésion laissée par le passage de l'aiguille de la seringue utilisée pour l'implantation de la tumeur.



Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

Figure 2.3.3 : Acquisitions IRM pondérées en T2 (T2 wi) et en T2* (T2* wi) avant et après injection de 1 mL de FeONP à la concentration de 54 mg(Fe)/mL par voie intraveineuse au temps. Les images ont été acquises avant injection, juste après (T=0), puis 2h et 24h après l'injection. La tumeur est encadrée en vert sur les images en pondération T2.

Sur les images T2*, on observe dès le temps initial une prise de contraste importante due aux nanoparticules de fer dans tous les tissus. Les nanoparticules sont également détectables dans le cerveau, attestant que les nanoparticules passent la barrière hématoencéphalique après injection IV. La zone cicatricielle laissée par le passage de l'aiguille au moment de l'injection des cellules tumorales prend particulièrement le contraste. Le signal est très intense au temps initial, tant dans cette zone cicatricielle que dans la zone où se trouve la tumeur (Figure 2.3.3). Il n'est pas possible de discerner sur ces images la distribution des nanoparticules dans la zone tumorale et dans la zone cicatricielle du site d'injection, les deux étant superposées.

Au cours du temps le contraste dû aux nanoparticules reste discernable dans tous les tissus et décroît davantage dans les tissus hors du cerveau. La zone cicatricielle/tumorale reste très contrastée.

Les coupes centrales en pondération T2 et T2* du dernier rat de ce groupe sont représentées dans la Figure 2.3.4. On observe juste après injection (T=0) une accumulation des nanoparticules dans la région tumorale et dans la lésion d'implantation. 2h après l'injection des nanoparticules de fer, le signal induit par le fer diminue et n'est plus détectable dans la région tumorale. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer que des délais courts semblent plus propices pour optimiser le contraste entre tissus tumoraux et tissus sains après injection veineuse des nanoparticules d'oxyde de fer.

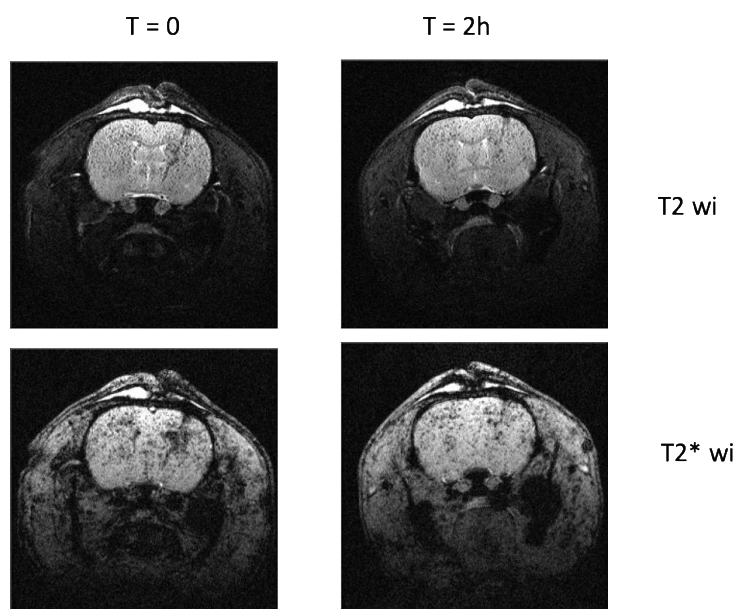


Figure 2.3.4 : Acquisition IRM pondérée en T2 (T2 wi) et en T2* (T2* wi) après injection de 1 mL de FeONP à la concentration de 54 mg(Fe)/mL en intraveineuse au temps T=0. Les images ont été acquises juste après injection, puis 2h après.

2.3.2.2. Groupe 2 : injection CED

Concernant, les 3 rats injectés par CED, on observe un fort hyposignal dans l'hémisphère droit du cerveau, provoqué par la concentration très élevée des nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 2.3.5). Cette concentration élevée des nanoparticules entraîne un artefact appelé effet de « blooming », qui masque le signal dans le volume où se trouvent les nanoparticules. Les images T2 des trois rats de ce groupe, acquises juste après injection (T=0) et 24h après (T=24h), sont présentées (Figure 2.3.5) L'artefact de blooming diminue avec le temps, mais reste présent.

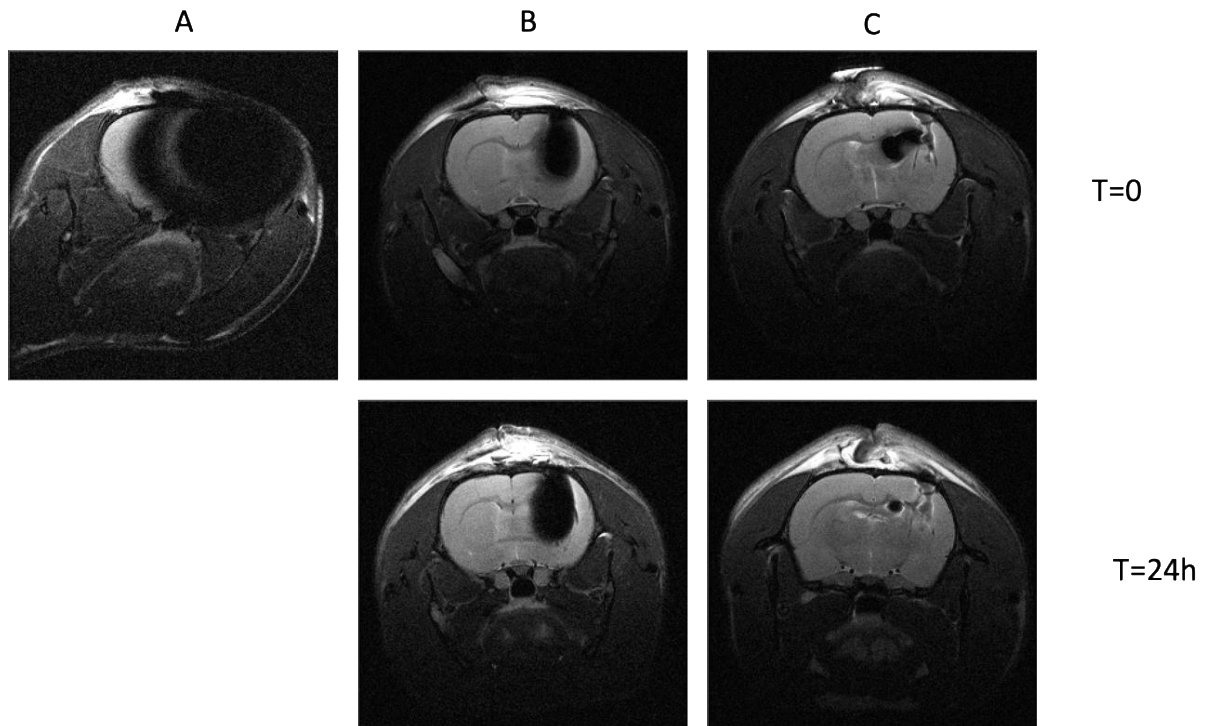


Figure 2.3.5 : Acquisition IRM pondérée en T2 des trois rats (A, B, C) ayant reçu 20 μ L de FeONP à la concentration de 32 mg(Fe)/mL par CED à T=0. Les images ont été acquises juste après injection, puis 24h après l'injection, sauf pour le rat A qui est décédé après la première imagerie.

Les nanoparticules d'oxyde de fer injectées en CED sont trop concentrées pour permettre un suivi par IRM. Dans ces images la tumeur n'est pas visible, car elle est masquée par le « blooming » des nanoparticules. L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 2.3.2.

Groupe	Observations
IV	<ul style="list-style-type: none"> • Les nanoparticules sont visibles dans tout le cerveau. • Un signal important induit par les nanoparticules est observé aux temps précoces, puis le signal décroît jusqu'à la dernière observation (T=24h). Les nanoparticules sont discernables jusqu'à 24 h. • Une accumulation préférentielle des nanoparticules est observée, dans la région tumorale, qui se superpose à la lésion induite par l'aiguille au moment de l'implantation tumorale.
CED	<ul style="list-style-type: none"> • La concentration des FeONP crée un effet de « blooming » important, limitant la visibilité en IRM. • Le signal dû à la présence des nanoparticules diminue chez seulement un des rats à T= 24h.

Tableau 2.3.2 : Résumés des résultats d'IRM en fonction des conditions d'injection.

2.4. Tomographie quantitative par rayonnement synchrotron

La tomographie quantitative par rayonnement synchrotron est une technique d'imagerie *in vivo* permettant de quantifier la présence d'un matériau de numéro atomique élevé à l'aide de rayons X. L'utilisation de faisceaux monoénergétiques quasi parallèles permet de construire des images dont l'intensité est proportionnelle aux coefficients d'atténuation μ des matériaux traversés.

En connaissant l'énergie d'irradiation et la composition du matériau imagé, on peut en déterminer la proportion de chaque élément qui le compose. En utilisant des images acquises à différentes énergies, il est possible de décomposer le matériau imagé en N+1 éléments, avec N le nombre d'images acquises, chacune à une énergie différente. Ainsi, en mesurant les coefficients d'atténuation à deux énergies différentes, on peut extraire les cartographies élémentaires des trois éléments présents dans le cerveau tel que les tissus, le fer et l'iode. Ceci sera détaillé dans la section 2.4.1.3.

2.4.1. Acquisition des images de tomographie

2.4.1.1. Acquisition des projections et construction du sinogramme

Pour obtenir des images en tomographie par rayons X, plusieurs images sont acquises selon plusieurs angles autour de l'objet à imager. Ces images sont appelées « projection ». L'image représentant toutes les projections est appelée un sinogramme. Un objet au centre de rotation de l'image restera au centre du sinogramme, mais un objet éloigné du centre de rotation se déplacera au fil du temps et décrira sur une sinusoïde.

Le nombre de projections acquises influe sur la qualité de l'image reconstruite à partir du sinogramme. On estime qu'il faut au minimum $p_x \times \frac{\pi}{2}$ projections pour obtenir une qualité d'image suffisante avec p_x le nombre de pixels du détecteur (Figure 2.4.1).

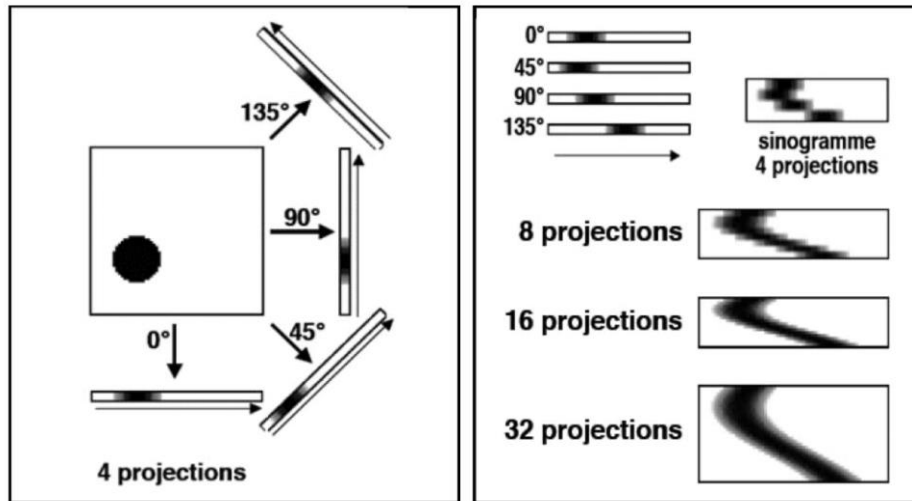


Figure 2.4.1 : Acquisition des projections d'un objet et construction du sinogramme correspondant. Plus on acquiert des projections à des angles différents, meilleure sera l'image reconstruite. (Taupin 2013).

À partir du sinogramme, on peut remonter à l'image originale à l'aide d'algorithmes de reconstruction, le plus utilisé étant la rétroprojection filtrée. La rétroprojection filtrée permet de reconstruire une coupe tomographique en faisant l'opération inverse de la projection, une « rétro-projection », sur une matrice avec un nombre de colonnes et de lignes égal au nombre de pixels du détecteur.

L'équation de l'intensité du faisceau arrivant sur le détecteur, après la traversée de l'objet, est égale à :

$$I(\theta, E) = I_0(\theta, E) \times \exp\left(-\sum_{i=0}^n \mu_i(E) \times x_i\right) \quad 2.2$$

Avec I l'intensité du signal mesuré, I_0 l'intensité du signal « blanc », appelé whitefield, c'est-à-dire mesuré sans l'objet dans le faisceau, μ_i le coefficient d'atténuation linéique de chaque pixel i , d'épaisseur x_i , traversé par le faisceau, E l'énergie, et θ l'angle de rotation de l'acquisition de la projection.

2.4.1.2. Correction des inhomogénéités du faisceau et du détecteur

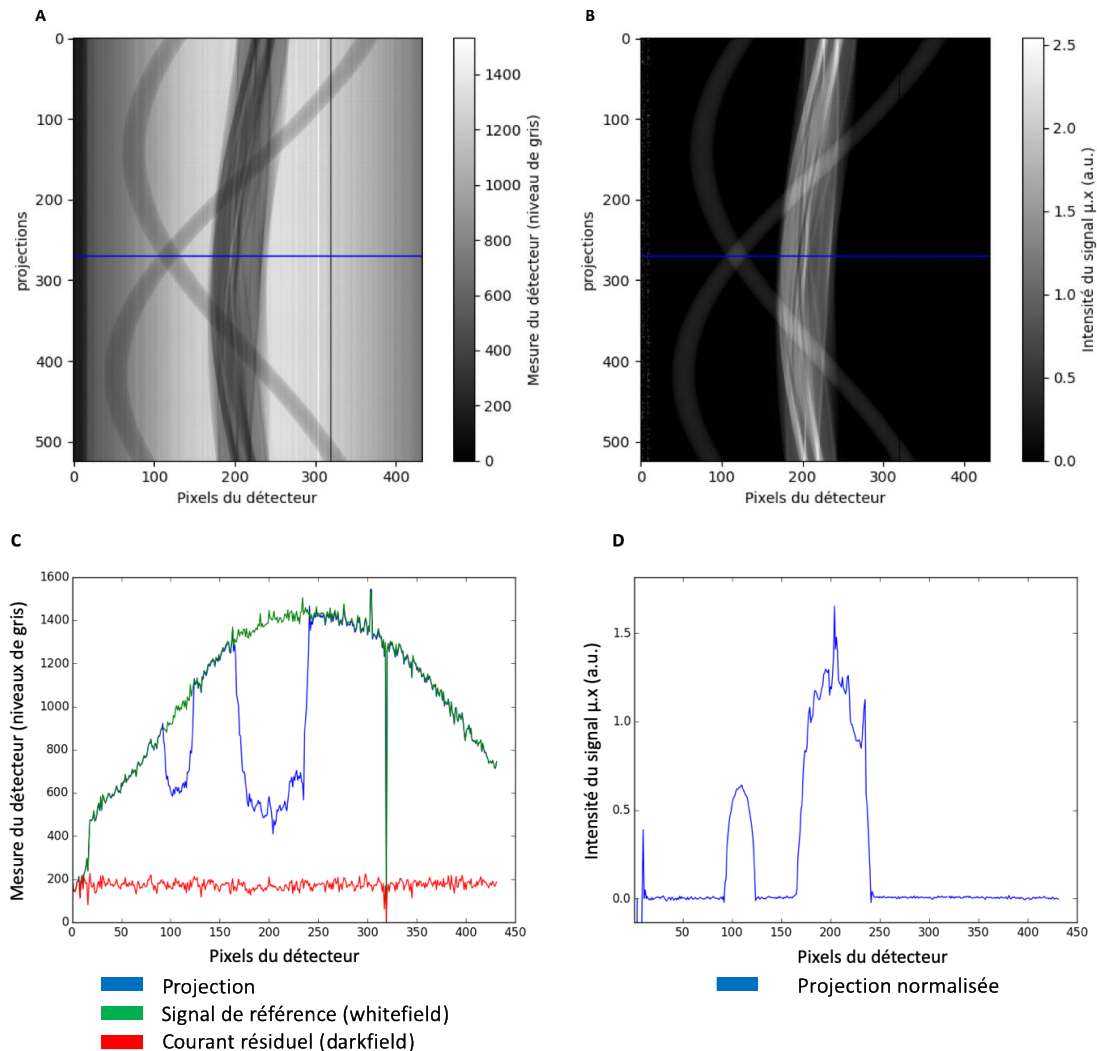
Afin d'obtenir un signal quantitatif de bonne qualité, il est nécessaire de mesurer le courant résiduel du détecteur. Cette mesure est appelée le « darkfield ». La mesure du signal sans objet entre la source et le détecteur, appelé faisceau « blanc », permet de corriger le signal des variations du faisceau et normaliser le signal du détecteur. (H. Elleaume et al. 2002), comme représenté sur la Figure 2.4.2 avec un détecteur germanium dans la cabine ID17 de l'ESRF.

Les mesures du darkfield (df) et du faisceau blanc (I_0) sont prises en compte pour corriger la valeur de chaque projection, selon l'équation :

$$P(\theta, E, x) = -\ln \frac{I(\theta, E, x) - df(E, x)}{I_0(E, x) - df(E, x)} \quad 2.3$$

Avec : P , la projection corrigée des hétérogénéités ; I , le signal mesuré ; I_0 , le signal blanc et df , le courant résiduel. Chaque projection est également normalisée par le signal d'un pixel sur le côté recevant le faisceau blanc pour corriger les variations temporelles du faisceau.

L'intensité du signal dépend de l'énergie (Équation 2.2) et l'utilisation d'un spectre polychromatique peut provoquer un durcissement du faisceau en traversant l'objet imagé, c'est-à-dire que les photons de basses énergies seront plus rapidement atténués que les photons de hautes énergies. En sortie de l'objet, l'intensité mesurée sera dépendante du spectre énergétique et ne sera plus directement proportionnelle à la composition du matériau traversé. L'utilisation d'un rayonnement monochromatique fourni par un synchrotron permet de simplifier les calculs des concentrations. Comme il n'y a qu'une seule valeur de coefficient d'atténuation par matériau, l'intensité du signal est proportionnelle à la concentration comme nous le verrons dans la section 2.4.1.3.



Après la correction des projections et avant la reconstruction du volume, les images ont été filtrées par l'algorithme de Paganin (Paganin et al. 2002), afin d'améliorer le rapport signal sur bruit des images. Cet algorithme ne modifie pas les valeurs des coefficients d'atténuation mesurés.

2.4.1.3. Obtention des concentrations d'éléments lourds

Dans le cadre de cette expérience, nous souhaitons calculer la concentration de deux agents dans le cerveau : l'iode qui est utilisé comme agent de contraste pour localiser la tumeur et qui est injecté par voie veineuse et le fer qui est utilisé ici comme « radiation dose enhancer ». Afin de mesurer le fer, l'iode et les tissus du cerveau, nous allons utiliser une technique permettant de séparer trois matériaux à partir d'images acquises à deux énergies différentes. Cette méthode permet en outre d'obtenir la concentration des éléments qui composent le matériau composite. (H. Elleaume et al. 2002; Taupin 2013).

Une fois les images reconstruites, on obtient des cartes des atténuations linéiques μ (en cm^{-1}) dépendantes de l'énergie E des photons incidents. Le coefficient d'atténuation massique d'un matériau composite peut être calculé selon la formule :

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{\text{matériau},E} = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{i,E} \times \frac{m_i}{M} \quad 2.4$$

Avec $(\mu/\rho)_i$ le coefficient d'atténuation massique (cm^2/g) de l'élément i composant le matériau, et m_i/M la fraction massique (g/g) de l'élément i dans le matériau pour N éléments. En multipliant par la masse volumique du matériau composite ρ , on peut obtenir une équation similaire pour le coefficient d'atténuation linéique μ .

On peut ainsi décomposer le matériau en fonction de ses éléments, si l'on connaît *a priori* sa composition. Les coefficients d'atténuation sont dépendants de l'énergie E et l'utilisation d'un rayonnement X monochromatique permet de les mesurer quantitativement. Dans le cerveau, lorsque les nanoparticules d'oxyde de fer injectées sont présentes en même temps que l'agent de contraste iodé, la valeur du coefficient d'atténuation linéique mesuré dans l'image peut se décomposer sous la forme :

$$\mu_{\text{voxel},E} = \mu_{\text{cerveau},E} \times \frac{v_{\text{cerveau}}}{V} + \mu_{\text{Fe},E} \times \frac{v_{\text{Fe}}}{V} + \mu_{\text{I},E} \times \frac{v_{\text{I}}}{V} \quad 2.5$$

Avec μ_{voxel} (cm^{-1}) le coefficient d'atténuation mesuré sur l'image, μ_{cerveau} , μ_{Fe} et μ_{I} (cm^{-1}) les coefficients d'atténuation du cerveau, du fer et de l'iode de référence (Seltzer 2004), dépendant de l'énergie E (keV) des photons incidents, et $\frac{v_{\text{cerveau}}}{V}$, $\frac{v_{\text{Fe}}}{V}$ et $\frac{v_{\text{I}}}{V}$ (en mL/mL) la fraction volumique de ces trois matériaux dans le voxel d'intérêt.

Dans cette équation, seules les trois fractions volumiques sont inconnues. Afin de résoudre cette équation, le volume est imagé à 2 énergies différentes. On supposera aussi que le matériau est une solution idéale, c'est-à-dire que la somme des fractions volumiques est égale à 1. Sous forme matricielle cela donne :

$$\begin{pmatrix} \mu_{E1} \\ \mu_{E2} \\ 1 \end{pmatrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} \mu_{cerveau,E1} & \mu_{Fe,E1} & \mu_{I,E1} \\ \mu_{cerveau,E2} & \mu_{Fe,E2} & \mu_{I,E2} \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}}_A \begin{pmatrix} f_{cerveau} \\ f_{Fe} \\ f_I \end{pmatrix} \quad 2.6$$

Avec A la matrice des coefficients d'atténuation théoriques et f_M la fraction volumique du matériau M (en %). Cette équation est inversible et l'inverse de cette matrice est égal à la transposée des co-facteurs de A divisée par le déterminant de A :

$$\begin{pmatrix} f_{cerveau} \\ f_{Fe} \\ f_I \end{pmatrix} = \frac{cof(^T A)}{det(A)} \begin{pmatrix} \mu_{E1} \\ \mu_{E2} \\ 1 \end{pmatrix} \quad 2.7$$

De cette manière, on obtient 3 images correspondant aux fractions volumiques des 3 composants du pixel. Enfin, nous obtenons la concentration des différents éléments en multipliant leur fraction volumique par leurs masses volumiques respectives ρ_i . De la même manière nous pouvons acquérir N images avec des énergies différentes afin de séparer les contributions de N+1 éléments.

2.4.2. Acquisition d'images par TQRS pour l'étude de la biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer

Pour notre étude, nous avons utilisé un faisceau de rayons X monochromatique réglé à 31 et 35 keV.

Trois groupes de 3 rats porteurs de gliomes F98 ont reçu 9 jours après implantation de la tumeur une injection de nanoparticules, puis ont été suivis à 3 temps différents.

- Le premier groupe a été imagé juste après l'injection de 1 mL de nanoparticules en IV à la concentration de 54 mg Fe /mL (5 à 10 minutes) puis au bout de 3h et 16h.
- Le second groupe a été imagé juste après l'injection de 20 μ L de nanoparticules en CED (voir section 2.2.2.2) à la concentration de 18 mg Fe /mL puis au bout de 3h et 16h comme le groupe IV.
- Le troisième groupe a été imagé juste après l'injection de nanoparticules en CED concentrées par flux d'azote jusqu'à une concentration de 32 mg Fe /mL, puis au bout de 12h et 24h.

Les différents temps d'acquisition sont représentés dans la Figure 2.4.3.

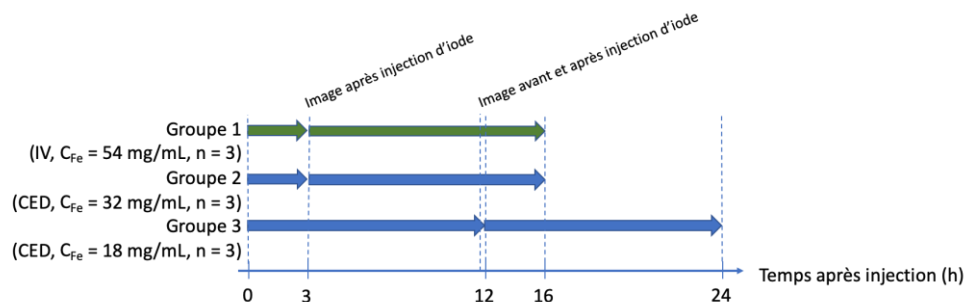


Figure 2.4.3 : Diagramme représentant les temps d'acquisition des volumes en TQRS selon chaque groupe à partir du temps d'injection. Une injection d'iode a été faite au temps intermédiaire ($t = 3h$ ou $12h$) pour localiser la tumeur dans le cerveau.

Aux temps $T=3h$ et $T=12h$ selon le groupe, les animaux ont reçu une injection intraveineuse de 1 mL de Ioméron à 400 mg/mL. L'Ioméron est un agent de contraste qui s'accumule dans la région tumorale par la lésion de la barrière hématoencéphalique observée dans les tumeurs, lorsqu'il est injecté par voie veineuse. Les groupes 1 et 2 ayant reçu l'agent de contraste à $T=3h$ ont été imagés seulement après injection d'iode. Le groupe 3 ayant reçu l'agent de contraste à $T=12h$ a eu une acquisition avant et après l'injection d'iode.

Pour notre étude, nous avons réalisé deux séries d'acquisitions avec un faisceau de rayons X monochromatiques à deux énergies différentes. Les énergies utilisées sont de 31 et 35 keV, de part et d'autre du seuil K de l'iode (33,17 keV) avec une bande passante $dE/E = 10^{-3}$. Pour l'imagerie tomographique, après anesthésie, les animaux sont fixés à un cadre stéréotaxique, monté sur une platine de rotation. Les acquisitions sont réalisées dans la cabine expérimentale de la ligne ID17, le système de tomographie est situé à 13,5 m en amont du détecteur. Des acquisitions de 1800 projections sont enregistrées pour chaque rotation de 360 degrés. Un système optique, comprenant une caméra CMOS, couplée à un scintillateur Gd_2O_2S et à un objectif de microscopie optique, est utilisé pour enregistrer les images radiographiques. La taille de pixel effective du système est de 23 μm . Un temps total de 30 minutes est nécessaire pour collecter l'ensemble des données tomographiques d'un échantillon. Ce temps d'acquisition prolongé est dû au temps de lecture de la caméra, ainsi qu'à la hauteur du faisceau synchrotron disponible (maximum 5 mm) qui réduit la hauteur du champ de vue et exige une tomographie en mode séquentiel de l'échantillon pour obtenir un jeu de données complet.

Chaque projection des sinogrammes acquis est filtrée avec l'algorithme de Paganin (Paganin et al. 2002) en prenant un δ/β de 680, afin d'améliorer le rapport signal sur bruit de l'image. Une rétroprojection filtrée (avec filtre rampe) des sinogrammes est ensuite effectuée pour obtenir l'image des valeurs de coefficient d'atténuation de chaque coupe.

Pour l'analyse en fonction du temps, trois paramètres sont évalués : le volume de distribution, la concentration moyenne dans le volume de distribution et la masse totale, pour le fer et pour l'iode dans les images après injection d'agent de contraste. Les cartes de concentration de fer et d'iode ont été obtenues à partir des images des valeurs de coefficient d'atténuation grâce à la technique décrite dans la partie 2.4.1.3.

Une valeur seuil de concentration a été définie par la mesure des concentrations dans le cerveau controlatéral. Cette concentration seuil est définie comme étant égale à trois fois l'écart-type mesuré dans le cerveau controlatéral ne contenant pas de fer ou d'iode. Cette valeur seuil correspond à : 2 mg/mL pour le fer et à 0,45 mg/mL pour l'iode.

Les volumes sont définis par la région d'intérêt dont la concentration de l'élément est supérieure à la valeur seuil. Le volume est calculé en multipliant le volume d'un voxel par le nombre de voxels compris dans la région d'intérêt. Chaque voxel a un volume de $23 \times 23 \times 23 \mu m^3$ soit $1,2 \cdot 10^{-5} mm^3$. Les volumes de distribution attendus font une taille d'une dizaine de μL ou mm^3 . Notons que ce volume ne représente pas le volume de distribution complet des éléments, mais le volume des concentrations supérieures aux valeurs seuil définies (Figure 2.4.4).

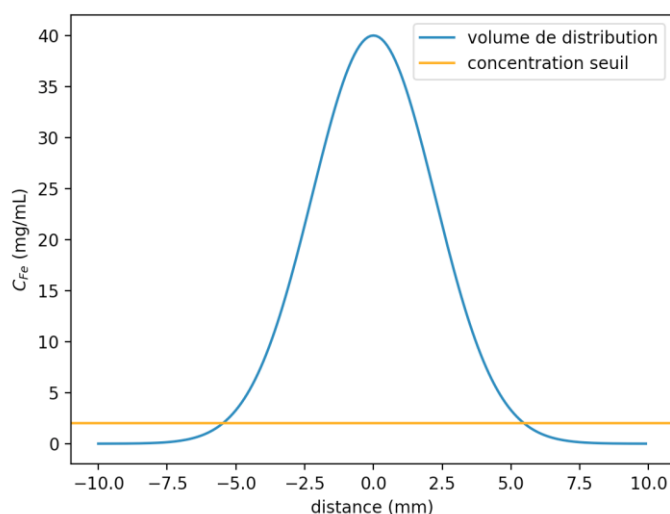


Figure 2.4.4 : Schéma représentant un profil des concentrations théoriques dans un volume de distribution de nanoparticules de fer. Les concentrations inférieures au seuil ne sont pas prises en compte dans le volume calculé.

La concentration moyenne et l'écart-type de la distribution sont calculés dans le volume de distribution. Puis la masse totale est déterminée en faisant le produit de la concentration par le volume dans chaque voxel, puis en sommant les valeurs des masses pour chaque voxel du volume considéré. L'erreur obtenue sur la masse totale par propagation des erreurs a été évaluée inférieure à 0,1%.

2.4.3. Résultat des analyses par tomographie quantitative par rayonnement synchrotron

Dans l'expérience de tomographie, nous avons imagé 9 rats dans 3 groupes. Le premier groupe a reçu des nanoparticules en IV et les 2 autres en CED. Les 3 groupes de rats ont été imagés à différents temps après injection.

Dans le premier groupe, ayant reçu les nanoparticules en IV, il n'a pas été observé de présence de fer dans le cerveau. Dans cette expérience, la limite de détection des nanoparticules est de 2 mg Fe/mL. Les concentrations de nanoparticules étaient inférieures à la sensibilité de cette méthode.

Les 2 autres groupes d'animaux ont reçu une injection de 20 μ L de nanoparticules en CED à la concentration de 32 mg Fe/mL (n=3) et de 18 mg Fe/mL (n=3). Les concentrations mesurées dans les différents rats sont bien supérieures aux limites de détection et forment des volumes diffus et hétérogènes. La Figure 2.4.5 représente le maximum d'intensité cumulé de chaque coupe pour un rat ayant reçu les nanoparticules de fer en CED à la concentration de 32 mg/mL. À cette concentration, un large volume de diffusion des nanoparticules de fer est visible.

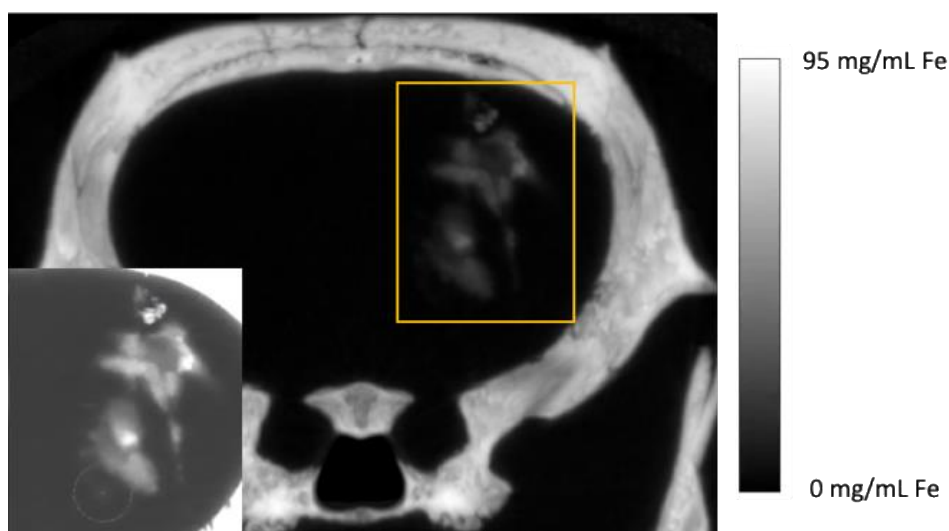


Figure 2.4.5 : Image prise en tomographie synchrotron en projection de maximum d'intensité. Ce rat a reçu 20 μL de nanoparticules en CED à la concentration de 32 mg Fe/mL. Cette image représente la projection en maximum d'intensité, soit pour chaque pixel la coupe ayant le signal le plus fort. L'encart représente la région encadrée en jaune avec un contraste rehaussé.

Pour les rats ayant reçu les nanoparticules à 18 mg/mL, le volume observable de nanoparticules d'oxyde de fer est beaucoup plus faible (Figure 2.4.6).

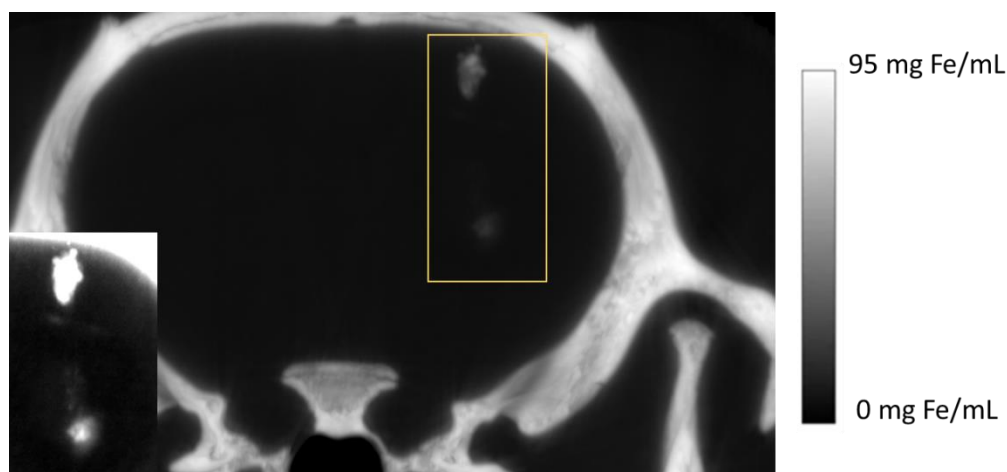


Figure 2.4.6 : Image en tomographie synchrotron en projection de maximum d'intensité. Ce rat a reçu 20 μL de nanoparticules en CED à la concentration de 18 mg Fe/mL. Cette image représente la projection en maximum d'intensité, soit pour chaque pixel la coupe ayant le signal le plus fort. L'encart représente la région encadrée en jaune avec un contraste rehaussé.

2.4.3.1. Mesure de la distribution du fer

Pour chaque rat, les volumes de distribution de fer et les concentrations moyennes ont été mesurés. Ceci a permis de déterminer la masse totale et de comparer ce résultat à la masse injectée. Le tableau 2.4.1 résume les résultats acquis pour chaque individu. Les volumes d'iode seront discutés à la fin de cette section.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

Groupe 1 Ci = 18 mg/mL, Vi = 20 µL, mi = 360 µg					Groupe 1 Ci = 32 mg/mL, Vi = 20 µL, mi = 640 µg					
	Individu	Temps après injection					Individu	Temps après injection		
		0h	12h (avant iode)	12h (après iode)	24h			0h	3h (après iode)	16h
Volume de Distribution C > 2 mg/mL (µL)	G1-1	2,18	1,27	1,57	1,12	Volume de Distribution C > 2 mg/mL (µL)	G2-1	19,1	14,9	16,6
	G1-2	2,10	1,39	1,15	1,03		G2-2	23,2	21,0	17,8
	G1-3	1,86	1,35	1,58	1,20		G2-3	20,2	16,5	13,6
moyenne groupe		2,04±0,17	1,34±0,06	1,43±0,25	1,11±0,09	moyenne groupe		20,8±2,1	17,5±3,2	16,0±2,2
Concentration de fer Moyenne (mg/mL)	G1-1	5,3±3,1	4,7±2,3	4,4±2,6	4,8±3,0	Concentration de fer Moyenne (mg/mL)	G2-1	9,1±9,7	10,5±9,6	10,3±10,3
	G1-2	6,3±6,0	5,4±5,0	6,1±5,5	6,2±5,4		G2-2	10,4±11,5	11,5±11,5	12,3±11,7
	G1-3	5,4±3,4	5,5±3,8	5,0±3,7	5,5±4,0		G2-3	11,4±11,3	14,3±12,7	14,2±12,9
moyenne groupe		5,7±0,6	5,2±0,4	5,1±0,9	5,5±0,7	moyenne groupe		10,3±1,2	12,1±2,0	12,3±2,0
Masse de fer (µg)	G1-1	11,6	6,0	6,9	5,5	Masse de fer (µg)	G2-1	172	157	171
	G1-2	13,2	7,4	7,0	6,3		G2-2	242	242	220
	G1-3	9,9	7,5	7,9	6,6		G2-3	230	237	193
moyenne groupe		11,6±1,6	7,0±0,8	7,2±0,6	6,2±0,6	moyenne groupe		215±37	212±47	194±25

Tableau 2.4.1 : Résultats des mesures de volume, concentration moyenne et masse totale de fer pour chaque rat et moyenne par groupe aux différents temps de mesure. Le groupe 1 a reçu un volume de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer avec une concentration de fer de 18 mg/mL soit 360 µg de fer injecté. Le groupe 2 a reçu un volume de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer avec une concentration de fer de 32 mg/mL soit 640 µg de fer injecté.

La Figure 2.4.7 représente la concentration moyenne mesurée en considérant le volume dans lequel les concentrations de fer sont supérieures à 2 mg/mL dans chacun des deux groupes (n=3/groupe). La concentration reste stable pendant la durée d'observation d'environ 26h. Dans les deux groupes, la concentration moyenne mesurée à t ≈ 15 min correspond à environ 30 % de la concentration injectée. Cette mesure est cohérente avec les résultats obtenus avec d'autres éléments lourds injectés en intracérébrale par CED. (Julia Rousseau et al. 2007; Bobyk et al. 2013) et correspond à la part du volume extracellulaire dans le cerveau dans lequel se distribuent aux temps précoces les éléments lourds injectés et lorsqu'ils ne sont pas absorbés par les cellules. Dans le cerveau des mammifères, le volume extracellulaire représente en effet environ 15-30% du volume total du cerveau. (Nicholson and Hrabětová 2017). Dans l'image scanner, le voxel étant de dimension supérieure aux dimensions des cellules, l'espace occupé par les cellules génère un effet de volume partiel : chaque voxel correspond à la moyenne du milieu interstitiel dans lequel se trouvent les nanoparticules et des cellules dans lesquelles il n'y a pas de nanoparticules (Figure 2.4.8).

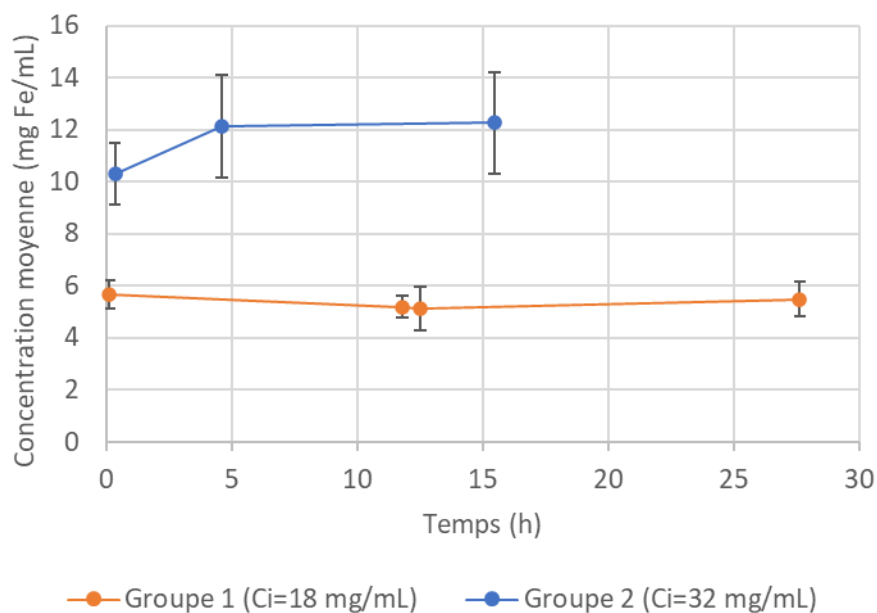


Figure 2.4.7 : Évolution de la concentration moyenne dans le volume de distribution en fonction du temps pour les rats ayant reçu 20 μ L de nanoparticules en CED à la concentration de 18 mg Fe/mL ($n=3$) ou 32 mg Fe/mL ($n=3$). La concentration reste stable dans le temps et correspond approximativement à 30% de la concentration injectée. Moyenne sur les 3 animaux et écart-type correspondant.

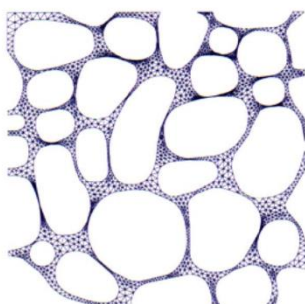


Figure 2.4.8 : Modèle théorique de l'espace extracellulaire. Ce modèle a été construit comme un maillage asymétrique en 2 dimensions pour la méthode des éléments finis d'une solution informatique pour la diffusion. (K. C. Chen and Nicholson 2000)

La Figure 2.4.9 montre l'évolution du volume de distribution de nanoparticules en fonction du temps. Il est défini par le volume dans lequel la concentration en fer est supérieure à 2 mg/mL. Ce volume mesuré sous-estime le volume réel de distribution puisque l'on applique un seuil sur la concentration détectable (Figure 2.4.9). On observe une diminution du volume de distribution des nanoparticules en fonction du temps. Les données ont été ajustées par une courbe de tendance exponentielle d'équation $V(t) = V_0 \cdot \exp(-t/\tau)$. Les différents paramètres et les valeurs obtenues sont résumés dans le Tableau 2.4.2.

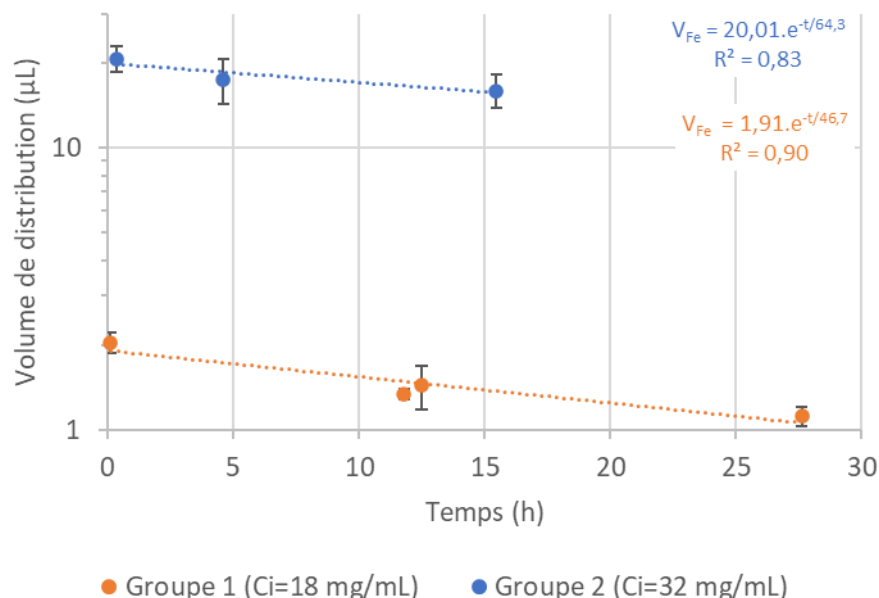


Figure 2.4.9 : Évolution du volume de distribution des nanoparticules en fonction du temps pour les rats ayant reçu 20 µL de nanoparticules en CED. les moyennes pour chaque groupe et écart type correspondant sont représentées pour une solution injectée concentrée à 18 mg Fe/mL (courbe orange, n=3) et 32 mg Fe/mL (courbe bleue, n=3). Le volume de distribution diminue avec le temps avec une constante de temps de 47 h et 64 h, pour les concentrations injectées de 18 et 32 mg/mL, respectivement.

Concentration injectée	V_0 (µL)	τ (h)	R^2
18 mg/mL	1,9	47	0,90
32 mg/mL	20,0	64	0,82

Tableau 2.4.2 : Paramètres d'ajustement pour la courbe de tendance $V(t)=V_0.exp(-t/\tau)$. V_0 est le volume initial τ la constante de temps exponentielle et R^2 le coefficient de détermination de la courbe. Volume injecté : 20 µL

Pour le groupe ayant reçu les nanoparticules concentrées à 18 mg/mL, le volume initial mesuré correspond à un dixième du volume injecté (1,9 µL/ 20 µL). Pour le groupe qui a reçu les nanoparticules concentrées à 32 mg/mL, le volume initial est du même ordre de grandeur que le volume injecté (20 µL/ 20 µL). Les constantes de temps de décroissance exponentielles sont de plusieurs dizaines d'heures (47h et 64h, respectivement), les nanoparticules restent donc dans le cerveau pendant une durée bien supérieure à celle de notre expérience.

La Figure 2.4.10 représente l'évolution de la masse de fer totale dans le cerveau. La masse totale injectée est de 360 µg pour le groupe 1, et de 640 µg pour le groupe 2. Avec un seuil fixé à une concentration en fer de 2 mg/mL, on détecte seulement 3% de la masse totale pour le premier groupe alors que l'on détecte 30% de la masse de fer injectée dans le second groupe.

Une hypothèse pour expliquer la différence entre les deux groupes est la suivante : dans le premier groupe, les nanoparticules diffusent dans les tissus et se diluent à des concentrations inférieures à 2 mg/mL, et ne sont pas détectées. Les nanoparticules détectées sont celles fortement concentrées qui sont restées dans la zone d'injection. Les nanoparticules du second groupe sont sans doute plus agglomérées à cause de l'étape

d'évaporation pour concentrer les nanoparticules. Les nanoparticules restent alors en concentration élevée dans les tissus et sont plus facilement détectables parce que les concentrations sont supérieures à la concentration seuil (voir Figure 2.4.4).

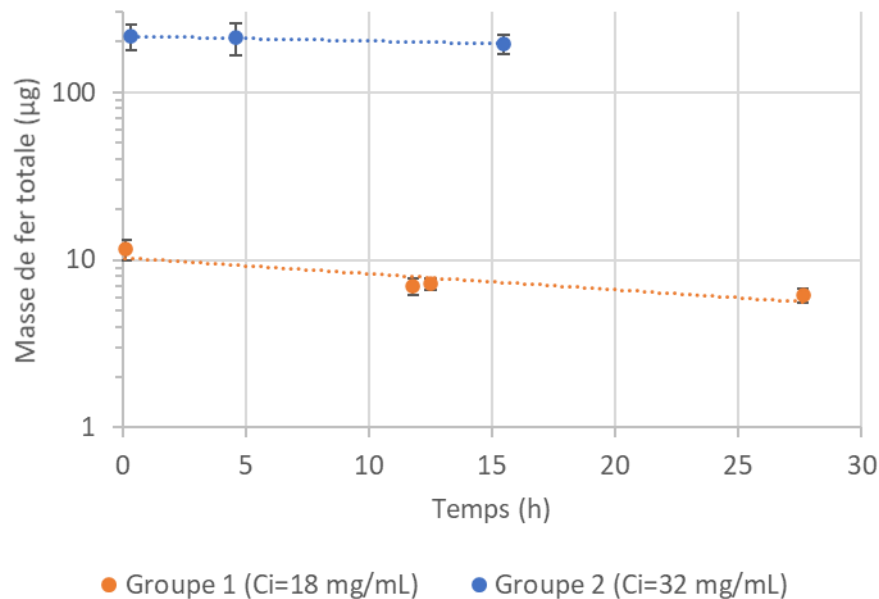


Figure 2.4.10 : Évolution de la masse totale de fer mesurée en fonction du temps pour les rats ayant reçu 20 µL de nanoparticules en CED. Les moyennes et écarts types calculés pour chaque groupe sont représentés pour une solution injectée concentrée à de 18 mg Fe/mL (courbe orange, n=3) (correspondant à 360 µg de fer) ou de 32 mg Fe/mL (courbe bleue, n=3) (correspondant à 640 µg de fer). La masse totale des nanoparticules du groupe 1 est 10 fois plus faible que le volume de distribution du groupe 2.

2.4.3.2. Mesure de la distribution de l'iode

Enfin les volumes de distribution de l'iode injecté par voie intraveineuse ainsi que les concentrations d'iode et la masse totale d'iode pour chaque individu sont représentés dans la Figure 2.4.11. Chaque rat a reçu 1mL de Ioméron® à la concentration de 400 mg/mL par voie intraveineuse, 15 minutes avant l'acquisition des images tomographiques. La concentration seuil pour déterminer des volumes d'iode a été fixée à 0,45 mg/mL (qui correspond à trois fois l'écart-type mesuré dans le cerveau controlatéral ne contenant pas d'iode ; voir section 2.4.2).

Le volume occupé par l'iode représente le volume tumoral, dans lequel la barrière hématoencéphalique est rompue. Le volume tumoral mesuré dans le groupe 1 est de 35 ± 15 µL et de $5,9 \pm 1,5$ µL pour le groupe 2. Les tumeurs des animaux du groupe 2 sont 6 fois plus petites que celles du groupe 1, bien que les délais entre l'implantation tumorale et l'imagerie étaient identiques. Les concentrations moyennes d'iode étaient de $2,01 \pm 0,25$ et $1,28 \pm 0,08$ mg/mL dans les groupes 1 et 2.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

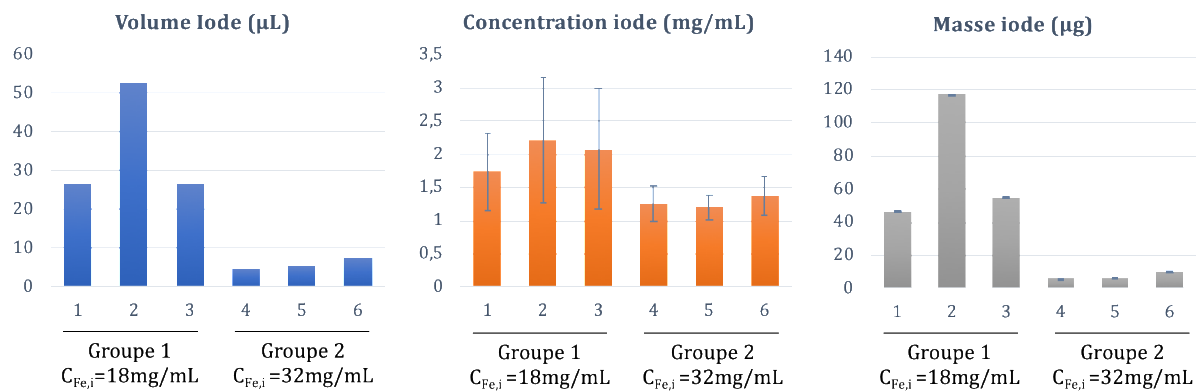


Figure 2.4.11 : Figure représentant le volume, la concentration moyenne et la masse totale d'iode déterminés par TQRS pour chaque rat. Le groupe 1 a reçu une injection de 20 μL de nanoparticules d'oxyde de fer à la concentration ($C_{Fe,i}$) de 18 mg/mL. Le groupe 2 a reçu le même volume de nanoparticules, mais à la concentration de 32 mg/mL. Chaque groupe a reçu 1 mL de Ioméron à la concentration de 400 mg/mL par voie intraveineuse 15 minutes avant l'acquisition. La concentration seuil pour la détermination des volumes d'iode est de 0,45 mg/mL.

Pour résumé, dans cette étude nous avons évalué les volumes de distribution ainsi que les concentrations moyennes en fer et iode obtenues dans ce volume de distribution au cours du temps pour 2 concentrations de nanoparticules de fer injectées avec un volume d'injection fixe de 20 μL. Les volumes de distribution des nanoparticules, mesurés par TQRS, sont différents selon la concentration d'injection utilisée. Juste après injection, les volumes de distribution observés étaient de 2,0 +/- 0,2 et 20,8 +/- 2,2 μL, pour les solutions injectées à des concentrations en fer de 18 mg/mL et 32 mg/mL, respectivement. Ces petits volumes de distribution mesurés sont dus à plusieurs facteurs : les volumes sont sous-estimés, car la limite de détection du fer par la tomographie synchrotron était de 2 mg/mL, la taille et/ou l'agglomération des nanoparticules limite probablement également la diffusion/convection de celles-ci. Par ailleurs, les deux groupes d'animaux ne présentaient pas des tumeurs de tailles comparables, ce qui peut également influencer sur la distribution des nanoparticules (pressions interstitielles différentes (Boucher, Baxter, and Jain 1990) etc.).

Les concentrations en fer observées sont proches de ce qui était attendu et correspondent à la part du volume interstitiel, diminuant par effet de volume partiel la concentration observée (Figure 2.4.8)

2.5. Analyse post-mortem

Après imagerie tomographique ou IRM, des analyses post-mortem ont été réalisées par histologie HE/marquage au bleu de Prusse ou par spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser (LIBS) (section 2.5.2). Les séquences d'imagerie et les différents groupes sont indiqués Figure 2.5.1.

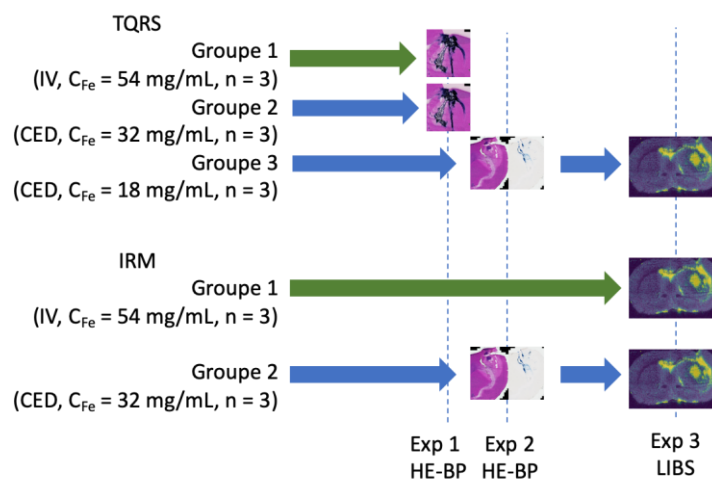


Figure 2.5.1 : Diagramme des séquences d'imagerie et des différents groupes d'animaux. Dans l'expérience 1, les coupes ont été colorées en coloration HE et bleu de Prusse sur la même coupe. Dans l'expérience 2, les colorations HE et bleu de prusse ont été réalisées sur 2 coupes conjointes. Dans l'expérience 3, la coupe a été imagée par la technique LIBS décrite dans la section suivante.

Après la dernière séquence d'imagerie (i.e 24h après injection des nanoparticules), les animaux ont été sacrifiés par injection de pentobarbital et les cerveaux ont été prélevés et congelés dans de l'isopentane puis conservés à -80 °C. Les cerveaux ont ensuite été coupés par cryomicrotrome puis analysés, soit par coloration histologique à l'hématoxyline-éosine et au bleu de Prusse, soit par spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser.

2.5.1. Histologie

L'histologie permet de visualiser les structures tissulaires et cellulaires du cerveau en colorant les structures importantes. Cette technique est la technique de référence pour l'identification de cellules cancéreuses et permet d'identifier précisément les contours des tumeurs. Lors de marquage à l'hématoxyline/éosine (marquage HE), l'hématoxyline colore les noyaux des cellules et l'éosine colore les cytoplasmes. Les cellules tumorales, en division rapide, absorbent fortement l'hématoxyline et apparaissent en violet foncé. En utilisant un colorant additionnel, le bleu de Prusse, qui marque spécifiquement les nanoparticules de fer, on espère observer ces dernières dans les coupes histologiques et les localiser par rapport aux cellules tumorales. Le bleu de Prusse est une préparation de Potassium hexacyanoferrate II trihydraté 5 % / HCl 5 % qui se colore en présence de fer.

2.5.1.1. Matériel et méthodes :

Les cerveaux ont été découpés en coupes transversales de 25 μm d'épaisseur avec cryomicrotome (Leica CM1950). Les coupes de cerveau ont ensuite été marquées au bleu de Prusse suivi d'une coloration HE. Après fixation, les coupes ont été analysées à l'aide d'un scanner à lame Axioscan X1 avec un grossissement X20. Le protocole de coloration par le bleu de Prusse utilisé est celui détaillé dans la thèse de Solveig Reymond. (Reymond 2018). Ces expériences ont fait l'objet du stage de Master 1 de Alexandre Asri (Asri 2019). Dans la première expérience, les lames ont été colorées selon le protocole détaillé dans le Tableau 2.5.1.

Processus	Étapes	Temps
Marquage Bleu de Prusse	Bleu de Prusse	30 min
	Méthanol/acétone équimolaire	2 min
	Rinçage	5 min
Marquage Hématoxyline/ Éosine	Hématoxyline	30 s
	Rinçage	Passage
	HCl 0,5%	Passage
	Rinçage	Passage
	Éosine	1 min
	Rinçage	Passage
Fixation	Éthanol 70%	30 s
	Éthanol 95%	1 min
	Éthanol 100%	2 min
	Toluène	15 min

Tableau 2.5.1 : Étapes de la coloration HE couplée au marquage au bleu de Prusse pour révéler le fer.

2.5.1.2. Résultats des études post-mortem par histologie

Les cerveaux de six rats ayant reçu les nanoparticules en IV (N=3) ou en CED (N=3) ont été analysés après leur suivi par tomographie synchrotron (cf paragraphe 2.4.3).

La Figure 2.5.2 représente une coupe histologique représentative pour deux rats ayant reçu les nanoparticules par voie intraveineuse (1 mL de FeONP à la concentration de 32 mg Fe/mL et sacrifiés approximativement 24h après injection). Le marquage au bleu de Prusse révèle la présence de nanoparticules d'oxyde de fer dans un des trois rats (Figure 2.5.2B). Pour cet animal, on observe la présence de fer dans la circulation sanguine et un marquage très intense de la tumeur. Le marquage HE et le marquage au bleu de Prusse produisant des colorations bleues/violettes très proches, on ne peut pas affirmer avec certitude qu'il s'agisse des nanoparticules de fer (Figure 2.5.2B).

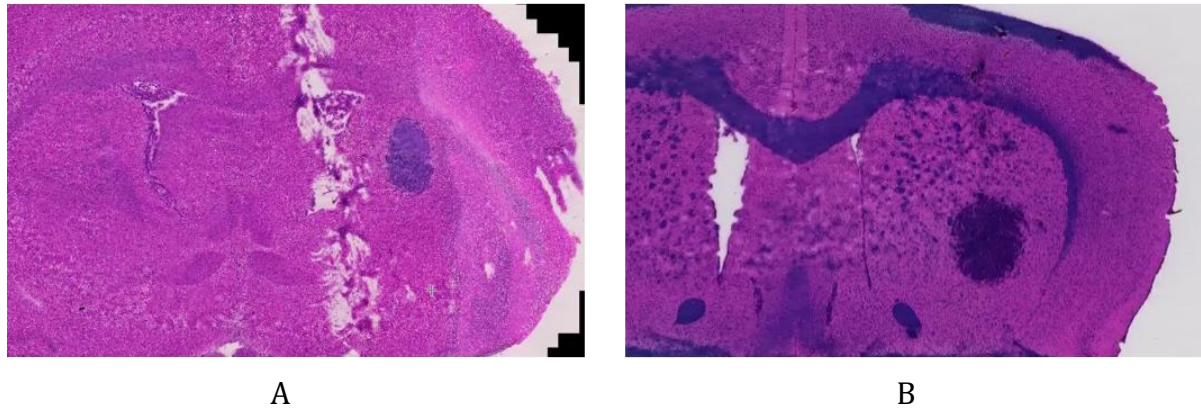


Figure 2.5.2 : Coupes histologiques des cerveaux de deux rats (A,B) ayant reçu 1 mL de FeONP à la concentration de 32 mg Fe/mL par voie intraveineuse. Les animaux ont été sacrifiés approximativement 24h après injection. Les coupes ont été marquées par colorations HE et bleu de Prusse pour observer les nanoparticules d'oxyde de fer. Sur le rat de droite, on observe une coloration bleue dans les vaisseaux, absente sur l'individu de gauche et une prise de contraste intense dans la tumeur.

La Figure 2.5.3 illustre les résultats obtenus après injection par CED des nanoparticules et marquages simultanés HE et bleu de Prusse. L'injection des nanoparticules par CED conduit à des concentrations intracérébrales beaucoup plus élevées qui sont décelables 24h après injection dans les 3 animaux étudiés. La distribution des nanoparticules suit les chemins de moindres résistances à partir du point d'injection : les structures cérébrales, et le chemin de l'aiguille par reflux. Des nanoparticules sont également observées dans le corps calleux. La qualité des coupes histologiques a été dégradée par la présence des nanoparticules de fer au moment de la découpe au cryomicrotome. En particulier, les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer ont rendu difficile la coupe. Des portions de tissus cérébraux ont été arrachées et rendent l'interprétation difficile. Par ailleurs, les deux marquages ayant été réalisés simultanément, il est difficile de différencier la zone tumorale de la zone de prise de contraste induite par les nanoparticules de fer, car les couleurs des marquages sont proches l'une de l'autre.

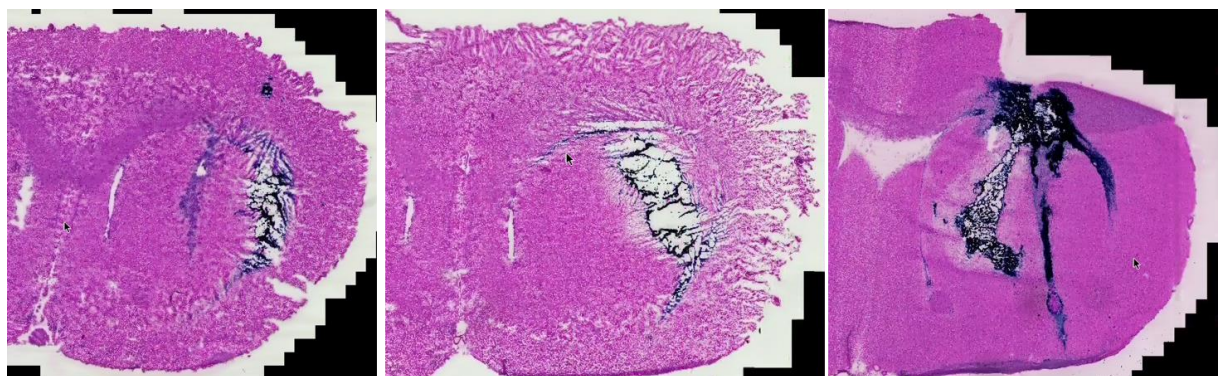


Figure 2.5.3 : Coupes histologiques des cerveaux des 3 rats ayant reçu 20 μ L de FeONP à la concentration de 32 mg Fe/mL en CED. Les animaux ont été sacrifiés approximativement 24h après injection. Les coupes ont été marquées par coloration HE et avec du bleu de prusse simultanément pour marquer la tumeur et observer les nanoparticules d'oxyde de fer.

Pour différencier les zones tumorales des zones d'accumulation de nanoparticules, le protocole a été modifié : les colorations HE et bleu de Prusse ont été réalisées sur des coupes histologiques consécutives, selon le protocole détaillé dans le Tableau 2.5.2.

Processus	Étapes	1re coupe	2e coupe
Marquage Bleu de Prusse	Bleu de Prusse	-	30 min
	Méthanol/acétone équimolaire	-	2 min
	Rinçage	-	5 min
Marquage Hématoxyline/ Éosine	Hématoxyline	30 s	-
	Rinçage	Passage	-
	HCl 0,5%	Passage	-
	Rinçage	Passage	-
	Éosine	1 min	-
Fixation	Éthanol 70%	30 s	30 s
	Éthanol 95%	1 min	1 min
	Éthanol 100%	2 min	2 min
	Toluène	15 min	15 min

Tableau 2.5.2 : Étapes de coloration sur deux coupes consécutives. Coloration HE sur la première coupe, et marquage au bleu de Prusse sur la coupe adjacente. L'étape de fixation est identique après les deux colorations.

Pour le groupe d'animaux ayant reçu les nanoparticules en IV (N=3), nous n'avons pas observé de marquage au Bleu de Prusse. Ceci est fort probablement dû à une trop faible concentration de nanoparticules dans les tissus.

Concernant le groupe de rats ayant reçu les nanoparticules par CED (N=3), les mêmes problèmes d'arrachage de portions de tissus ont été rencontrés. Pour un des rats, une grande quantité de nanoparticules dans les tissus est observée, mais la région tumorale n'est pas entièrement couverte par le volume de fer (Figure 2.5.4).

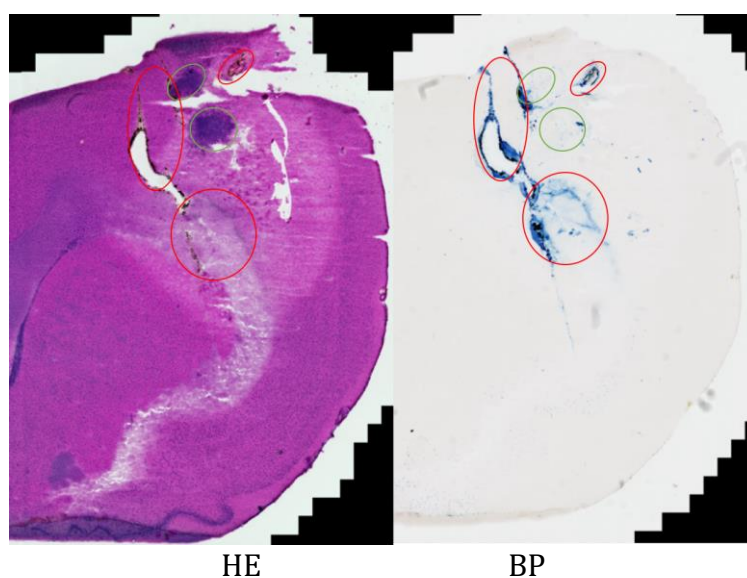


Figure 2.5.4 : Coupes histologiques de cerveaux d'un rat ayant reçu 20 μ L de nanoparticules par CED à la concentration de 32 mg Fe/mL observées au microscope. HE : Coloration à l'hématoxyline-éosine. BP : Coloration au bleu de prusse seul. La tumeur est encadrée en vert, et les nanoparticules en rouge.

Sur le deuxième rat, on observe plusieurs zones tumorales diffuses et le marquage des nanoparticules correspond à l'une d'entre elles (Figure 2.5.5).

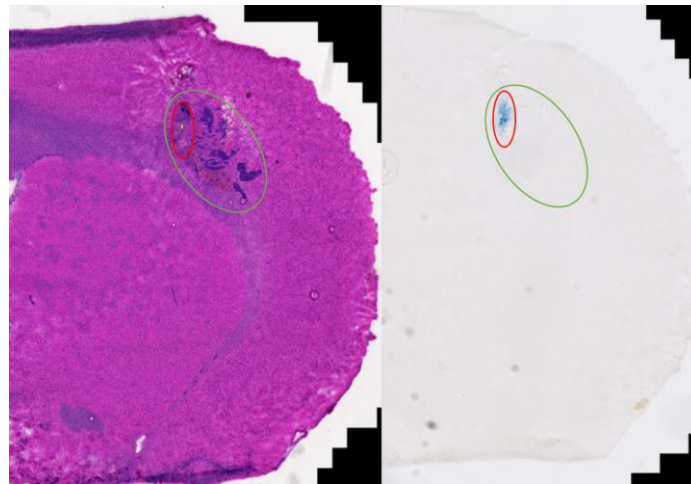


Figure 2.5.5 : Coupes histologiques de cerveau du second rat ayant reçu 20 μL de nanoparticules par CED à la concentration de 32 mg Fe/mL observées au microscope. HE : Coloration à l'hématoxyline-éosine. BP : Coloration au bleu de prusse seulement. La tumeur est encadrée en vert et les nanoparticules en rouge.

En conclusion, nous observons 24h après injection CED, que les nanoparticules ont diffusée dans différentes régions du cerveau : dans la zone tumorale en partie, le long du trajet d'injection et dans le corps calleux. Nous observons un recouvrement seulement partiel de la tumeur. Pour le groupe d'animaux ayant reçu les nanoparticules en IV, nous n'observons pas de marquage au Bleu de Prusse. Ceci est fort probablement dû à une trop faible concentration de nanoparticules dans les tissus.

Pour pouvoir observer dans le cerveau des concentrations de nanoparticules plus faibles, nous allons utiliser une technique plus sensible : la spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser ou LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy).

2.5.2. Spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser

La spectrométrie d'émission optique de plasma induit par laser est une technique de spectrométrie d'émission atomique. Le principe est basé sur l'ionisation des atomes composant le matériau étudié avec un laser. Les atomes ionisés sont dans un état excité et émettent un rayonnement dans l'infrarouge en se désexcitant. Ce dernier est détectable par spectrométrie. La technique de LIBS a été réalisée par la société Ablatom (Lyon). Nous avons ensuite analysé les résultats.

Brièvement, le principe du fonctionnement de la technique est le suivant. Un laser Nd : YAG (Neodymium-doped Yttrium Aluminium Grenat) de 1064 nm émet des pulses quadruples avec une durée de 8 ns et un taux de répétition de 100 Hz. Le laser est focalisé verticalement sur l'échantillon à l'aide d'une lentille (objectif x15) sous atmosphère d'argon à température ambiante. L'échantillon est scanné pixel par pixel avec une résolution dans le plan de 40 x 40 μm^2 . Pendant le scan de l'échantillon, la position du point focal du laser a été adaptée pour corriger les inhomogénéités de surface. Un obturateur a été utilisé pour que seulement une « plume » de plasma soit créée par pixel de l'échantillon. La lumière émise par la « plume » a été récupérée par une lentille de quartz avec une distance focale de 3 cm dans une fibre optique connectée à un spectromètre Czerny-Turner équipé avec un réseau de diffraction de 1200 l/mm à 300 nm. L'acquisition du spectre est réalisée avec un décalage de 300 ns et pendant une

durée de 3 μ s. (Sancey et al. 2014; Motto-Ros et al. 2013). Un exemple de schéma du protocole est présenté dans la Figure 2.5.6.

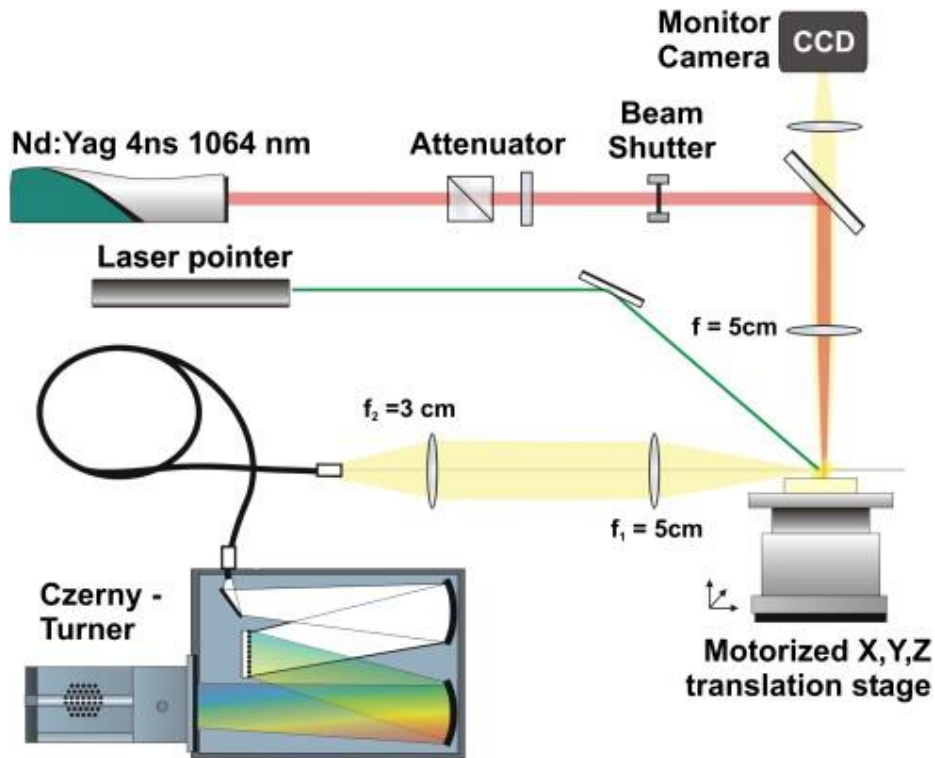


Figure 2.5.6 : Vue schématique du principe du LIBS. Un faisceau laser émettant à 1064 nm est focalisé sur une petite portion de l'échantillon (sample), qui est posé sur un support qui se déplace de pixel en pixel (xyz stage). Pour chaque pixel, le spectre d'émission est analysé par un spectromètre Czerny-Turner. (Motto-Ros et al. 2013)

La quasi-totalité des éléments chimiques répertoriés dans la classification périodique de Mendeleïev peut être détectée par cette méthode. Par ailleurs, en sélectionnant correctement les raies d'émission, il est possible d'analyser plusieurs éléments simultanément, ce qui rend la technique avantageuse par rapport à la spectrométrie de masse. (Sancey et al. 2014).

Deux éléments ont été sélectionnés pour l'analyse des cerveaux de rats de notre expérience : le phosphore et le fer. Le phosphore est présent dans le cerveau avec une plus grande concentration dans la substance blanche du cerveau que dans la substance grise et permet donc de visualiser la structure du cerveau. Les longueurs d'onde des pics de détection du fer et du phosphore sont respectivement de 302,0 nm et 213,6 nm. La résolution spectrale est de 0,15 nm avec une plage de mesure de 30 nm. Un exemple d'acquisition est montré dans la Figure 2.5.7. La limite de détection du fer est d'approximativement 9 ppm ce qui est à peu près équivalent à 9 μ g/mL.

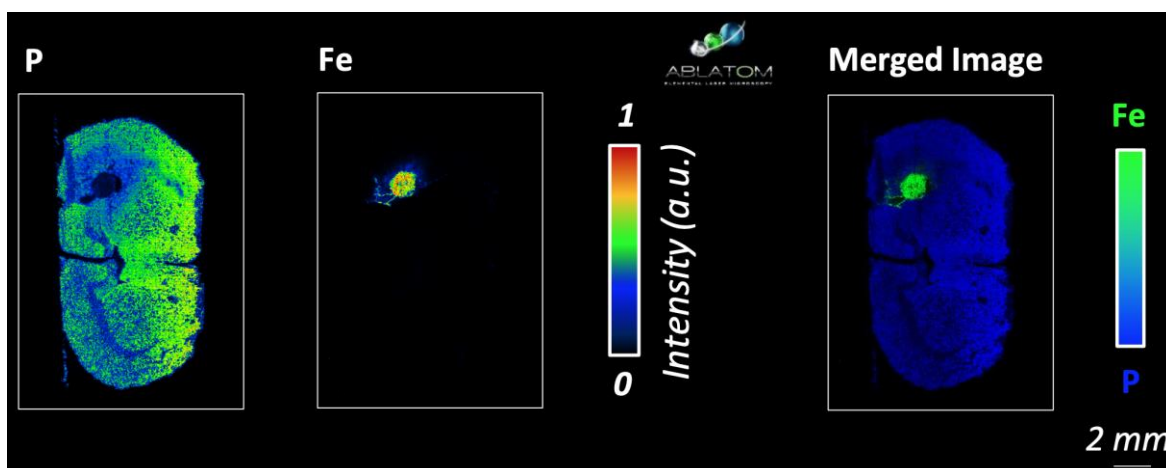


Figure 2.5.7 : Coupes de cerveaux de rats imagés par la méthode LIBS, ayant reçu une injection de nanoparticules en CED à la concentration de 32 mg/mL, puis suivie pendant 24h par IRM. Carte des éléments phosphore (P) et fer (Fe) et image combinée des deux éléments.

La méthode LIBS a été réalisée sur une seule coupe par individu, car le coût de cette méthode est élevé. Parmi les animaux imagés par IRM, 1 individu ayant reçu l'injection de nanoparticules en IV et 2 individus ayant reçu l'injection en CED ont été imagés par cette méthode. Parmi les animaux imagés en TQRS, 2 animaux ayant reçu l'injection de nanoparticules en CED ont été imagés par cette méthode (Figure 2.5.1).

Les cartographies du fer ont été superposées sur les images du phosphore pour localiser la présence de nanoparticules dans le cerveau. La surface de détection du fer a été mesurée manuellement avec le logiciel ImageJ pour pouvoir être comparée avec les autres méthodes. Une valeur seuil de 300 a.u., limite de détection donnée par Ablatom et correspondant à 3 fois l'écart-type du bruit d'une image ne contenant pas de fer a été utilisée pour mesurer la surface de distribution des nanoparticules.

2.5.3. Résultats des études post-mortem par LIBS

Cinq rats des expériences IRM et TQRS précédente ont été imagés par la méthode de LIBS. Cette méthode permet de détecter des concentrations très faibles d'un élément donné (quelques ppm ou $\mu\text{g/g}$).

2.5.3.1. Mesures après injection IV

Les images IRM et LIBS d'un des rats ayant reçu 1mL de nanoparticules par voie IV à la concentration de 32 mg/mL sont montrées Figure 2.5.8. À droite, une coupe IRM T2* acquise 24h après injection des nanoparticules. À gauche, une coupe mesurée par LIBS, l'animal a été euthanasié juste après l'IRM. De très faibles concentrations de fer sont détectables dans le cerveau. On n'observe pas d'accumulation tumorale de nanoparticules d'oxyde de fer dans l'image LIBS, mais il est possible que la coupe sélectionnée ne contienne pas la masse tumorale. Malheureusement, un seul animal injecté par voie veineuse a pu être analysé et une seule coupe mesurée.

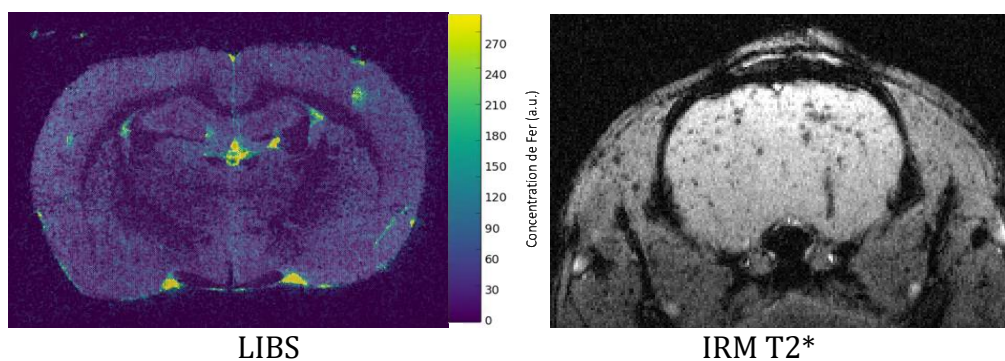


Figure 2.5.8 : Distribution du fer mesurée par LIBS d'un rat ayant reçu 1 mL de nanoparticules d'oxyde de fer par voie IV à la concentration de 32 mg Fe/mL, comparée avec l'IRM T2* du même individu acquise 24h post injection. On observe la présence de fer dans le liquide cérébro-spinal et dans certaines zones périphériques.

2.5.3.2. Mesures après injection CED

Deux groupes ont été analysés. Le premier groupe sont des rats imagés en IRM qui ont reçu des nanoparticules à la concentration de 32 mg/mL. Le second groupe sont les rats imagés en TQRS qui ont reçu les nanoparticules à la concentration de 18 mg/mL (les groupes sont présentés dans la Figure 2.5.1).

Les images LIBS des rats ayant reçu les nanoparticules d'oxyde de fer par CED à la concentration de 32 mg Fe/mL sont représentées Figure 2.5.9, avec les images IRM T2* à T=24h correspondantes.

De même que sur les images IRM, on observe sur les images LIBS une variabilité importante de la distribution des nanoparticules de fer. Pour le premier rat (Figure 2.5.9 A), une grande concentration de nanoparticules est observée dans une région centrale. Avec un seuil de 300 u.a. la surface de distribution du fer est de 8,53 mm². De faibles concentrations de nanoparticules sont également détectées dans le corps calleux et dans la lésion d'implantation. Les concentrations très élevées observées pour le ce rat induisent des artefacts très importants en IRM. Pour le second rat (Figure 2.5.9B), la surface de distribution de 0,84 mm², 10 fois inférieure. Dans les deux cas, les distributions observées par la technique LIBS sont proches de celles observées par IRM.

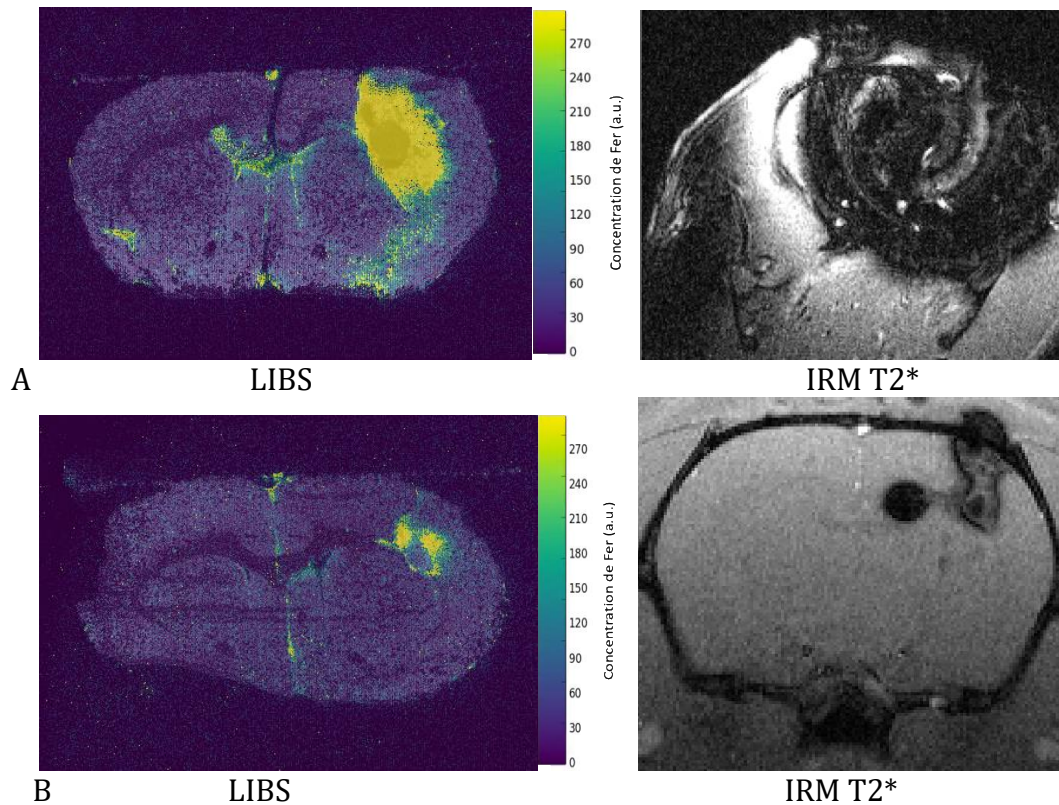


Figure 2.5.9 : Distribution du fer mesurée par LIBS de deux rats (A et B) ayant reçu 20 μL de nanoparticules d'oxyde de fer par CED à la concentration de 32 mg Fe/mL comparée avec l'IRM T2* du même individu acquise 24h après injection des nanoparticules.

Dans le second groupe de rats, ayant reçu les nanoparticules à la concentration de 18 mg/mL et imaged par tomographie synchrotron, on observe des nanoparticules au site d'injection et dans le corps calleux (Figure 2.5.10). La distribution des nanoparticules mesurée par la technique LIBS est plus large que ce qui est observé par TQRS, car la limite de détection par LIBS est beaucoup plus petite. Les surfaces de distribution du fer valent respectivement 1,22 mm^2 et 6,10 mm^2 pour les deux rats représentés. Les surfaces de distribution sont du même ordre de grandeur que pour les rats du groupe ayant reçu les nanoparticules à 32 mg Fe/mL. Ces résultats permettent de mettre en évidence la présence de nanoparticules en dehors du volume de distribution mesuré par TQRS. Ces nanoparticules sont à une concentration inférieure à la limite de détection des nanoparticules d'oxyde de fer par TQRS.

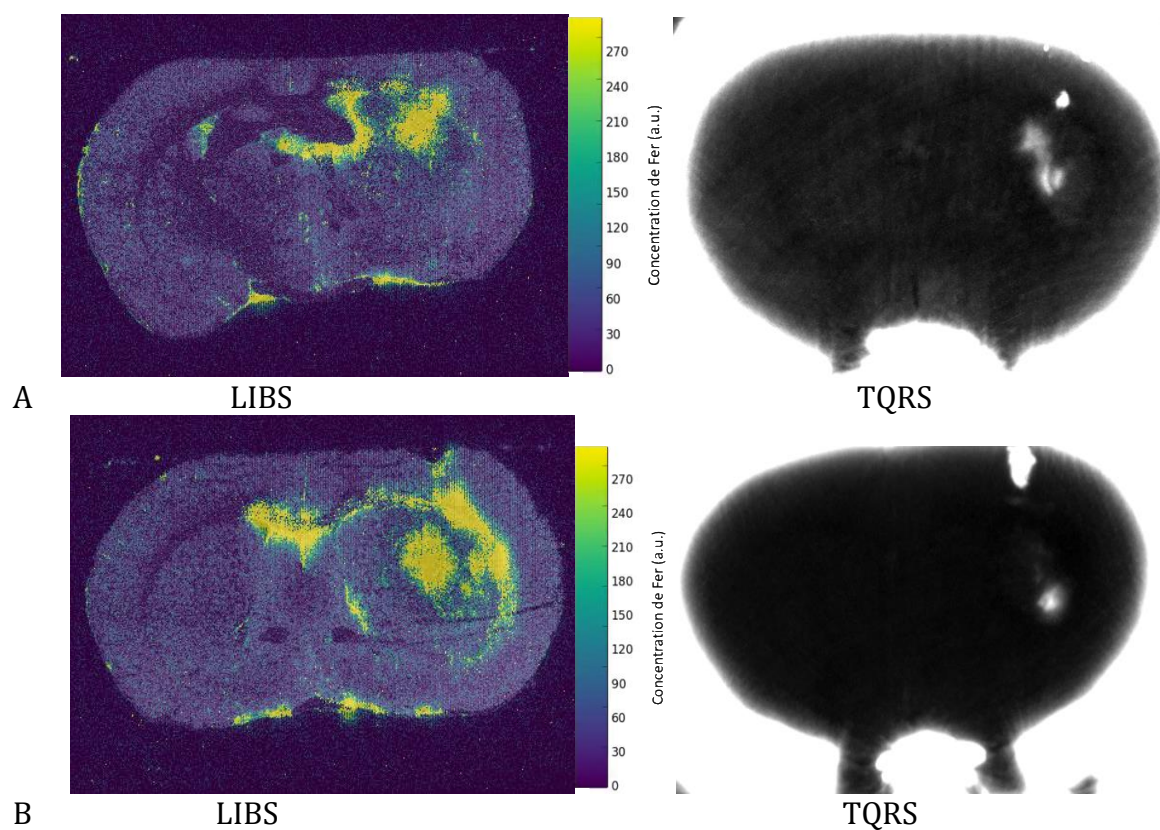


Figure 2.5.10 : Distribution du fer mesurée par LIBS de deux rats (A,B) ayant reçu 20 μ L de nanoparticules d'oxyde de fer par CED à la concentration de 18 mg Fe/mL, comparée avec la coupe centrale acquise par TQRS du même individu acquis 24h après injection des nanoparticules.

2.6. Discussion

L'objectif de ce chapitre était d'évaluer deux méthodes d'administration de nanoparticules (IV et CED) et de mesurer la distribution des nanoparticules au cours du temps, ainsi que le recouvrement de cette distribution par rapport à la zone tumorale. Nous avons utilisé quatre méthodes d'analyse, chacune présentant des avantages et des inconvénients qui sont résumés dans le Tableau 2.6.1.

Technique	Avantages	Inconvénients
IRM	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> - Sensibilité élevée - Semi-quantitatif - Tumeur observable - Tridimensionnelle 	<ul style="list-style-type: none"> - Basse résolution - Saturation (blooming)
TQRS	<ul style="list-style-type: none"> - <i>In vivo</i> - Quantitatif - Haute résolution - Tumeur observable - Tridimensionnelle 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible sensibilité
Histologie Bleu de Prusse	<ul style="list-style-type: none"> - Haute résolution - Tumeur observable - Faible coût 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ex vivo</i> - Faible sensibilité - Qualitatif - Bidimensionnelle
LIBS	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité élevée - Semi-quantitatif - Haute résolution - Pas de saturation 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ex vivo</i> - Coût élevé - Tumeur non observable - Bidimensionnelle

Tableau 2.6.1 : Avantages et inconvénients des différentes techniques d'imagerie utilisées dans ce chapitre.

2.6.1. Protocole d'injection intraveineuse

Après l'injection IV (N=3) on observe une accumulation des nanoparticules dans la région tumorale aux temps précoces, puis une diminution de la concentration jusqu'à 24 h après injection (N=1). Seules l'IRM et le LIBS permettent d'observer la présence de nanoparticules d'oxyde de fer dans le cerveau 24 h après injection IV des nanoparticules. Les techniques d'imagerie par rayons X et d'histologie ne permettent pas de détecter les nanoparticules d'oxyde de fer, les concentrations étant inférieures aux limites de détection de ces techniques. Il serait intéressant de répéter ces mesures par la technique LIBS aux temps courts après injection.

L'imagerie IRM a permis de détecter les nanoparticules d'oxyde de fer avec une résolution spatiale de $117 \times 117 \mu\text{m}^2$. Aux temps précoces, les nanoparticules sont observées dans tout le cerveau, en particulier dans la région tumorale. À 24h, nous n'avons pu faire l'acquisition du volume IRM que d'un animal, qui ne nous a pas permis d'observer une accumulation dans la région tumorale. Cependant, les concentrations observables dans le cerveau à 24h, sont de l'ordre de grandeur d'autres études. En utilisant les mêmes

nanoparticules, Seo et al. ont effectué une expérience similaire avec des rats Sprague-Dawley ayant une tumeur cérébrale C6. Ces rats ont reçu 300 mg/kg (p.c.) de nanoparticules par voie IV, équivalent à notre injection de 1 mL à 54 mg Fe/mL. Dans cette expérience, ils ont mesuré par ICP-MS une augmentation de la concentration tumorale de nanoparticules de 26,3 $\mu\text{g Fe/g}$ tissu 1h après injection à 37,6 $\mu\text{g Fe/g}$ tissu 24h après injection des nanoparticules.(S.-J. Seo et al. 2013). La concentration dans le tissu sain en revanche diminue avec le temps (12,5 $\mu\text{g Fe/g}$ tissu à T=1h et 7,4 $\mu\text{g Fe/g}$ tissu à T=24h).

Un seul animal a été analysé dans ce groupe d'animaux par la technique LIBS, 24h après injection. Nous n'avons pas observé de nanoparticules dans le noyau caudé, mais une seule coupe ayant été analysée, il est possible que la zone tumorale ait été plus éloignée. Il serait intéressant de répéter ces mesures sur un plus nombre d'animaux et également aux temps précoces après injection. Dans cette étude, nous n'avons pas quantifié les concentrations en nanoparticules. La limite de détection du LIBS a été estimée à 9 $\mu\text{g Fe/g}$ tissu. (Sancey et al. 2014) et des expériences de quantification des nanoparticules d'oxyde de fer par IRM montrent que les limites de détection des nanoparticules de fer sont du même ordre de grandeur < 0,2 mmol/L (mesures réalisées avec un aimant de 9,4 T), qui correspond à approximativement 11 $\mu\text{g/mL}$ (Korchinski et al. 2015a).

Pour améliorer l'efficacité d'accumulation des nanoparticules dans la tumeur, plusieurs pistes sont envisageables :

- Améliorer leur stabilité. En modifiant le revêtement des nanoparticules ;
- Améliorer le guidage de nanoparticules. En utilisant un champ magnétique externe, tel que proposé par l'équipe de Chertok (Chertok et al. 2008). Dans leur étude, une injection de 12 mg Fe/kg p.c. de nanoparticules à la concentration de 6 mg Fe/mL a été réalisée par voie intraveineuse (~3-4 mL) dans la veine caudale pendant que la tête de l'animal était soumise à un champ magnétique de 0,4 T créé par deux électroaimants positionnés de part et d'autre de la tête pendant 30 minutes. La concentration en nanoparticules a été suivie au cours du temps par IRM. La Figure 2.6.1 représente le signal des nanoparticules d'oxyde de fer mesuré par IRM pondérée en T2 après injection de nanoparticules avec ou sans champ magnétique. Sans champ magnétique (Figure 2.6.1A-B), la quantité de nanoparticules est légèrement plus élevée quand dans le cerveau controlatéral. Avec le champ magnétique (Figure 2.6.1C-D), la concentration des nanoparticules d'oxyde de fer est beaucoup plus élevée. Le champ magnétique a permis d'augmenter la concentration tumorale d'un facteur 10 par rapport à une injection seule de nanoparticules.
- Améliorer le passage à travers la BHE. Une piste a été aussi étudiée dans la thèse de Solveig Reymond. Dans cette étude préliminaire, l'ouverture de la barrière hématoencéphalique a été permise par l'agitation de microbulles lipidiques à l'aide d'ultrasons, après injection des microbulles dans la circulation sanguine par voie veineuse. L'injection successive de nanoparticules d'oxyde de fer a permis d'observer une plus grande quantité de nanoparticules dans le cerveau des rats traités. La Figure 2.6.2 présente les IRM en T1, T2* et T2 d'un rat ayant reçu une injection de microbulles activées par ultrasons, suivie d'une injection de 200 μL de nanoparticules d'oxyde de fer concentrées à 18 mg Fe/mL. On observe la présence des nanoparticules en T2* dans la lésion créée par les ultrasons visibles en T1. La précision de cette technique est encore limitée, mais elle permettrait une augmentation de la concentration tumorale de nanoparticules. Un nouveau setup

expérimental permettant de réaliser la rupture de la BHE sous imagerie IRM est en cours d'installation à l'Institut des Neurosciences de Grenoble et nous permettra de poursuivre ces recherches.

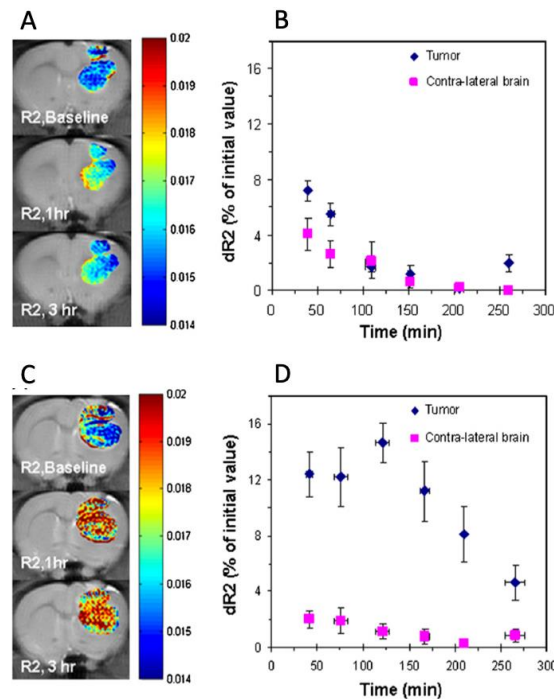


Figure 2.6.1 : Comparaison de l'injection de nanoparticules d'oxyde de fer par voie IV, sans (A, B) ou avec (C, D) un champ magnétique de 0,4 T. (A, C) image IRM pondérée en T2 des cerveaux de rats (B, C) mesure de la différence d'intensité du signal (dR2) créé par les nanoparticules (Chertok et al. 2008)

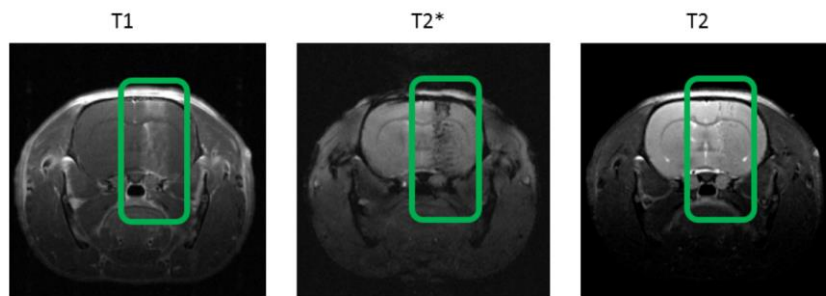


Figure 2.6.2 : Observation d'un cerveau de rat sain par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 200 μL de solution de nanoparticules d'oxyde de fer concentrées à 18 mg Fe /mL. 100 μL d'agent de contraste Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE. Le pattern observé en T2* provient des nanoparticules (S. Reymond thèse 2018).

2.6.2. Protocole d'injection CED

Les distributions de nanoparticules ont été mesurées par tomographie synchrotron après injection par CED de 20 μL de nanoparticules à une concentration de 18 mg Fe/mL ou 32 mg Fe/mL. Trois paramètres ont été étudiés : le volume de distribution des FeONP défini avec un seuil de concentration en fer > 2 mg/mL, la concentration moyenne dans ce volume et la masse totale de fer.

Les volumes de distribution des nanoparticules de fer mesurés étaient de 2 μL et 20 μL respectivement, pour les nanoparticules injectées à la concentration de 18 mg/mL et 32 mg/mL, soit 10% et 100% du volume injecté.

La concentration moyenne mesurée juste après injection était proportionnelle à la concentration injectée et correspond approximativement à 30% de la concentration injectée. Ceci correspond à la proportion du volume interstitiel dans les tissus, dans lequel se distribuent initialement les nanoparticules, qui induisent un effet de volume partiel tel que décrit dans le paragraphe 2.4.3.

Les quantités totales de fer mesurées dans la zone d'intérêt par tomographie synchrotron, juste après injection des nanoparticules, étaient de seulement 3% et 30 % de la masse totale injectée, pour des concentrations injectées de 18 mg Fe/mL et 32 mg Fe/mL, respectivement. Une grande partie des nanoparticules diffusent et la concentration en fer est inférieure à la limite de détection du fer par cette méthode. Les autres méthodes d'imagerie IRM et LIBS qui sont beaucoup plus sensibles ont montré des distributions bien plus grandes des nanoparticules.

Les constantes de temps de décroissance exponentielles sont très élevées, les nanoparticules restent donc dans le cerveau pendant une durée supérieure à celle de notre expérience. En comparaison, les temps de décroissance mesurés dans d'autres études sont beaucoup plus faibles. (Taupin 2013; Bobyk 2010).

Dans les coupes histologiques, le marquage du fer par le bleu de Prusse est limité à la lésion d'implantation. Par ailleurs on peut noter la présence d'une zone décolorée circulaire, centrée sur le point d'injection. Cette zone peut être due à l'injection du liquide contenant les nanoparticules dans le cerveau, puisque le diamètre correspond à celui d'une sphère occupant 20 mm^3 et est égal au volume injecté.

Enfin l'expérience de LIBS permet d'observer une surface plus grande de volume de nanoparticules, grâce à la limite de détection plus faible. La surface mesurée semble correspondre au volume d'injection. Ceci confirme que les nanoparticules ont bien été amenées dans les tissus par la CED et semble cohérent. Cependant la concentration la plus élevée reste au site d'injection.

Les concentrations mesurées en LIBS ne permettent pas une augmentation de dose macroscopique. Cependant, dans les voxels contenant de faibles concentrations de nanoparticules, l'effet de volume partiel permet de justifier la présence de concentrations élevées dans les cellules, pouvant créer un renforcement de dose local important par rapport à la concentration mesurée macroscopiquement dans le voxel.

2.6.3. Comparaison des deux techniques d'administration des nanoparticules

Les techniques utilisées ont permis d'observer que les 2 modes d'administration conduisent à des résultats très différents. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 2.6.2.

Technique	Observations IV	Observations CED
IRM	<ul style="list-style-type: none"> - Nanoparticules dans le cerveau jusqu'à 24h après injection - Pas d'effet EPR observé 	<ul style="list-style-type: none"> - Les images sont saturées (blooming)
TQRS	<ul style="list-style-type: none"> - Nanoparticules non détectables 	<ul style="list-style-type: none"> - Le seuil de détection limite le volume de distribution observable. - La concentration moyenne est équivalente à 30% de la concentration injectée. - Le volume de distribution diminue avec le temps, mais pas la concentration moyenne.
Histologie	<ul style="list-style-type: none"> - Nanoparticules non détectables 	<ul style="list-style-type: none"> - Nanoparticules détectables seulement dans certaines coupes
LIBS	<ul style="list-style-type: none"> - Présence de nanoparticules, mais la tumeur n'est pas détectable 	<ul style="list-style-type: none"> - Grandes concentrations de fer dans la zone injectée et faibles concentrations diffusées dans les tissus sains.

Tableau 2.6.2 : Synthèse des résultats acquis au cours de ce chapitre.

À la vue des résultats obtenus après injection IV, nous avons observé la présence de nanoparticules dans le cerveau aux temps courts après l'injection des nanoparticules, cependant les concentrations diminuent rapidement aux temps plus tardifs. Il serait intéressant d'étudier la distribution des nanoparticules aux temps précoces comme décrite au paragraphe 2.6.1. De plus, la détermination d'une taille seuil par IRM avant de commencer le traitement pourrait influencer la susceptibilité de la tumeur au traitement.

Les concentrations observées dans des études similaires (S.-J. Seo et al. 2013), ne permettent pas d'obtenir un facteur d'augmentation de dose significative. Cependant, l'internalisation des nanoparticules par les cellules permettrait d'augmenter la concentration cellulaire des nanoparticules et en conséquence une augmentation de dose au niveau microscopique. En effet les essais *in vitro* montrent une accumulation des nanoparticules permettant une augmentation de dose. (Reymond 2018). De plus, des essais *in vivo* ont montré une efficacité tumorale avec des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$ (S.-J. Seo et al. 2013; G.-H. Choi et al. 2012).

En comparaison, la CED permet d'augmenter la concentration cérébrale de nanoparticules d'un facteur 1000 (de quelques $\mu\text{g/mL}$ à quelques mg/mL). Les concentrations obtenues après injection par CED permettraient d'obtenir un facteur d'augmentation de dose à l'échelle macroscopique. Cependant les distributions observées des nanoparticules sont inhomogènes et le recouvrement avec la tumeur est difficile à obtenir.

Smilowitz et al. ont comparé la différence de distribution *in vivo* entre les modes d'injection CED et IV pour des nanoparticules d'or dans le modèle tumoral F98 (Smilowitz et al. 2018). Dans cette étude, $10\mu\text{L}$ de nanoparticules d'or (AuroVist, 15nm) à la

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

concentration de 200 mg Au/mL ont été injectées en CED et 0,4 mL de nanoparticules d'or à la même concentration ont été injectées en IV à des rats 3 semaines après implantation de 10⁴ cellules tumorales. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et fixés dans le formol 24h après injection des nanoparticules pour l'analyse histologique.

Dans cette étude, on observe clairement que les nanoparticules injectées en CED sont absentes de la région tumorale (Figure 2.6.3B). Selon les auteurs, ceci serait dû au collagène qui agit comme une barrière physique envers les nanoparticules. (Smilowitz et al. 2018). Au contraire, les nanoparticules d'or injectées en IV s'accumulent dans la tumeur grâce à l'effet EPR (Figure 2.6.3D).

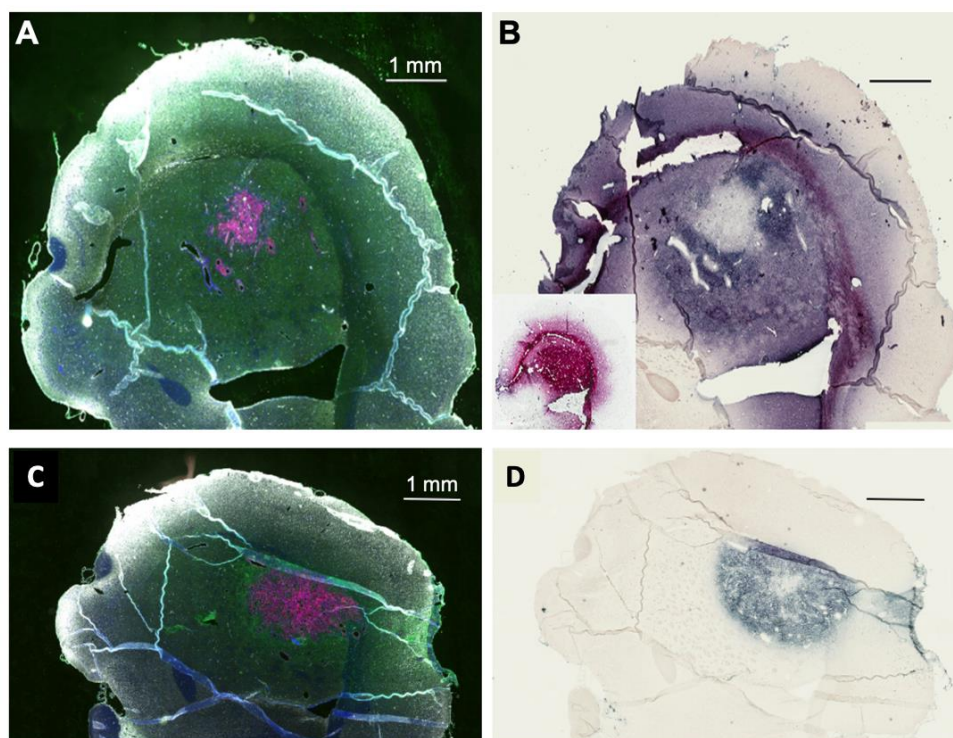


Figure 2.6.3 : Injection de nanoparticules d'or par injection CED (A,B) et par injection IV (C,D) dans le cerveau de rat possédant une tumeur F98 marquée au mCherry Red. (A,C) immunofluorescence marquant mCherry red (tumeur, rouge), anti-albumine (œdème, vert), DAPI (noyaux, bleu) et anti-CD31 (vaisseaux sanguins, blanc). (B,D) coloration des nanoparticules d'or. En CED on observe que les nanoparticules d'or ne se déposent pas dans la tumeur. (Smilowitz et al. 2018)

Une autre hypothèse expliquant la faible accumulation des nanoparticules dans la tumeur est la pression intratumorale élevée. En effet, plusieurs études ont montré l'existence d'une pression élevée dans la tumeur, allant de 10 à 50 mm Hg, qui créerait un gradient de pression poussant les nanoparticules vers l'extérieur. (R. K. Jain and Baxter 1988; Boucher, Baxter, and Jain 1990).

Pour le cas des nanoparticules d'oxyde de fer, une quantité plus importante de nanoparticules sont nécessaires afin d'avoir un effet équivalent à celui des nanoparticules d'or. Néanmoins, obtenir une telle quantité de nanoparticules dans la tumeur n'est possible que par CED. Cependant, les analyses in vitro ont montré que les cellules F98 pouvaient accumuler de grandes quantités des nanoparticules après incubation dans une solution de nanoparticules à la concentration de 0,06 mg/mL pendant 24h, pouvant créer une augmentation de dose microscopique.

Des études d'administration CED montrent que le volume de distribution est supérieur au volume d'injection (Bernal et al. 2014) voir proportionnel au volume d'injection soit de 3 à 5 fois le volume d'injection (Bobyk 2010; Julia Rousseau et al. 2007).

2.6.4. Conclusion

Les expériences de suivi temporel des nanoparticules dans le cerveau des rats nous ont permis d'étudier l'impact du mode d'administration sur la biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer. Deux modes d'administration ont été étudiés, l'injection intraveineuse par la veine caudale et l'injection cérébrale par distribution améliorée par convection ou CED. Après injection IV, on observe par IRM, histologie ou LIBS la présence de nanoparticules dans le cerveau, avec une concentration plus élevée dans la région tumorale aux temps précoces. Les concentrations macroscopiques ne sont pas suffisantes par contre pour être mesurées par TQRS. Après injection CED, le volume macroscopique de distribution des nanoparticules peut être mesuré par TQRS, les concentrations obtenues localement étant supérieures aux limites de détection. Il est cependant seuillé par les concentrations minimales détectables et dépend donc de la concentration injectée. La méthode LIBS, plus sensible que la méthode TQRS, montre que les nanoparticules se distribuent plus largement. La distribution intracérébrale des nanoparticules nécessiterait d'être encore améliorée. L'utilisation de méthodes physiques permettant d'ouvrir temporairement la BHE avec des ultrasons et/ou l'utilisation de champs magnétiques permettraient de mieux cibler la tumeur. Dans l'objectif d'utiliser la radiothérapie par renforcement de dose, une quantité suffisante de nanoparticules doit être présente dans la tumeur. Il est possible que la concentration en nanoparticules de fer ne soit pas mesurable macroscopiquement, mais qu'elle soit très importante à l'échelle subcellulaire, rendant possible un effet thérapeutique.

Chapitre 3. Planification de traitement pour la radiothérapie synchrotron par photoactivation de nanoparticules d'oxyde de fer

3.1. Contexte et objectifs.....	111
3.1.1. Présentation d'un système de planification de traitement.....	112
3.1.1.1. Acquisition des données tomographiques.....	113
3.1.1.2. Segmentation des organes cibles et organes à risques.....	114
3.1.1.3. Définition de la balistique.....	115
3.1.1.4. Calcul de dose.....	115
3.1.1.5. Vérification.....	115
3.1.1.6. Cas particulier de la Radiothérapie Synchrotron avec agent de renforcement de dose (SSRT)	116
3.1.2. Calcul de dose pour le renforcement de dose par nanoparticules.....	119
3.2. Étude de la biodistribution par tomographie synchrotron à 2 énergies.....	122
3.2.1. Étude sur fantôme.....	122
3.2.1.1. Matériel et méthodes.....	122
3.2.1.1.1. Algorithme de séparation des éléments.....	122
3.2.1.2. Validation du modèle biénergétique par mesures sur fantômes.....	124
3.2.2. Étude préclinique.....	128
3.2.2.1. Matériel et méthodes.....	128
3.2.2.2. Mesures de concentration et de volumes in vivo.....	129
3.3. Calcul de Dose.....	131
3.3.1. Méthodologie pour le calcul de dose pour la planification de traitement.....	131
3.3.1.1. Calcul de dose par simulation Monte Carlo avec Gate.....	131
3.3.1.2. Recalage des images.....	133
3.3.1.3. Détermination des régions d'intérêt.....	133
3.3.1.4. Géométrie d'irradiation.....	133
3.3.1.5. Conditions d'irradiation.....	135
3.3.1.6. Évaluation de l'augmentation de dose.....	138
3.3.2. Évaluation dosimétrique et vérification de l'efficacité du traitement.....	138
3.3.2.1. Évaluation du DEF sur fantôme.....	139
3.3.2.2. Résultats in vivo.....	140
3.4. Discussion des résultats.....	146
3.4.1. Distribution de la concentration de nanoparticules en CED.....	146
3.4.2. Dosimétrie.....	149
3.5. Conclusion.....	152

3.1. Contexte et objectifs

Dans ce chapitre, nous allons présenter la planification de traitement pour la radiothérapie synchrotron (SSRT) renforcé par les nanoparticules d'oxyde de fer. Après avoir étudié la distribution des nanoparticules en fonction du mode d'injection, nous avons adapté un plan de traitement afin d'évaluer l'impact de la présence des nanoparticules de fer sur la dose, qui est l'élément clé de la radiothérapie.

En radiothérapie, la planification de traitement est le processus pendant lequel l'équipe médicale définit le traitement, afin de déterminer la position des faisceaux et la dose à administrer pour que la distribution de dose soit optimale. Cette étape est cruciale pour tout traitement de radiothérapie, car l'effet des rayonnements sur les tissus n'est pas directement détectable. Les médecins médicaux utilisent pour cela un logiciel de planification de traitement qui permet de simuler l'effet du traitement dans un « patient virtuel », créé à partir des données anatomiques du patient (tomographie, IRM). Cette distribution de dose dans un « patient virtuel » est extrapolée chez le patient réel et permet de déterminer la quantité de rayonnement reçu par chaque organe. Avec l'avancée des technologies, des géométries de plus en plus complexes nécessitent des logiciels de planification de plus en plus précis.

Les calculs de dose sont basés sur les données anatomiques du patient. Ces données anatomiques sont déterminées par l'acquisition d'images tomographiques. Ensuite, une balistique de traitement est choisie permettant ainsi de simuler la dose délivrée aux différents organes. Une fois la distribution de dose déterminée, on évalue l'efficacité attendue du traitement en comparant la dose absorbée par la tumeur et les tissus sains environnants.

Pour prendre en compte l'effet du renforcement de dose par les nanoparticules dans le calcul de la distribution de dose, nous devons connaître la concentration de nanoparticules *in vivo*. La tomographie quantitative à 2 énergies nous permet de mesurer les concentrations de ces éléments de numéro atomique élevé chez le patient.

Nous allons aborder les différents aspects de la planification de traitement pour la radiothérapie synchrotron par photoactivation de nanoparticules de fer. Pour cela, nous étudierons la distribution des nanoparticules dans le cerveau de façon quantitative, puis nous évaluerons l'augmentation de dose due aux nanoparticules en nous basant sur les conditions réelles d'irradiation (positionnement, balistique, anatomie du patient, etc.) et en tenant compte de la concentration et la distribution des nanoparticules d'oxyde de fer.

Ce chapitre est divisé en deux parties complémentaires de la planification de traitement :

- La détermination des concentrations de fer par tomographie quantitative
- Le calcul dosimétrique permettant d'obtenir la distribution de dose qui sera déposée dans la zone irradiée.

Après la description des différentes étapes de la planification de traitement pour la radiothérapie, nous allons nous intéresser à chacune de ces questions dans une section différente. Enfin, nous allons discuter des résultats présentés au cours de ce chapitre.

3.1.1. Présentation d'un système de planification de traitement

Comme défini dans le premier chapitre, la radiothérapie cherche à détruire les cellules tumorales par l'action des rayonnements ionisants. Il faut déterminer la dose absorbée par la tumeur et dans les tissus traversés pour maximiser la dose dans la tumeur et minimiser la dose dans les tissus sains.

En radiothérapie externe, la dose (qui correspond à l'énergie déposée dans la matière) provient de faisceaux de rayons X émis par une source placée à l'extérieur du patient, à l'inverse de la curiethérapie qui utilise une source de rayons X placée à l'intérieur du patient.

Le parcours des photons et des particules secondaires est décrit par la balistique de traitement. La balistique de traitement dépend :

- Du type de rayonnement et de son énergie ;
- Du nombre, de l'orientation et de la géométrie des faisceaux ;
- De la modulation de l'intensité des faisceaux.

La dose et la balistique sont la base de la planification de traitement en radiothérapie externe. Un outil de planification de traitement appelé TPS pour *Treatment Planning System* permet d'élaborer et d'optimiser un plan de traitement radiothérapeutique et de le valider. Le plan de traitement définitif établit notamment la dose et ses modalités de délivrance (dose par séance, nombre et fréquence des séances). Ce plan de traitement est personnalisé et spécifique du patient à traiter. (Barrett et al. 2009).

Il existe de nombreux logiciels de planification commerciaux (Isogray, Dosisoft, Éclipse, etc.). Pour certaines thérapies expérimentales, ces logiciels doivent être adaptés pour prendre en compte les spécificités de ces traitements.

Les fonctionnalités des systèmes de planification de traitement (TPS) couvrent toutes les étapes de la préparation et de la mise en traitement du patient définies par le radiothérapeute et le physicien médical.

La planification de traitement peut être divisée en 5 étapes (Figure 3.1.1) :

- Acquisition des données tomographiques ;
- Segmentation des volumes d'intérêt ;
- Positionnement des faisceaux ;
- Calcul tridimensionnel de la dose ;
- Vérification de la dose dans les différents volumes.

La planification de traitement produit comme résultat la distribution de dose dans le patient. Si la distribution de dose n'est pas acceptable, le physicien médical modifie la balistique et recommence le calcul de dose afin d'optimiser le traitement. (TRS 430 2004).

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

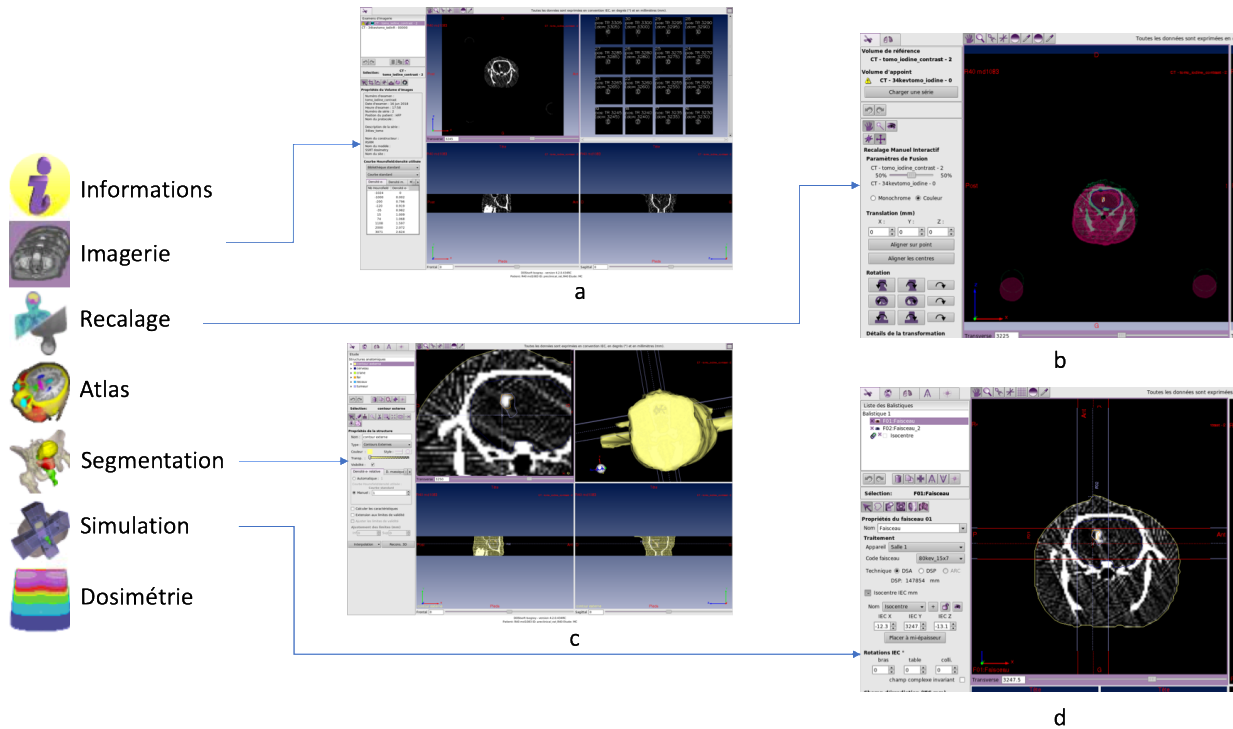


Figure 3.1.1 : Les différents modules de l'outil de planification de traitement Isogray pour le traitement d'une tumeur cérébrale chez le rat. (a) Le module d'Imagerie permet le chargement et la visualisation des volumes du patient. (b) Le module de Recalage permet de recalrer automatiquement et manuellement les différents volumes chargés. (c) Le module de Segmentation permet de créer les régions d'intérêt à partir de l'étude des différents volumes. Un contournage manuel ou par seuil d'unités Hounsfield est possible. (d) Le module de Simulation permet de créer et de positionner les faisceaux et permet de faire des calculs dosimétriques.

3.1.1.1. Acquisition des données tomographiques

La première étape du TPS est l'acquisition des données anatomiques du patient (positions et volumes des organes) et la définition des données nécessaires à la dosimétrie (matériaux et densités des différents tissus). Ces données sont acquises par différentes modalités d'imagerie tridimensionnelles, comme la tomographie par rayons X ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les acquisitions d'imagerie doivent permettre de localiser et de délimiter les différents organes d'intérêt. L'utilisation de plusieurs modalités d'imagerie permet de localiser la tumeur par rapport à une image de référence. Afin que les acquisitions issues de différentes modalités d'imagerie puissent correspondre, on utilise une méthode appelée « recalage », pour superposer les images dans un même référentiel.

Dans les images de tomodensitométrie ou CT (*Computed Tomography*), les voxels sont usuellement gradués par un « nombre CT » ou N_{CT} , noté en Unité Hounsfield (HU). Cette échelle est calculée de la façon suivante :

$$N_{CT} = \frac{\mu_{\text{voxel}} - \mu_{\text{eau}}}{\mu_{\text{eau}}} \times 1000 \quad 3.1$$

Avec μ_{voxel} (cm^{-1}) la valeur du coefficient d'atténuation mesurée par la tomographie et μ_{eau} (cm^{-1}) le coefficient d'atténuation de l'eau à l'énergie d'acquisition de l'image.

L'acquisition des images permet de déterminer les contours de la cible à irradier (dans notre cas, la tumeur) et des organes à risques.

3.1.1.2. Segmentation des organes cibles et organes à risques

Les structures anatomiques sont segmentées dans le volume du patient à partir des images recalées (contours externes, organes à risques, volumes cibles). Pour la radiothérapie chez l'homme, certains de ces organes peuvent désormais être segmentés automatiquement grâce à un atlas anatomique. (Ramus 2011). Comme nous allons travailler sur des rats, nous n'utiliserons pas cette méthode.

l'ICRU (*International Commission on Radiation Units and measurements*) définit différents volumes pour la prescription de dose (ICRU 1994):

- Le GTV (*growth tumor volume*) est le volume visible de la tumeur ;
- Le CTV (*Clinical target volume*) correspond au volume dans lequel on veut éliminer les cellules tumorales. En plus du GTV, il contient des marges dépendantes du type de tumeur à traiter, pour prendre en compte les cellules infiltrantes non visibles à l'imagerie ;
- Le PTV (*Planning target volume*) est le volume à traiter. Il contient le CTV et prend en compte des marges correspondant aux mouvements des organes et à l'incertitude de réalisation de traitement ;
- Les organes à risques OAR (*organ at risk*) sont les organes pour lesquels la dose ne doit pas dépasser une valeur limite.

En plus de ces volumes d'intérêt, il faut déterminer la composition et la densité des matériaux composant les organes du patient à partir des images tomographiques. Pour chaque voxel d'une image tomographique, l'intensité (HU) mesurée correspond à un matériau et une densité donnée, obtenus grâce à une échelle de conversion calibrée par mesure sur fantôme (Figure 3.1.2).

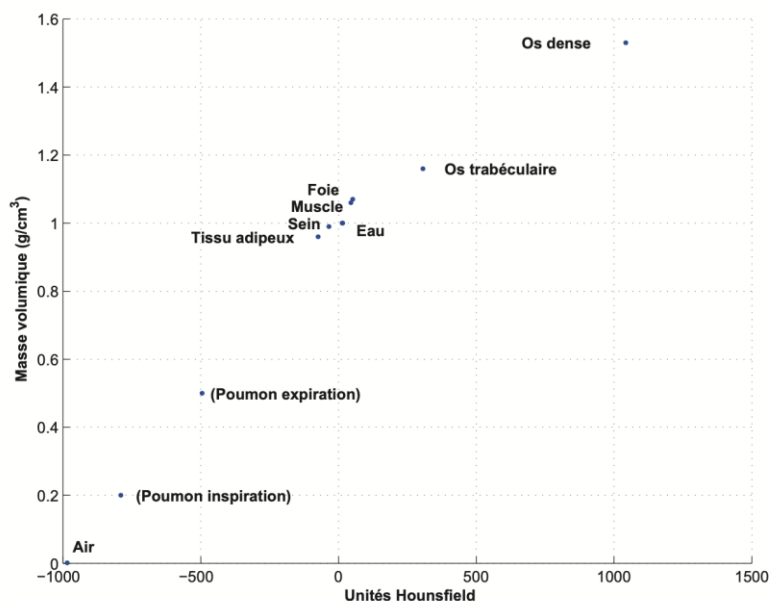


Figure 3.1.2 : Échelle de conversion des unités Hounsfield en masse volumique pour les différents matériaux biologiques calibrées à partir d'un fantôme de calibration CIRS 62 (Vautrin 2011a).

3.1.1.3. Définition de la balistique

La balistique des faisceaux est définie par la recherche d'une position optimale pour chaque faisceau. Un isocentre est placé au centre de la tumeur, il correspond à l'intersection entre l'axe du faisceau et l'axe de rotation de l'appareil. Ainsi les différents faisceaux sont définis par simple rotation tout en ciblant la tumeur. Une fois la direction d'irradiation choisie, on définit la taille et la forme du champ, c'est-à-dire la forme de la coupe transversale du faisceau.

3.1.1.4. Calcul de dose

À l'aide des données anatomiques et de la balistique, on effectue une simulation du traitement d'irradiation. Il s'agit d'un calcul de la dose délivrée au patient.

Le calcul de dose permet l'optimisation du traitement en termes de couverture de la tumeur et de préservation des tissus sains. Pour cela, il existe plusieurs méthodes de calcul pouvant être intégrées dans les TPS, notamment la méthode de calcul par simulation Monte-Carlo, considérée comme la plus précise, mais également la plus gourmande en temps de calcul. D'autres méthodes couramment employées sont les méthodes de calculs déterministes, comme les algorithmes de convolution/superposition.

La méthode de Monte-Carlo est basée sur la génération de nombres aléatoires pour simuler les interactions des particules individuellement, en suivant les lois physiques. Cette méthode est expliquée plus en détail dans la section 3.1.2.

3.1.1.5. Vérification

Le calcul de la distribution de dose permet à l'utilisateur d'évaluer le plan de traitement et de l'optimiser avant de le valider (Dyk 1999). Cette évaluation est établie à partir de la distribution de dose dans les différents organes et de l'étude des « histogrammes dose volume » (HDV). Un HDV représente la proportion d'un organe recevant une quantité de dose. Autrement dit, c'est un graphique où chaque point de la courbe représente le volume (en ordonnée) de l'organe considéré qui reçoit une dose au moins égale à la dose lue en abscisse (Figure 3.1.3). Enfin un dernier critère d'évaluation est de mesurer la dose à des points de mesure particuliers (par exemple la dose à la peau, ou la dose à l'isocentre).

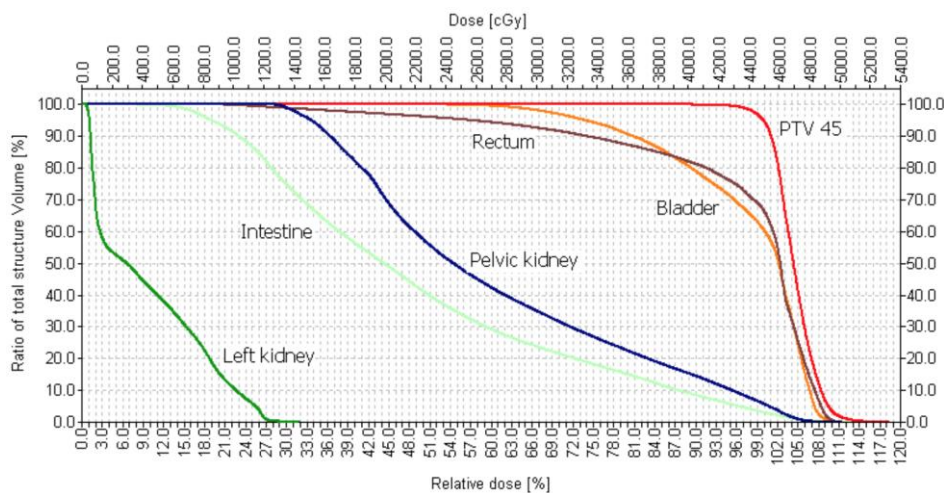


Figure 3.1.3 : Histogramme dose-volume d'une radiothérapie par modulation d'intensité pour le traitement d'un adénocarcinome endométrial avec une dose prescrite de 45 Gy. 100% du PTV reçoit au moins 45 Gy. Les HDV de la vessie, du rectum, des intestins et des reins sont représentés. Un des reins est localisé dans la région pelvienne et est particulièrement à risque. (Castilho et al. 2006).

3.1.1.6. Radiothérapie Synchrotron avec agent de renforcement de dose (SSRT)

Les outils de calcul de dose intégrés aux TPS commerciaux sont spécialisés pour des cas d'utilisation de sources conventionnelles de radiothérapie externe (accélérateurs linéaires), ou des sources implantées dans le cas de curiethérapie. La SSRT comme pratiquée à l'ESRF présente des particularités qui rendent inutilisables les TPS commerciaux pour le calcul de dose :

- l'utilisation d'un faisceau mono énergétique de rayons X de basse énergie ;
- une géométrie de ligne particulière : l'enchaînement de nombreux éléments de la ligne de lumière modifiant le faisceau sur la ligne de traitement avant d'arriver sur le patient ;
- la présence d'un élément lourd injecté dans la tumeur de concentration variable.

Au sein de l'équipe, un outil de calcul de dose pour la SSRT a initialement été développé en 2006 par Caroline Boudou (Boudou 2006). Cet outil utilisait une interface développée avec le langage de programmation IDL et permettait la génération de fichiers d'entrée au code de simulation Monte-Carlo MCNPX. Des travaux d'optimisation de plans de traitement ont été réalisés à l'aide de ce programme dans le cadre de la thèse de Magali Édouard (M. Edouard et al. 2010).

Par ailleurs, en 2009, Manolopoulos et al. ont adapté un TPS appelé NCTPlan basé sur l'algorithme Monte-Carlo MCNP, pour la radiothérapie par augmentation de contraste. Ce TPS était à l'origine développé pour la technique de thérapie par capture de neutrons par le bore, qui est une autre technique de radiothérapie utilisant la prise de contraste. Ce TPS fonctionnait en générant des fichiers d'entrée au code de simulation Monte-Carlo MCNP à partir d'images tomographiques. (Manolopoulos et al. 2009).

Pour les essais cliniques de SSRT avec agent de contraste iodé réalisés à l'ESRF, il a été nécessaire de développer un système de planification de traitement plus sophistiqué et plus complet. En 2011, une version modifiée du logiciel ISOgray a été adaptée par Mathias Vautrin. (Vautrin 2011a) pour une utilisation en SSRT avec agent de contraste iodé.

Dans sa version standard, le logiciel ISOgray permet la planification de traitement pour des accélérateurs linéaires (électrons et photons de haute énergie). Ce logiciel est utilisé en routine clinique dans environ 20% des centres de radiothérapie en France.

ISOgray a été choisi, car il dispose d'un module Monte-Carlo permettant le calcul en géométrie voxelisée. En effet, la méthode de Monte-Carlo est la seule modalité de calcul permettant de bien modéliser les interactions mises en œuvre en SSRT, en tenant compte de l'augmentation de dose liée à la présence d'agent de contraste. (Boudou 2006). Le modèle de calcul utilisé dans cette version d'ISOgray est basé sur le code rapide de simulation Monte-Carlo PENELOPE (Salvat, Fernández-Varea, and Sempau 2009) et permet d'utiliser des fichiers d'espace des phases (PSF).

Un fichier d'espace des phases représente l'état des particules dans le faisceau dans un espace donné (généralement un plan). Cet espace est enregistré dans un fichier, le PSF, qui contient les informations d'un grand nombre de particules et leur état : type (photon, électron ou positon), énergie, position, vecteur directeur. Ce fichier permet de simuler à l'avance le parcours des particules dans les parties de la géométrie qui sont constantes, comme par exemple entre la source et les collimateurs. En utilisant un PSF juste en amont du patient, il ne reste plus qu'à simuler le parcours des particules dans le patient.

Le logiciel ISOgray adapté par Mattias Vautrin utilise des images tomographiques acquises, soit à l'hôpital avec un scanner conventionnel, soit directement dans la cabine de traitement de la ligne ID17 par rayonnement monochromatique. Le logiciel convertit les coefficients d'atténuation déterminés par le contraste des images (unités Hounsfield) pour obtenir les cartes de concentration en iode. Pour réaliser cette étape, deux images sont nécessaires : une image après injection d'un agent de contraste iodé et une image acquise avant injection. La différence d'atténuation entre les deux images permet, grâce à une courbe de calibration, d'obtenir la concentration en iode. On obtient alors une carte de matériaux décomposée en air, os, eau et eau+iode à différentes concentrations en fonction des valeurs d'unités Hounsfield mesurées (Figure 3.1.4).

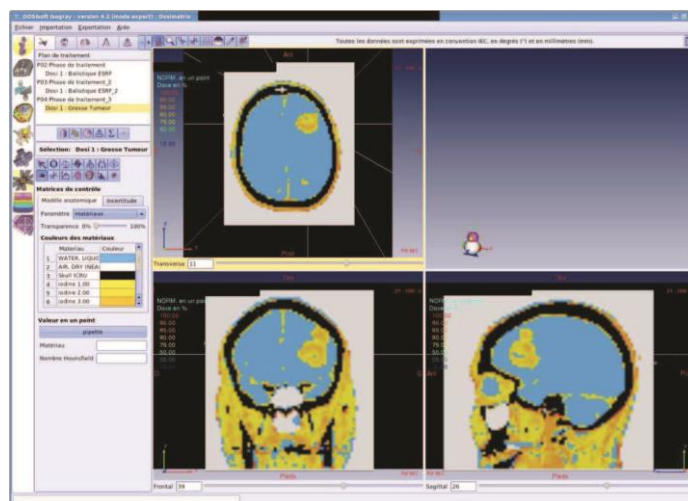


Figure 3.1.4 : Module de dosimétrie du logiciel ISOgray. Un modèle voxelisé du patient représentant les différents matériaux et représenté selon les 3 plans de l'espace. L'eau est représentée en bleu, l'os en noir et les différentes concentrations d'iode sont représentées par un dégradé de jaune. (Vautrin 2011a).

Dans notre étude, nous allons travailler sur le renforcement de dose par les nanoparticules d'oxyde de fer. Dans ce cadre, deux éléments seront injectés dans l'organisme : les nanoparticules d'oxyde de fer et un agent de contraste iodé après le traitement. Le premier agent est utilisé pour l'augmentation de dose nécessaire au traitement radiothérapeutique et le deuxième permet de localiser la tumeur. Les nanoparticules d'oxyde de fer seront injectées soit par voie veineuse, soit par CED en injection intracérébrale. Pour délimiter la tumeur, nous avons choisi d'utiliser l'iode comme agent de contraste. Après injection par voie veineuse, l'iode s'extravase dans l'espace interstitiel tumoral, car la barrière hématoencéphalique est partiellement rompue dans la zone tumorale.

Ces deux éléments auront des distributions différentes, en raison de leurs modalités d'injection de leurs caractéristiques physico-chimiques et des concentrations d'injection. Comme ces deux éléments seront co-localisés dans la tumeur, les images en tomographie vont faire apparaître leur augmentation de contraste conjointement, ce qui empêche de faire un simple seuillage pour déterminer les volumes contenant du fer et de l'iode ainsi que leur concentration. Il faut donc rajouter une étape de séparation des images pour récupérer les informations de localisation du fer et de l'iode. Cette étape nécessite une méthode adaptée de séparation des quantités d'iode, de fer, et des tissus environnants, ce qui permet de déterminer les volumes contenant chaque élément, et la concentration en cet élément. Cette séparation se fait par tomographie quantitative par rayonnement synchrotron. La détermination des concentrations est essentielle pour permettre le calcul de dose puisque la dose est directement liée à cette grandeur.

Le patient est imagé à deux énergies monochromatiques différentes et après traitement de ces images, on obtient des images pondérées en concentration de nos deux éléments, le fer et l'iode de l'agent de contraste. Les nanoparticules de fer injectées en CED restent longtemps dans la tumeur (voir Chapitre 2) tandis que l'agent de contraste iodé ne va rester que quelques dizaines de minutes dans le cerveau. Dans cette étude, seules les nanoparticules de fer injectées avant la radiothérapie serviront à renforcer la dose du traitement, le facteur d'augmentation de dose étant directement lié à la concentration, ainsi qu'à l'énergie des rayons X (Figure 3.1.5).

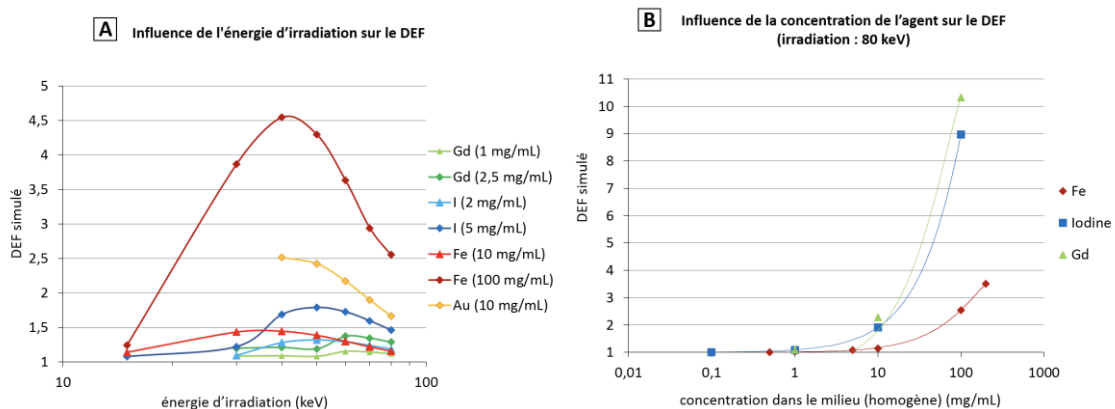


Figure 3.1.5 : (A) Évolution du DEF simulé en fonction de l'énergie d'irradiation pour diverses concentrations de Fe, Au, I ou Gd. Les atomes lourds sont répartis de façon homogène dans le volume considéré. (B) Évolution du DEF simulé en fonction de la concentration des composés dans le milieu. Les incertitudes sur les DEF calculés par simulation sont de l'ordre de 10-3. (Reymond 2018).

3.1.2. Calcul de dose pour le renforcement de dose par nanoparticules

Comme décrit précédemment, la dose est la quantité d'énergie déposée par unité de masse par un rayonnement ionisant. Elle est définie par l'énergie dE (J) déposée localement dans un élément de masse dm (kg) par l'interaction du rayonnement avec la matière. L'unité du système international pour la dose est le Gray (Gy) (Figure 3.1.6).

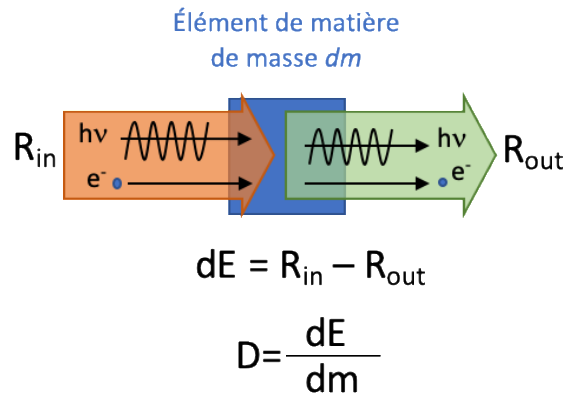


Figure 3.1.6 : La dose D est le dépôt local d'énergie (dE) dans un élément de masse (dm) par les rayonnements ionisants (électrons e^- , photon $h\nu$) interagissant avec la matière. Ce dépôt local d'énergie correspond à la différence entre l'énergie du rayonnement entrant dans l'élément (R_{in}) et l'énergie du rayonnement sortant (R_{out}).

En radiothérapie, on veut obtenir un dépôt de dose maximale dans la tumeur, tout en évitant des complications dans les tissus sains. Il faut donc connaître la dose qui sera déposée dans chacun des organes irradiés. Afin de calculer la dose déposée dans un patient, on utilise des algorithmes de calcul basés sur les mécanismes connus d'interactions des rayonnements.

Plusieurs méthodes de calcul de dose existent. Parmi celles-ci, on distingue les algorithmes basés sur la mesure, dont les calculs sont faits à partir de tables de mesures expérimentales, les algorithmes de convolution-superposition et la méthode de Monte-Carlo. Les premiers sont plus rapides et nécessitent moins de calculs, mais sont moins précis. La méthode de Monte-Carlo est la plus précise, mais nécessite le plus de temps et de ressources en calcul.

Les méthodes basées sur la mesure sont les plus anciennes méthodes de calcul de dose, le calcul pouvant être effectué à la main. Ces méthodes utilisent des tables de données contenant les valeurs de dose mesurées dans un fantôme d'eau avec l'irradiateur utilisé. Afin de prendre en compte les irrégularités de la forme du patient ainsi que les hétérogénéités tissulaires (os et poumons), on applique des facteurs de correction sur la dose calculée à partir de tables. La méthode d'intégration de Clarkson (Shahban et al. 2019) permet de prendre en compte une forme de champ complexe. Elle est basée sur une séparation des contributions à la dose du rayonnement primaire et du rayonnement diffusé. Cette dose est calculée à partir de tables de facteurs correctifs mesurés expérimentalement. Ces tables prennent en compte la qualité du faisceau et la taille du champ (scatter air ratio). Ces méthodes ont rapidement été intégrées dans les TPS, cependant elles restent très approximatives dans les situations présentant des hétérogénéités ou des champs irréguliers.

Les **algorithmes de convolution et de superposition** constituent une autre méthode de calcul de dose. Ces algorithmes utilisent un *kernel* basé sur l'énergie diffusée à partir du point d'interaction du rayonnement primaire. Pour calculer l'énergie déposée en un point P, il faut intégrer l'énergie émise par tous les points P' autour de P. L'énergie émise par chaque point P' et déposée en P est le produit de la fluence de photons primaires en P' par l'énergie diffusée atteignant P.

Parallèlement aux méthodes de calcul analytiques, les **algorithmes de Monte-Carlo** ont commencé à se développer. La méthode de Monte-Carlo vise à calculer une valeur numérique approchée en utilisant des fonctions aléatoires. Les phénomènes de transport de particules sont de nature aléatoire, ce qui les rend particulièrement adaptées au calcul Monte-Carlo. En multipliant le nombre de simulations de trajectoires des particules, on peut obtenir une bonne estimation de l'énergie déposée dans un volume déterminé. Cette méthode demande beaucoup de temps de calcul pour obtenir des résultats fiables, mais elle permet de prendre en compte facilement les hétérogénéités. Avec les progrès des puissances de processeurs, des TPS basés sur la méthode Monte-Carlo commencent à voir le jour en clinique, même si certaines approximations sur le parcours des électrons sont encore nécessaires pour accélérer le temps de calcul. C'est la méthode de référence pour valider les autres algorithmes, ainsi que pour calculer les *kernels* des algorithmes de convolution- superposition.

La méthode de Monte-Carlo est la meilleure méthode permettant de modéliser les interactions ayant lieu en radiothérapie par renforcement de dose avec des nanoparticules. En effet, les algorithmes basés sur la mesure et les algorithmes de convolution/superposition donnent des résultats imprécis lorsqu'il y a des hétérogénéités dans le milieu, comme c'est le cas en présence des nanoparticules.

Il existe 4 algorithmes généraux qui sont principalement utilisés pour la planification de traitement (Reynaert et al. 2007) : MCNP, EGS, PENELOPE et GEANT4. Tous ces codes modélisent les mêmes lois physiques avec des approximations différentes.

Nous avons choisi d'utiliser la plateforme GATE (*GEANT4 application for tomographic emission*). GATE est une plateforme initialement développée pour les simulations en médecine nucléaire, mais s'est améliorée pour permettre des applications en radiothérapie et tomographie par rayons X. Cet algorithme est basé sur l'utilisation de macros permettant une utilisation plus simple de l'algorithme GEANT4 du CERN. (Jan et al. 2011; Sarrut et al. 2014). GEANT4 gère le noyau de simulation des interactions des particules et GATE fournit des fonctionnalités de haut niveau pour faciliter la prise en main et la conception d'applications médicales.

GATE permet la gestion des volumes tomographiques et peut utiliser des listes de données physiques différentes. Cette application offre de nombreux avantages, entre autres, la possibilité d'utiliser des outils de réduction de variance. De plus, étant initialement créée pour l'imagerie, elle est adaptée pour les rayonnements de basse énergie.

Cette plateforme a notamment été utilisée dans des études préliminaires pour calculer la dose déposée lors des acquisitions tomographiques d'images cérébrales chez le

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

rongeur par rayonnement synchrotron (Figure 3.1.7) (Rosuel et al. 2018) (Mittone et al. 2013).

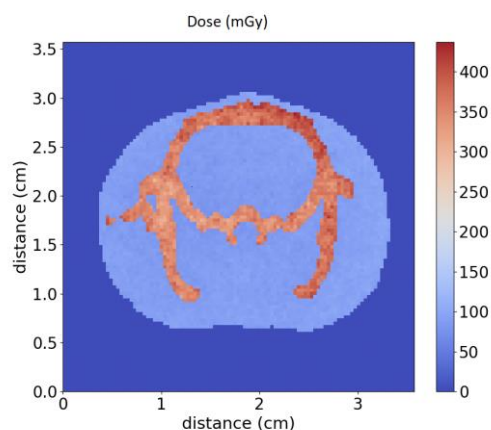


Figure 3.1.7 : Carte de la dose déposée dans le cerveau d'un rat lors d'une acquisition en tomographie synchrotron ; d'après (Rosuel et al. 2018). La coupe axiale représentée est celle du centre du volume exploré dans la direction « museau-queue ». Simulation réalisée avec le code de calcul GATE.

Lors de cette étude, la dose a été calculée pour les images acquises par tomographie synchrotron soit en atténuation soit en contraste de phase. Une méthode de réduction de variance, le TLE (*Track length estimator*), basé sur l'hypothèse du dépôt local de la dose, a été utilisée.

Le TLE est basé sur 2 principes

- Premièrement la perte d'énergie des photons n'est pas considérée comme ponctuelle (au point d'interaction), le photon perd une part égale de son énergie dans chaque voxel de sa trajectoire.
- Deuxièmement, on ne suit pas le parcours des électrons secondaires.

Pour utiliser cette technique, il faut que les conditions d'expériences remplissent 2 critères : la diffusion des photons doit être négligeable par rapport à l'absorption dans les tissus et la taille des voxels doit être supérieure au parcours des électrons (Mittone et al. 2013). Comme on travaille avec des photons de basse énergie (< 100 keV), les critères sont compatibles avec notre utilisation. En réduisant la variance sur les doses estimées, on peut obtenir la même incertitude, avec moins de simulation de particules. Cette méthode permet de réduire considérablement le temps de calcul.

Les conditions d'irradiation et de dosimétrie sont les mêmes que dans cette étude, il est donc aisé d'adapter le code pour nos besoins. Par ailleurs, Spiga et al. ont réalisé des simulations de l'augmentation de dose sur fantômes en utilisant le code GEANT4. Les résultats des simulations étaient en accord avec les mesures expérimentales. (Spiga et al. 2019).

3.2. Étude de la biodistribution par tomographie synchrotron à 2 énergies

3.2.1. Étude sur fantôme

Dans cette première partie, nous allons étudier la distribution des nanoparticules d'oxyde de fer dans nos conditions de traitement. Pour cela, nous commencerons par l'étude des mesures de la concentration des nanoparticules par tomographie sur fantôme afin de valider nos mesures. Ensuite, nous appliquerons notre méthode sur un groupe de rats ayant reçu des nanoparticules dans le cerveau par CED.

3.2.1.1. Matériel et méthodes

3.2.1.1.1. Algorithme de séparation des éléments

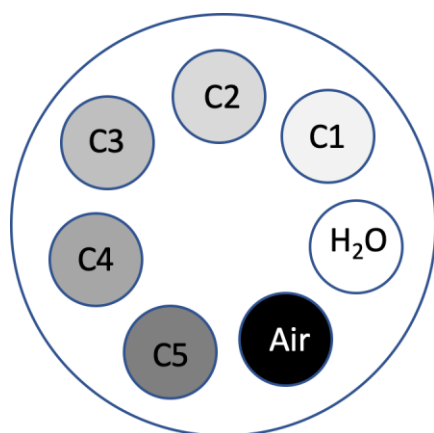
L'utilisation de faisceaux monoénergétiques permet de construire des images dont l'intensité est proportionnelle au coefficient d'atténuation μ des matériaux traversés. Une fois les projections acquises, il faut reconstruire le volume pour obtenir les coefficients d'atténuation à 2 énergies différentes, pour finalement récupérer les images des 3 matériaux composant le volume. Cette méthode a été détaillée dans la section 2.4.1.3.

3.2.1.1.1.1. Étude sur fantômes

L'algorithme de séparation des éléments pour les acquisitions à 2 énergies a d'abord été testé sur deux fantômes. Ces fantômes ont été imagés à deux temps expérimentaux distincts (Tableau 3.2.1). Dans les deux cas, un détecteur germanium a été utilisé.

Les deux fantômes utilisés dans cette étude sont les suivants :

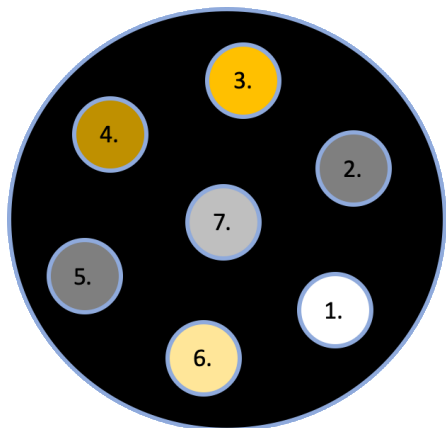
- Fantôme 1 : Un cylindre de polyéthylène de 4,2 cm de diamètre, rempli d'eau et contenant 7 tubes de polyéthylène de 1 cm de diamètre avec une paroi de 1 mm. Chaque tube contient une solution de nanoparticules d'oxyde de fer à différentes concentrations provenant d'une solution mère de 25 mg/mL de Fe_3O_4 , soit 18,1 mg/mL de Fe (Figure 3.2.1). L'incertitude sur la concentration initiale a été estimée à 5% par le préparateur.



Tube	[Fe_3O_4] (mg/mL)	[Fe] (mg/mL)
H ₂ O	0,0	0,0
C1	1,6	1,1
C2	3,1	2,2
C3	6,3	4,5
C4	12,5	9,0
C5	25,0	18,1

Figure 3.2.1 : Fantôme d'eau et de nanoparticules d'oxyde de fer à différentes concentrations. Le fantôme est rempli d'eau et chaque tube contient un mélange différent. Les concentrations en nanoparticules d'oxyde de fer sont indiquées dans le tableau de droite ainsi que la concentration équivalente en élément fer. Les tubes Air et H₂O contiennent respectivement de l'air et de l'eau.

- Fantôme 2 : un cylindre de 5,4 cm en polyéthylène, rempli d'air contenant 7 tubes en polyéthylène de 6 mm de diamètre avec 1 mm de paroi, remplis avec différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer et d'iode sous forme d'agent de contraste (Ioméron®) dans de l'eau (Figure 3.2.2).



Tube	[Fe] (mg/mL)	[I] (mg/mL)
1	0,0	0,0
2	1,8	0,0
3	0,0	4,0
4	0,9	2,0
5	1,8	0,0
6	0,0	2,0
7	0,9	0,0

Figure 3.2.2 : Fantôme contenant des tubes contenant une solution aqueuse d'iode et de fer de concentrations connues. La couleur jaune indique des concentrations croissantes d'iode et le gris indique des concentrations croissantes de fer. Les concentrations d'iode et de fer sont indiquées dans le tableau.

Les solutions de nanoparticules de fer sont préparées à partir d'une solution mère de nanoparticules d'oxyde de fer de 25 mg/mL, fournies par l'équipe de JK Kim de l'Université de Daegu (Corée du Sud) et les solutions d'iode sont préparées à partir d'une préparation commerciale d'Ioméron® à la concentration de 350 mg/mL. La précision des mesures sera estimée par l'écart-type associé à la mesure dans une région d'intérêt. La préparation de la solution mère de nanoparticules de fer est décrite dans la section 2.2.2.1.

Le tableau 3.2.1 résume les conditions d'acquisition de la tomographie pour chacun des deux fantômes.

Paramètres		
Objet	Fantôme 1 de nanoparticules de fer	Fantôme 2 de NP de fer et d'iode
Énergie (keV)	32,0 et 33,5	31,0 et 35,0
Nombre de projections	1024	1024
Nombre de coupes	60	1
Dimensions de l'image (pixels)	432 x 432	432 x 432
Résolution horizontale (mm)	0,337	0,337
Résolution verticale (mm)	0,5	0,5
Dose à l'entrée (Gy)	0,18 et 0,16	0,20 et 0,14

Tableau 3.2.1 : Paramètres d'acquisition des fantômes 1 et 2 pour la tomographie à 2 énergies.

Pour le Fantôme 1, la mesure des coefficients d'atténuation a été faite sur la moyenne mesurée dans une région d'intérêt cylindrique de 15 pixels de hauteur et une surface de 430 pixels. Afin d'évaluer l'effet de la sédimentation, une comparaison des mesures sur

chaque coupe sur toute la hauteur du tube a également été faite (26 coupes). Dans chaque coupe la valeur moyenne dans une région d'intérêt de 430 a été utilisée pour la mesure.

Pour le Fantôme 2, seule une coupe a été acquise. La mesure des coefficients d'atténuation a été déterminée par la mesure dans une région d'intérêt circulaire de 80 pixels pour chaque tube.

3.2.1.2. Validation du modèle biénergie par mesures sur fantômes

- Fantôme 1 : nanoparticules d'oxyde de fer et eau

Un premier fantôme contenant des concentrations croissantes de fer a été imagé par tomographie synchrotron de part et d'autre du K-edge de l'iode (33,17 keV), puis l'image des concentrations de fer a été obtenue. Les coefficients d'atténuation linéiques de l'eau, mesurés aux deux énergies, ont été utilisés pour calibrer l'énergie. Cela nous a permis de corriger l'énergie au-dessus du seuil K de l'iode qui a été évalué à 33,5 keV au lieu de 34,0 keV. Les images acquises sont représentées dans la Figure 3.2.3.

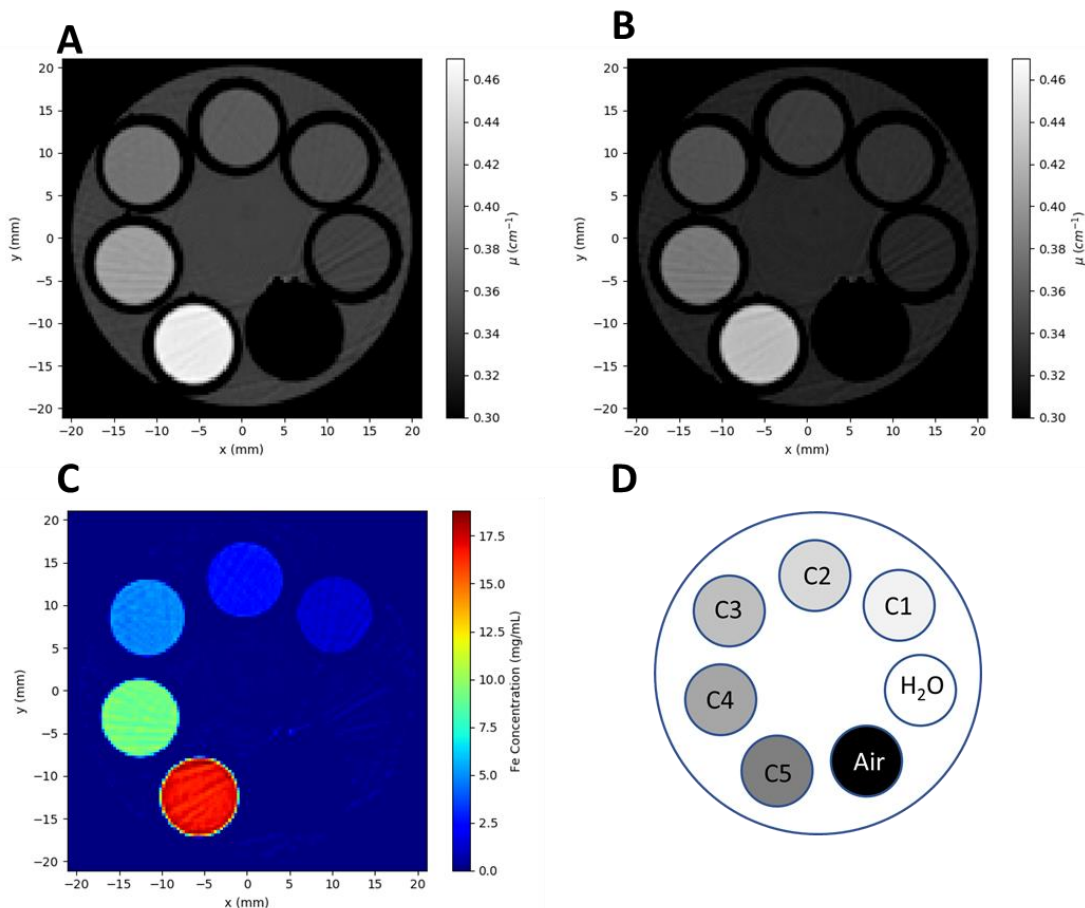


Figure 3.2.3 : Fantôme composé d'un mélange de nanoparticules d'oxyde de fer et d'eau. A. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 32,0 keV. B. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 33,5 keV. C. Image de la concentration du fer. D. Schéma du fantôme. Les concentrations nominales sont détaillées dans le Tableau 3.2.2.

La Figure 3.2.4 représente la moyenne des coefficients d'atténuation linéiques μ mesurés dans une région d'intérêt de 1000 voxels dans chaque tube en fonction de la

concentration en fer théorique pour les 2 énergies. On observe un excellent accord ($R^2 = 0,98$) seule la mesure de la concentration la plus élevée de 18 mg/mL de fer présente un écart de 1,8% par rapport à la valeur théorique.

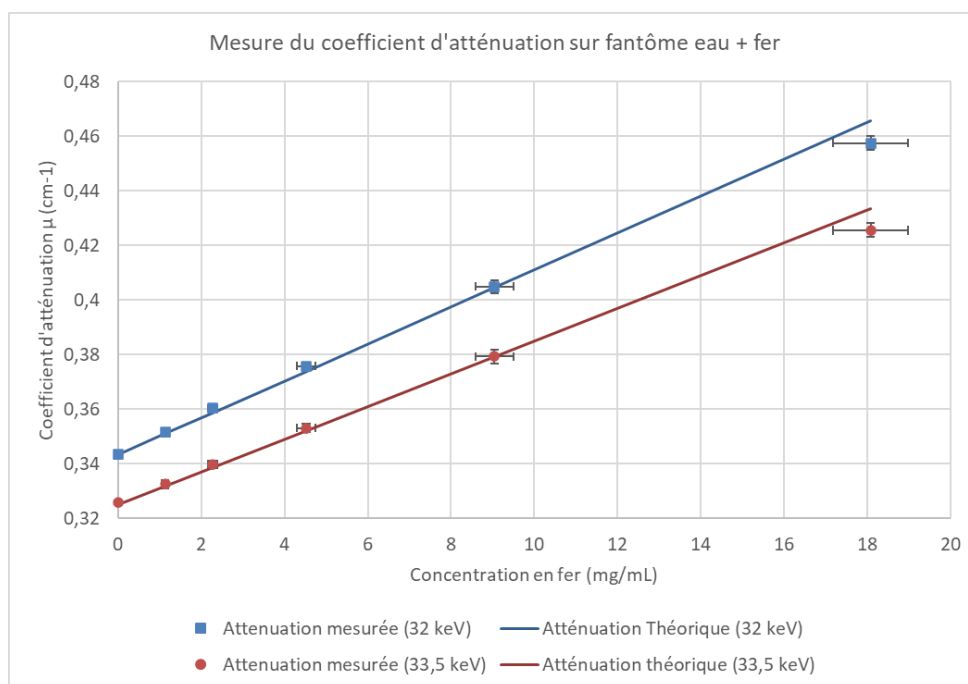


Figure 3.2.4 : Mesure du coefficient d'atténuation en fonction de la concentration de fer théorique pour les énergies en dessous (32 keV, bleu) et au-dessus (33,5 keV, rouge) du K-edge de l'iode. Les barres d'erreur verticales représentent l'écart-type des mesures sur la région d'intérêt. Les barres horizontales représentent l'incertitude sur la concentration et ont été estimées à 5%.

Les concentrations mesurées dans le fantôme sont détaillées dans le Tableau 3.2.2. La différence relative entre la mesure et la valeur théorique est inférieure l'écart-type de la mesure pour les concentrations inférieures à 10 mg/mL. Pour la concentration la plus élevée, une différence relative de 7% est observée. Cette différence peut s'expliquer par la présence d'harmoniques dans le faisceau qui bien que présente en petite quantité (de l'ordre du 1%) affecte les mesures quand les concentrations sont élevées (Elleaume et al 2002). La sédimentation des nanoparticules observées dans ce tube peut également être responsable de cette différence.

Échantillon	Valeur nominale (mg/mL)	Valeur mesurée \pm sigma (mg/mL)	Écart-type relatif (%)	Différence relative (%)
H2O	0,00	0,07 \pm 0,14	-	-
C1	1,13	1,24 \pm 0,24	19	10
C2	2,26	2,48 \pm 0,22	9	10
C3	4,52	4,75 \pm 0,21	5	5
C4	9,05	9,08 \pm 0,38	4	< 1
C5	18,09	16,83 \pm 0,39	2	-7

Tableau 3.2.2 : Concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer mesurées dans le fantôme 1 par tomographie à deux énergies. L'écart-type (sigma) est mesuré dans la région d'intérêt. La différence relative correspond à la différence entre la valeur mesurée et la valeur nominale de la concentration, divisée par la valeur nominale. L'écart-type relatif est défini comme étant l'écart-type de la mesure divisé par la valeur moyenne.

La Figure 3.2.5 montre la mesure du coefficient d'atténuation linéique du mélange le plus concentré en nanoparticules d'oxyde de fer, selon la profondeur dans le tube de plus grande concentration. Nous n'avons pas observé de sédimentation dans les autres tubes.

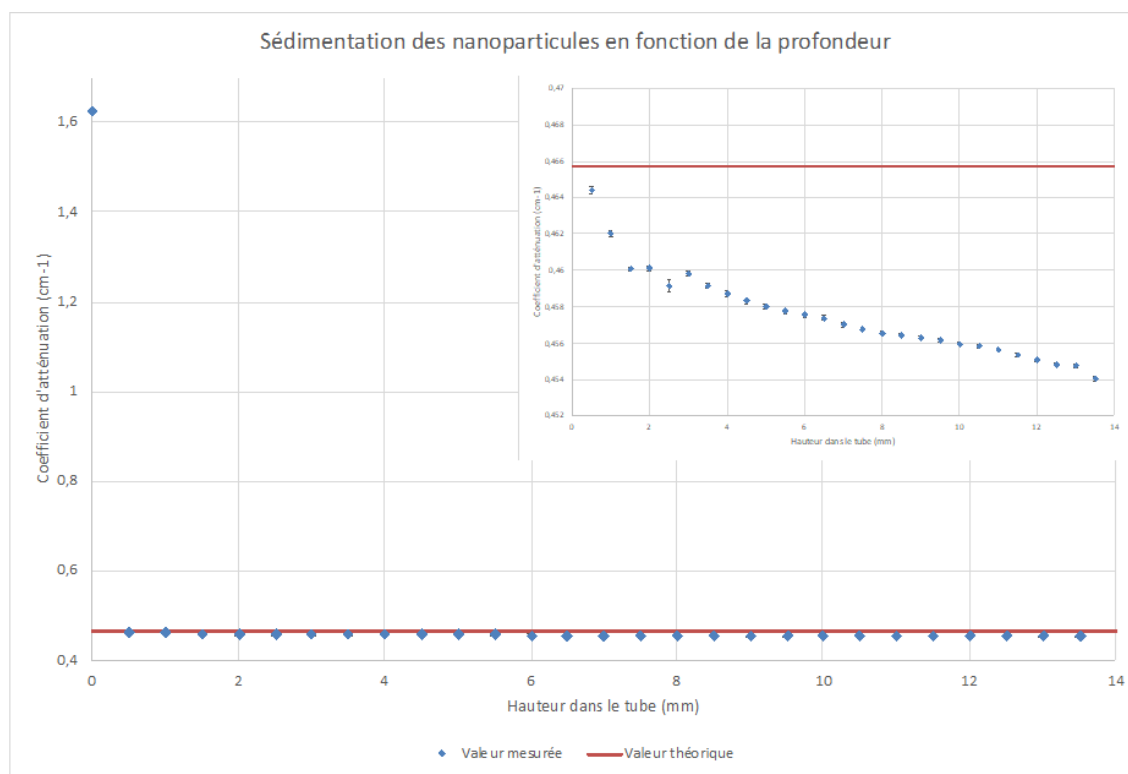


Figure 3.2.5 : Évaluation de la sédimentation des nanoparticules dans le tube à 18 mg/mL de fer par la mesure des coefficients d'atténuation à 32 keV en fonction de la profondeur. La première coupe a un coefficient d'atténuation très élevé par rapport aux autres coupes. L'encart montre un agrandissement du graphique entre les valeurs de coefficients d'atténuation de 0.45 et 0.47.

- Fantôme 2 : nanoparticules d'oxyde de fer/iode/eau :

Le second fantôme a permis de valider le système d'extraction des concentrations de fer et d'iode. Les images d'iode et de fer sont représentées sur la Figure 3.2.6 et les concentrations des différentes solutions sont détaillées dans le Tableau 3.2.3 et la Figure 3.2.7. Sur les images, on identifie correctement les tubes contenant du fer et de l'iode. On observe une erreur relative élevée autour de 38% dans la mesure de la concentration d'iode qui est constante sur toutes les mesures. On observe aussi que les concentrations de fer ont moins de 5% d'écart avec les valeurs théoriques dans le milieu ne contenant que du fer et de l'eau, ce qui reste dans l'incertitude de la concentration de la solution mère de nanoparticules de fer. Les différences relatives entre les mesures et les valeurs théoriques de concentrations de fer, dans le cas d'un mélange eau, iode et nanoparticules de fer sont plus élevés et atteignent 20%.

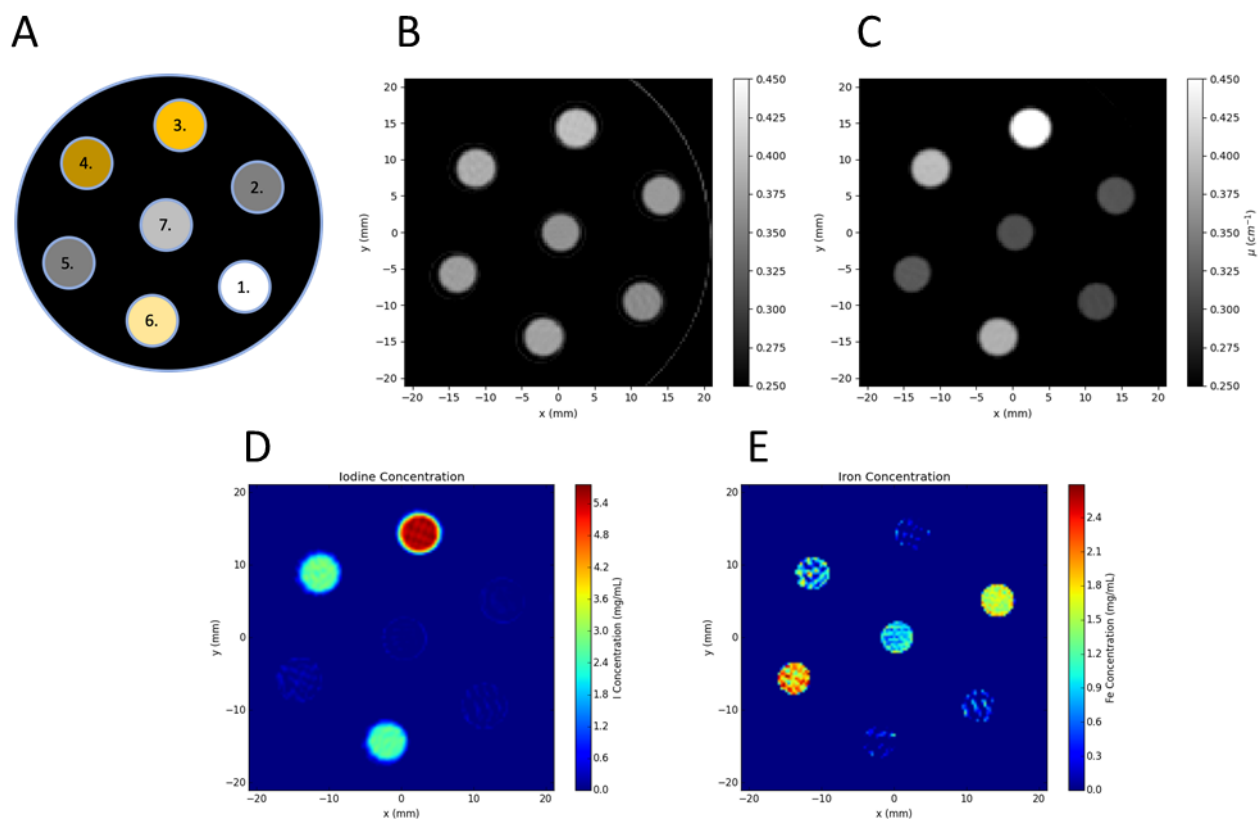


Figure 3.2.6 : Fantôme composé d'un mélange de nanoparticules d'oxyde de fer, d'iode et d'eau. A. Schéma du fantôme avec l'iode représenté en jaune et le fer en gris. B. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 31 keV. C. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 35 keV. D. Image de la décomposition en iode. E. Image de la décomposition en fer. Les concentrations nominales sont détaillées dans le Tableau 3.2.3.

	Fer	Iode	Fer		Iode	
	Concentration nominale (mg/mL)	Concentration nominale (mg/mL)	Concentration mesurée (mg/mL)	Différence relative (%)	Concentration mesurée (mg/mL)	Différence relative (%)
1	0,0	0	$7,42 \times 10^{-3}$	-	$2,66 \times 10^{-2}$	-
2	1,8	0	1,56	13,8	$3,16 \times 10^{-2}$	-
3	0,0	4	$2,57 \times 10^{-1}$	-	5,54	38,5
4	0,9	2	1,09	20,5	2,73	36,5
5	1,8	0	1,83	1,2	$1,05 \times 10^{-1}$	-
6	0,0	2	$2,36 \times 10^{-2}$	-	2,62	31,0
7	0,9	0	$8,76 \times 10^{-1}$	3,2	$9,79 \times 10^{-3}$	-

Tableau 3.2.3 : Concentrations de fer et d'iode mesurées par la méthode de tomographie à deux énergies réalisées à 31 et 35 keV. La mesure représente la moyenne dans chaque tube (N=80 pixels).

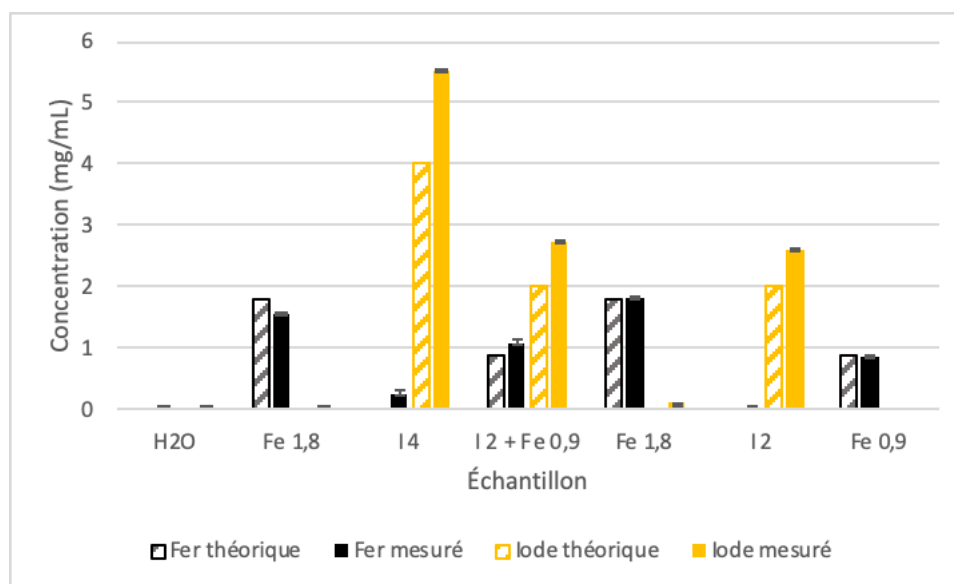


Figure 3.2.7 : Graphiques des concentrations de fer et d'iode mesurées par tomographie quantitative pour chaque échantillon du fantôme 2. Les concentrations nominales des échantillons sont indiquées en mg/mL.

Ces essais nous ont permis de mettre en place la méthode de séparation à 2 énergies. Les écarts sur la valeur mesurée de l'iode sont larges, mais constants. Cela peut être dû à une erreur d'estimation de la concentration nominale. Sous sa forme commerciale (Iomeron® 350), l'iomeprol est très visqueux ce qui peut engendrer des erreurs lors de la dilution de l'échantillon. Une mesure par ICP-MS, par exemple, aurait pu nous permettre de vérifier les concentrations nominales, mais n'a pas pu être réalisée. Dans notre expérience, comme la mesure de l'iode sert uniquement à déterminer le volume tumoral, une estimation de la concentration relative est suffisante.

3.2.2. Étude préclinique

3.2.2.1. Matériel et méthodes

Les expériences *in vivo* ont été menées sur 8 rats Fischer porteurs de tumeurs F98, neuf jours après l'implantation des tumeurs, comme décrits précédemment (voir Section 2.2.2). Trois heures avant l'acquisition des images biénergies, les animaux ont reçu une infusion intracérébrale de nanoparticules d'oxyde de fer par la méthode CED. Ils ont reçu le traitement de radiothérapie, puis 15 min avant l'acquisition des images biénergies, ils ont reçu une injection d'iode par voie intraveineuse. Les paramètres de l'expérience sont résumés dans le Tableau 3.2.4.

Les images tomographiques des rats ont été acquises, puis reconstruites par la méthode de rétroprojection filtrée. Les images de concentration de fer et d'iode ont ensuite été obtenues à l'aide de l'algorithme de séparation des éléments précédemment décrit. Une fois les images de concentration de fer et d'iode obtenues, les volumes correspondants au fer et à l'iode ont été segmentés à la main, à l'aide du logiciel Isogray, en prenant un seuil de 2 mg/mL pour le fer et de 0,45 mg/mL pour l'iode correspondant à 3 fois l'écart-type de la mesure dans le milieu sans éléments. La moyenne des concentrations a ensuite été déterminée dans le volume segmenté.

Paramètres de l'expérience		
Animaux	Espèce	Rat Fischer
	Tumeur	F98 (glioblastome)
	Nombre	8
Nanoparticules Fe ₃ O ₄	Concentration de fer	18 mg/mL
	Volume injecté	20 µL
	Mode d'injection	CED intracérébrale
	Débit d'injection	1 µL/min
Agent de contraste iodé ioméprol (Ioméron®)	Concentration d'iode	400 mg/mL
	Volume injecté	1 mL
	Mode d'injection	Intraveineuse veine caudale
Tomographie	Énergie d'acquisition	32,0 keV et 33,5 keV
	Nombre de projections	1024
	Nombre de coupes	32
	Dimension de l'image	432 x 432 pixels
	Résolution horizontale	0,337 mm
	Résolution verticale	0,500 mm

Tableau 3.2.4 : Conditions de l'expérience préclinique de mesure de concentrations d'iode et de fer.

3.2.2.2. Mesures de concentration et de volumes in vivo

Huit rats ont reçu une injection de nanoparticules d'oxyde de fer par la méthode *CED*, sous la forme de 20 µL d'une solution de Fe₃O₄ à 32 mg/mL de fer avec une vitesse d'injection de 1µL/min, 3h avant la radiothérapie. Les rats ont été imagés à l'énergie d'irradiation (33,5 keV) avant la radiothérapie pour permettre leur positionnement. Après le traitement de radiothérapie, les animaux ont reçu une injection d'ioméprol de 1 mL à 350 mg/mL ainsi que 0,25 mL de sérum physiologique et ont été imagés une seconde fois par tomographie à 2 énergies pour quantifier les différents éléments. Ces images servent à délimiter et déterminer la quantité de fer dans la région tumorale (Figure 3.2.8).

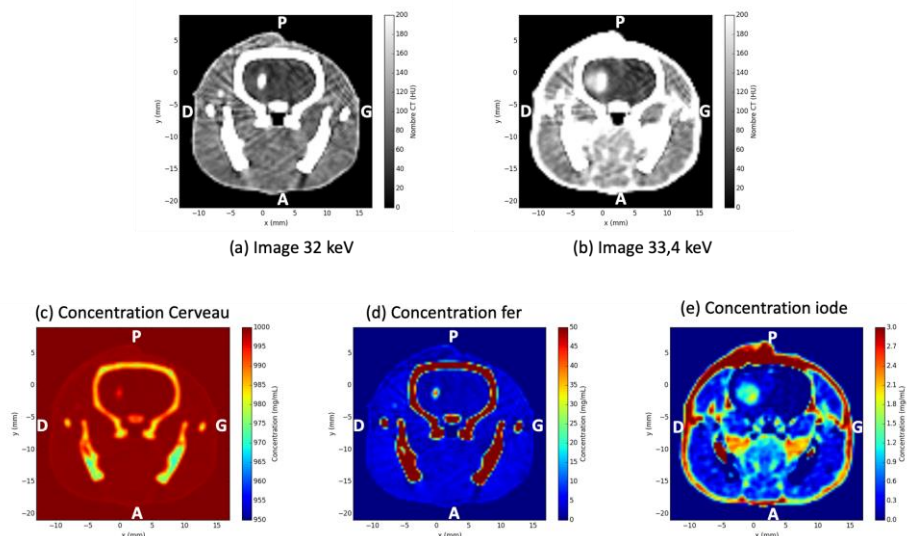


Figure 3.2.8 : Images tomographiques d'un cerveau de rat porteur d'une tumeur F98. Les images ont été acquises à 32,0 keV (a) et à 33,5 keV (b) de part et d'autre du K-edge de l'iode. Les fractions volumiques des différents composants ont été extraites avec l'algorithme de soustraction à deux énergies : la concentration du cerveau (c), des nanoparticules d'oxyde de fer (d) et de l'agent de contraste (e).

Plusieurs paramètres ont été mesurés : le volume de distribution des nanoparticules de fer, le volume tumoral déterminé par le volume d'iode, la concentration moyenne, la masse de fer totale, le taux de rétention du fer dans le cerveau et le taux de recouvrement des volumes de fer et les volumes tumoraux. Le taux de rétention du fer dans le cerveau au moment du traitement est calculé en faisant le rapport entre la masse de fer mesurée et la masse de fer injectée. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 3.2.5.

	Volume Fe (mm ³)	Volume tumoral (mm ³)	Conc. fer Moyenne (mg/mL)	Masse fer (µg)	Rétention fer (%)	Recouvrement (%)
Rat 1	10,9	3,3	8,5	120	19%	7%
Rat 2	10,5	1,8	17,0	196	31%	0%
Rat 3	10,1	6,2	21,0	273	43%	62%
Rat 4	12,2	15,5	19,2	285	45%	37%
Rat 5	10,5	5,6	21,3	264	41%	55%
Rat 6	10,5	9,4	17,7	247	39%	39%
Rat 7	12,9	18,5	13,7	219	34%	25%
Rat 8	10,8	14,8	23,6	305	48%	35%
Moy.	11,4 ± 1,3	6,9 ± 5,1	17,7 ± 5,7	242 ± 65	38 ± 10	30 ± 21

Tableau 3.2.5 : Tableau récapitulatif avec les répartitions de fer dans les cerveaux de rats porteurs de tumeurs F98 (n=8), ayant reçu une injection de nanoparticules par CED. Les moyennes (moy.) du groupe sont également déterminées ainsi que les écarts-types.

On obtient une excellente décomposition en trois éléments, permettant d'observer que la distribution de nanoparticules de fer est homogène avec un volume de fer très semblable d'un rat à l'autre ($11,4 \pm 1,3 \text{ mm}^3$). Notons que l'os ne peut être discriminé des autres éléments (tissus, iode et fer) puisque seulement deux énergies ont été utilisées, mais la connaissance *a priori* de son architecture permettrait de le séparer si nécessaire. Le volume moyen mesuré de distribution des nanoparticules est plus faible que les volumes de distribution mesurés précédemment après injection d'agents de contraste. Des expériences similaires réalisées avec du gadolinium ou de l'iode avaient conduit à un volume de diffusion 4 fois plus grand que le volume injecté. (Taupin et al. 2015; Julia Rousseau et al. 2007). Cette distribution correspond à une distribution des agents de contraste majoritairement dans le volume interstitiel du tissu cérébral, qui représente environ 25% du volume total. La nature, sous forme de nanoparticules, de l'agent injecté au cours de notre étude, modifie significativement sa distribution par rapport aux agents moléculaires, ce qui était attendu. Dans notre étude, les volumes tumoraux sont assez variables ($6,9 \pm 5,1 \text{ mm}^3$). Du fait de cette variabilité, le taux de recouvrement est également très variable ($30 \pm 21 \%$).

Un groupe de 4 animaux a été sélectionné et la répartition des concentrations de nanoparticules de fer a été étudiée dans ce groupe. La Figure 3.2.9 représente les histogrammes de concentration de fer dans le volume tumoral délimité par la région d'intérêt contenant l'agent de contraste iodé sur les images tomographiques. Les histogrammes ont un profil très similaire chez les 4 animaux. On observe un pic de concentration à 8 mg/mL en moyenne. On observe également que le maximum de concentration est de 240 mg/mL. Ces concentrations sont très élevées par rapport à la concentration injectée qui vaut 32 mg/mL. Cette concentration des nanoparticules

indique que soit les nanoparticules s'agrègent, soit elles pénètrent dans les cellules et s'accumulent. Ce comportement est très différent des distributions observées pour les éléments comme l'iode ou le gadolinium. Pour ces agents de contraste, on observait des concentrations divisées par 4 par rapport à la concentration injectée correspondant au volume partiel lors d'une distribution dans l'espace interstitiel du tissu cérébral.

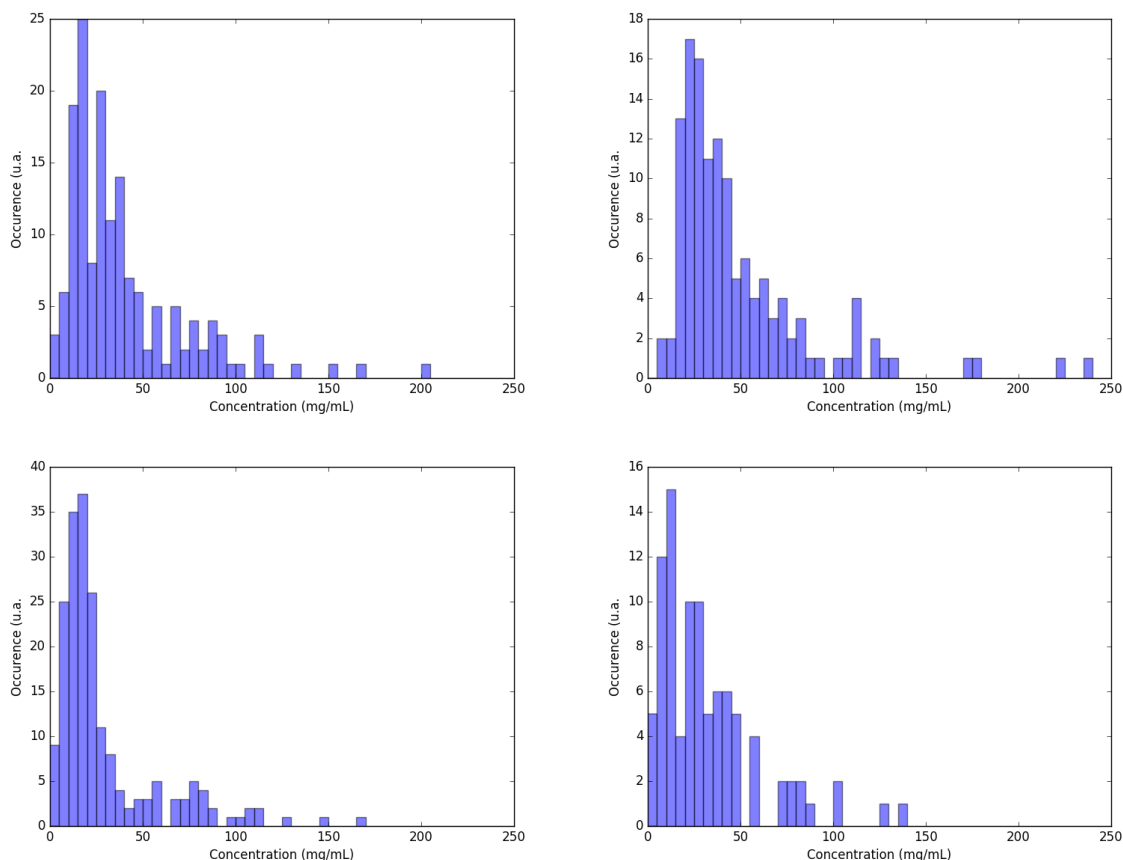


Figure 3.2.9 : Histogrammes de concentration en fer dans le volume de distribution chez 4 animaux traités par injection en CED de 18 mg/mL de nanoparticules.

3.3. Calcul de Dose

Dans cette partie nous allons étudier l'impact des nanoparticules de fer sur la dose absorbée en fonction de leur distribution et de leur concentration.

3.3.1. Méthodologie pour le calcul de dose pour la planification de traitement.

La méthode de calcul utilisée et les conditions de modélisation seront tout d'abord présentées. Puis nous détaillerons les conditions expérimentales étudiées et enfin les méthodes d'analyses pour étudier les distributions de dose.

3.3.1.1. Calcul de dose par simulation Monte-Carlo avec Gate

Comme indiqué précédemment, les calculs de dose ont été réalisés avec le code de calcul GATE (Geant4 Application for Emission Tomography).

GATE est une encapsulation de Geant4 spécialisée dans les applications médicales des rayonnements ionisants (Sarrut et al. 2014). Initialement développé pour la modélisation de la scintigraphie, cet outil permet aujourd'hui de nombreuses applications notamment pour la radiothérapie externe, avec une interface par *macro* ou lignes de commandes, ce qui permet une plus grande facilité d'utilisation sans nécessité de connaître la programmation en C++. Le noyau de GEANT4 est encapsulé par plusieurs couches. La première couche gère la définition de la géométrie et des sources, et la gestion des processus physiques nécessaires aux simulations. La deuxième couche permet d'implémenter les objets issus des besoins spécifiques d'imagerie et de radiothérapie. Enfin, la couche utilisateur permet d'accéder à l'application par des scripts en lignes de commande (Figure 3.3.1).

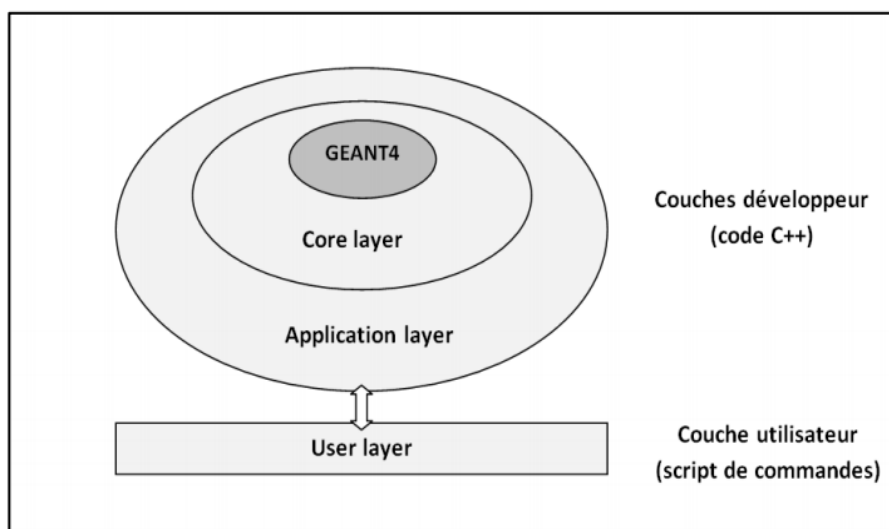


Figure 3.3.1 : Architecture de GATE en trois couches (Perrot 2011)

GEANT4 gère les processus physiques par des objets qui décrivent quand et comment une interaction physique se produit le long de la trajectoire de la particule. Ces interactions sont régies par des modèles physiques. Ces modèles reposent sur des bases de données contenant les sections efficaces des différentes interactions possibles pour chaque rayonnement, chaque matériau, à chaque énergie. Pour les rayonnements électromagnétiques, GATE gère 4 modèles physiques, les modèles : Standard, Livermore, Livermore polarisé et PENELOPE.

Le modèle Standard a été développé pour les besoins de la physique à haute énergie du LHC (*Large Hadron Collider*). Ce modèle offre de meilleurs temps de calcul, mais il est moins précis pour les basses énergies (< 1 GeV).

Les modèles Livermore et PENELOPE sont appelés modèles de basse énergie. En plus des interactions physiques des photons avec la matière, les modèles de basse énergie prennent aussi en compte la relaxation des couches électroniques et des atomes (fluorescence, électrons Auger, relaxation atomique). Une version de Livermore prenant en compte les faisceaux polarisés (*Livermore Polarized*) est aussi incluse. Comme le rayonnement du faisceau synchrotron est polarisé, nous allons utiliser le modèle Livermore Polarized dans notre étude.

3.3.1.2. Recalage des images

Comme indiqué précédemment, les animaux traités par radiothérapie ont été imagés en tomographie monoénergie avec seulement des nanoparticules d'oxyde de fer avant le traitement pour ne pas influencer l'augmentation de dose en ajoutant de l'iode. Après le traitement les rats ont reçu une injection de 1 mL de ioméprol (400 mg/mL), par la veine caudale suivie d'un bolus de 1mL de sérum physiologique, puis ils ont été imagés par tomographie à deux énergies. Un recalage des volumes avant et après traitement a été réalisé pour déterminer le volume de la tumeur effectivement irradié.

Un recalage rigide (sans déformation) a été réalisé avec le logiciel Isogray. Une maximisation du recouvrement de la région d'intérêt du crâne a été appliquée. L'image recalée est ensuite interpolée pour créer la même image avec les voxels correspondant à l'image de référence.

3.3.1.3. Détermination des régions d'intérêt

Les premiers volumes déterminés sont les « volumes naturels » de l'animal. Trois régions d'intérêt ont été définies, le cerveau, l'os du crâne et les tissus mous extérieurs. Un premier seuillage a été effectué sur les coefficients d'atténuation à $0,3 \text{ cm}^{-1}$ pour segmenter un contour extérieur de l'animal. Le volume intérieur a été attribué à du tissu mou. Ensuite, l'os a été déterminé avec un seuil de $0,5 \text{ cm}^{-1}$. Le cerveau est défini comme correspondant au volume de tissu mou se trouvant à l'intérieur du crâne.

L'utilisation de fantôme dans la section 3.2.1.2 nous a permis de déterminer l'incertitude statistique pour les différentes mesures de concentrations de fer et d'iode. Pour déterminer les régions d'intérêt, nous avons utilisé un seuil égal à trois fois la valeur de l'écart-type des concentrations mesurées dans le cerveau controlatéral. Nous avons isolé le plus gros volume détecté dans le volume du cerveau pour chaque concentration. En effet, on peut supposer que les nanoparticules se distribuent dans un seul volume, ce qui est validé par l'observation des images.

La détermination des régions d'intérêt a été effectuée grâce à l'application Isogray. Cette application a aussi permis de mesurer des volumes à partir des contours tridimensionnels. Les régions d'intérêt ont ensuite été exportées sous la forme de fichiers DICOM RT Structure Set, ce qui permet de créer une carte des volumes d'intérêts du patient, utilisé ensuite comme fichier d'entrée pour la géométrie d'irradiation de GATE.

3.3.1.4. Géométrie d'irradiation.

GATE permet d'utiliser des volumes acquis par tomographie pour créer la géométrie des simulations. Cela permet de créer des volumes réalistes et spécifiques des patients étudiés.

Pour la simulation, un cylindre d'air a été créé pour contenir les volumes définis par la tomographie. Ensuite, les images ont été placées au centre de ce cylindre pour pouvoir aligner le faisceau. Chaque pixel des images tomographiques correspond à un volume avec les caractéristiques de taille et de matériau le constituant.

Les voxels font une taille de $0,337 \times 0,337 \times 0,500 \text{ mm}^3$. Cinq structures différentes ont été utilisées pour la simulation : l'air, le tissu mou, l'os, le cerveau et un mélange de tissu cérébral et de Fe_3O_4 . Chacune de ces structures est constituée d'un matériau sauf ce dernier, qui est discrétisé en 200 matériaux selon la concentration en nanoparticules, tel que décrit plus loin. La composition des matériaux biologiques utilisés a été basée sur le rapport ICRU-44. (White et al. 1989), tel qu'utilisé par le NIST, pour calculer les valeurs des coefficients d'atténuation (Seltzer 2004). Les compositions sont résumées dans le Tableau 3.3.1.

	Air	Tissus mous	Os	Tissu cérébral	Fe_3O_4
H		10,2%	3,4%	10,7%	
C	0,0124%	14,3%	15,5%	14,5%	
N	75,52%	3,4%	4,2%	02,2%	
O	23,18%	70,8%	43,5%	71,2%	27,6%
Na		0,2%	0,1%	0,2%	
Mg			0,2%		
P		0,3%	10,3%	0,4%	
S		0,3%	0,3%	0,2%	
Cl		0,2%		0,3%	
Ar	1,28%				
Ca		0,3%	22,5%	0,3%	
Fe					72,4%
ρ (g/mL)	$1,205 \times 10^{-3}$	1,06	1,92	1,04	5,17

Tableau 3.3.1 : Fraction massique des éléments atomiques présents dans la composition des différents matériaux utilisés et leur densité, d'après ICRU-44 (White et al. 1989).

Les concentrations en nanoparticules d'oxyde de fer dans le cerveau peuvent être très élevées en fonction de la technique d'injection utilisée, ce qui va avoir un impact sur la densité du matériau composé de tissu cérébral et de nanoparticules. En estimant que la densité du mélange milieu/ Fe_3O_4 est proportionnelle à celle de ses constituants, on peut déterminer la composition et la masse volumique du mélange.

En utilisant les concentrations mesurées dans la section 3.2.2, on attribue une valeur aux voxels se trouvant dans chacune des régions d'intérêts. Chaque voxel prend donc une valeur comprise entre -3 et 200 correspondant à la composition de la région d'intérêt comme indiqué dans le Tableau 3.3.2 et la Figure 3.3.2.

Valeur du voxel	Matériau
-3	Air
-2	Tissu mou
-1	Os
0	Cerveau
n compris entre 1 et 200	Tissu cérébral + IONP à n mg Fe/mL

Tableau 3.3.2 : Table d'équivalence des matériaux.

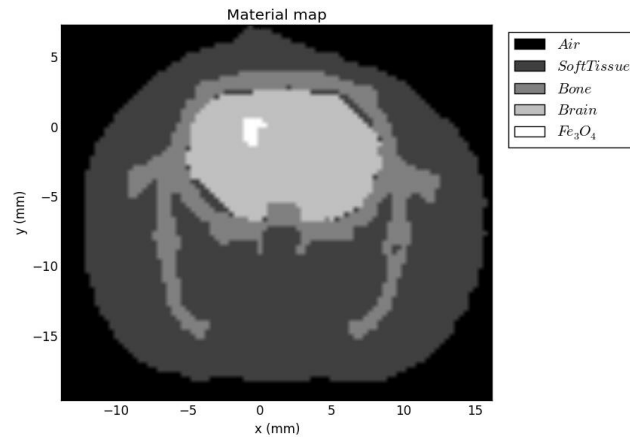


Figure 3.3.2 : Carte des matériaux.

3.3.1.5. Conditions d'irradiation

La simulation calque les conditions de traitement des animaux. Quatre conditions d'irradiation sont étudiées dans ce chapitre avec des énergies et des balistiques différentes. Deux balistiques sont étudiées :

- Condition de faisceaux croisés: une irradiation de 20 Gy selon 2 incidences, délivrant 10 Gy chacune. Un faisceau en direction du dessus du crâne et le second faisceau irradie le côté droit de la tête du rat (Figure 3.3.3). La section du faisceau est un carré de 10 mm de côté. Cette balistique a été utilisée avec un faisceau d'énergie de 35 keV monochromatique, ou de 100 keV en rayonnement monochromatique et en rayonnement polychromatique.
- Condition de tomothérapie: une irradiation de 20 Gy avec un faisceau en rotation sur 360° autour de l'animal, selon le plan transversal. La section du faisceau est un carré de 10x10 mm². Cette balistique a été utilisée avec un faisceau d'énergie de 35 keV monochromatique.

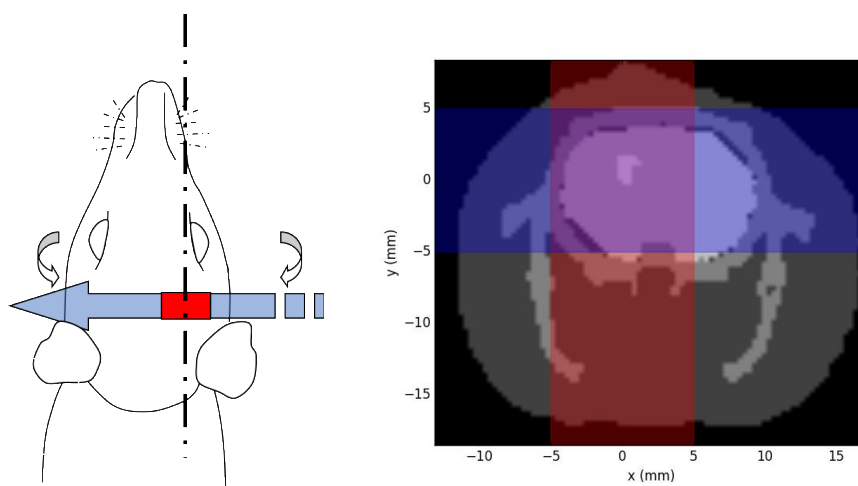


Figure 3.3.3 : Schéma du plan d'irradiation. En faisceaux croisés, un faisceau vient du dessus du crâne (faisceau rouge) et l'autre provient de la droite du rat (faisceau bleu). Schéma du rat en vue de dessus (Gauche) et vue du plan transverse (Droite). Schéma adapté de (J.-F. Adam 2003)

Juste avant la radiothérapie, les rats ont été imagés par tomographie. La position des images acquises par rapport au faisceau est donc connue. Pour sélectionner la coupe centrale, on utilise comme repère, le trou laissé par l'aiguille dans l'os du crâne lors de l'implantation des cellules tumorales. Les faisceaux de radiothérapie sont centrés sur le centre supposé de la tumeur, là où les cellules tumorales ont été injectées, dans l'hémisphère droit du cerveau.

Plusieurs types de rayonnement ont été étudiés :

- Un rayonnement monochromatique d'énergie 35 keV, qui correspond à l'énergie pour laquelle le facteur d'augmentation de dose du fer est maximal.
- Un rayonnement polychromatique, afin d'évaluer l'efficacité du traitement en condition de thérapie FLASH. Le faisceau utilisé pour la thérapie FLASH est un rayonnement polychromatique avec une énergie équivalente de 100 keV, dont le débit de dose est très élevé.
- Un rayonnement monochromatique de 100 keV, pour comparaison avec l'irradiation FLASH.

Ceci nous donne 4 conditions d'irradiations :

- Deux faisceaux croisés de 35 keV monochromatiques ;
- Deux faisceaux croisés de 100 keV monochromatiques ;
- Deux faisceaux croisés de 100 keV polychromatiques ;
- Une irradiation sur 360° (tomothérapie) de 35 keV monochromatique.

Pour permettre de délivrer une dose connue de rayonnement, la mesure du débit de dose est réalisée dans un fantôme d'eau cylindrique de 20 mm de diamètre. Une chambre d'ionisation PinPoint PTW 31014 (PTW, Fribourg, Allemagne) a été utilisée pour la

mesure de la dose. La chambre d'ionisation PinPoint est une petite chambre cylindrique avec un volume sensible de $1,5 \text{ mm}^3$. La chambre a été calibrée pour la mesure de la dose dans l'eau avec les qualités de faisceau ^{60}Co et TH200 pour la mesure des rayonnements de faible énergie. Le dosimètre est réglé avec une différence de potentiel de 400 V et la lecture de la mesure est effectuée avec un électromètre PTW Unidos Weblin. Les facteurs de correction pour la recombinaison des ions, de pression et de température ont été déterminés et appliqués à la mesure. La chambre d'ionisation est placée au centre du fantôme et une irradiation avec un faisceau de champ carré de 10 mm de côté (comme pour le traitement des animaux) est réalisée de façon à irradier toute la zone active de la chambre.

Une fois le débit de dose mesuré dans le fantôme cylindrique, la prescription de dose dans le rat a été déterminée à partir du débit de dose mesuré.

Pour la simulation, les approximations suivantes ont été faites :

- L'influence de la 3^e harmonique a été négligée pour les calculs réalisés avec un faisceau monochromatique. En effet des travaux précédents ont montré que la contribution de la 3^e harmonique était négligeable. (Vautrin 2011b). On considère donc un faisceau monochromatique
- Le champ du faisceau est supposé uniforme. La mesure du profil du faisceau montre une variation de 0,5% dans l'intensité du faisceau.
- La vitesse de translation du setup d'irradiation est considérée constante. Un collimateur de la dimension du champ d'irradiation bouge avec le patient. L'accélération et le ralentissement de la translation ont lieu lorsque le faisceau est bloqué par le collimateur. Le débit de dose est donc homogène sur toute la durée du scan et le champ du faisceau d'irradiation est de la forme du collimateur.
- Le faisceau est considéré comme étant parallèle sur le parcours des photons dans l'animal. La divergence du faisceau synchrotron est de 3,8 mrad ce qui, pour un animal de 30 mm d'épaisseur correspond à une augmentation de taille du faisceau de $114 \mu\text{m}$, qui est inférieure à la taille des pixels de l'image qui font $337 \mu\text{m}$. (Martínez-Rovira, Sempau, and Prezado 2012).

Chaque faisceau est centré sur le centre de l'hémisphère droit, de façon à ce que la tumeur soit entièrement irradiée par un faisceau ayant un champ carré de 10 mm de côté. $1,5 \cdot 10^8$ photons primaires sont simulés en tout. En condition de faisceaux croisés, $7,5 \cdot 10^7$ photons sont d'abord simulés sur le premier faisceau, puis une rotation de 90 degrés est effectuée et les $7,5 \cdot 10^7$ photons restants sont simulés. En condition de tomothérapie, nous simulerons un faisceau par angle de 1° . Les photons émis sont distribués sur les 360 angles d'irradiation afin de simuler un total de $1,5 \cdot 10^8$ photons primaires. Le seuil de coupure du parcours des photons et des électrons est de $34 \mu\text{m}$. Les résultats se présentent sous la forme d'une carte de dose représentant l'énergie déposée dans chaque voxel pour $1,5 \cdot 10^8$ photons.

Une simulation du fantôme de dosimétrie est aussi réalisée dans les mêmes conditions. La dose de référence est déterminée dans une région d'intérêt de 100 voxels au centre du

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

cylindre. Pour obtenir la carte dose absolue des rats, les cartes de doses ont été pondérées par le facteur suivant :

$$Dose\ absolue = \frac{Dose\ calculée \times Dose\ prescrite}{Dose\ de\ référence} \quad 3.2$$

La dose calculée (en Gy) est le résultat obtenu par la simulation, la dose de référence est la dose calculée dans le fantôme de référence et la dose prescrite correspond à 20 Gy, qui est la dose sélectionnée pour traiter la tumeur.

3.3.1.6. Évaluation de l'augmentation de dose

Le facteur d'augmentation de dose ou DEF (*dose enhancement factor*) est défini comme le rapport entre la dose dans un voxel contenant des tissus et des nanoparticules et la dose sans nanoparticules à une position donnée. Le DEF a été évalué voxel par voxel et a ensuite été moyenné dans la région d'intérêt considérée.

$$DEF = \frac{Dose\ avec\ nanoparticules}{Dose\ sans\ nanoparticules} \quad 3.3$$

Trois études ont été réalisées :

- Une étude menée sur le fantôme de calibration cylindrique de 20 mm de diamètre, dans lequel une région d'intérêt sphérique de 3 mm de diamètre a été placée au centre du fantôme et remplie de concentrations croissantes de nanoparticules d'oxyde de fer. Une simulation a été faite en condition de faisceaux croisés avec des concentrations de nanoparticules de 0, 1, 5, 10, 20, 50 et 100 mg/mL.
- Une étude menée sur un rat dans les 4 conditions d'irradiation établies précédemment.
- Une étude menée sur 4 rats en condition de faisceaux croisés avec une énergie de 35 keV monochromatique.

La dose et le DEF sont évalués de 2 manières. Premièrement, les moyennes de la dose et du DEF sont mesurées dans le volume tumoral ainsi que dans le volume de distribution des nanoparticules déterminées par les régions d'intérêts segmentées précédemment. Deuxièmement, un histogramme dose-volume est établi pour chaque rat dans ces deux volumes.

La répartition de la dose dans les différents volumes peut être déterminée par un histogramme dose-volume (HDV). Un HDV représente la distribution de dose dans un volume déterminé (comme la tumeur ou un organe à risques). Le HDV cumulatif calcule la proportion du volume qui reçoit au moins une certaine dose et la représente en fonction de la dose. (Podgorsak 2005).

3.3.2. Évaluation dosimétrique et vérification de l'efficacité du traitement

3.3.2.1. Évaluation du DEF sur fantôme

Une simulation a été réalisée sur un fantôme d'eau de diamètre de 20 mm contenant une sphère de 3 mm de diamètre correspondant à un volume de 14,14 mm³ qui est du même ordre de grandeur que les volumes de distribution des nanoparticules mesurés sur les rats. Cette sphère est composée d'un mélange homogène de Fe₃O₄ et d'eau avec différentes concentrations de fer.

Le facteur d'augmentation de dose (DEF) a été évalué dans cette sphère en faisant le rapport de la dose avec nanoparticules et le fantôme de référence (sans nanoparticules). La Figure 3.3.4 montre l'évolution du DEF en fonction de la concentration en nanoparticules.

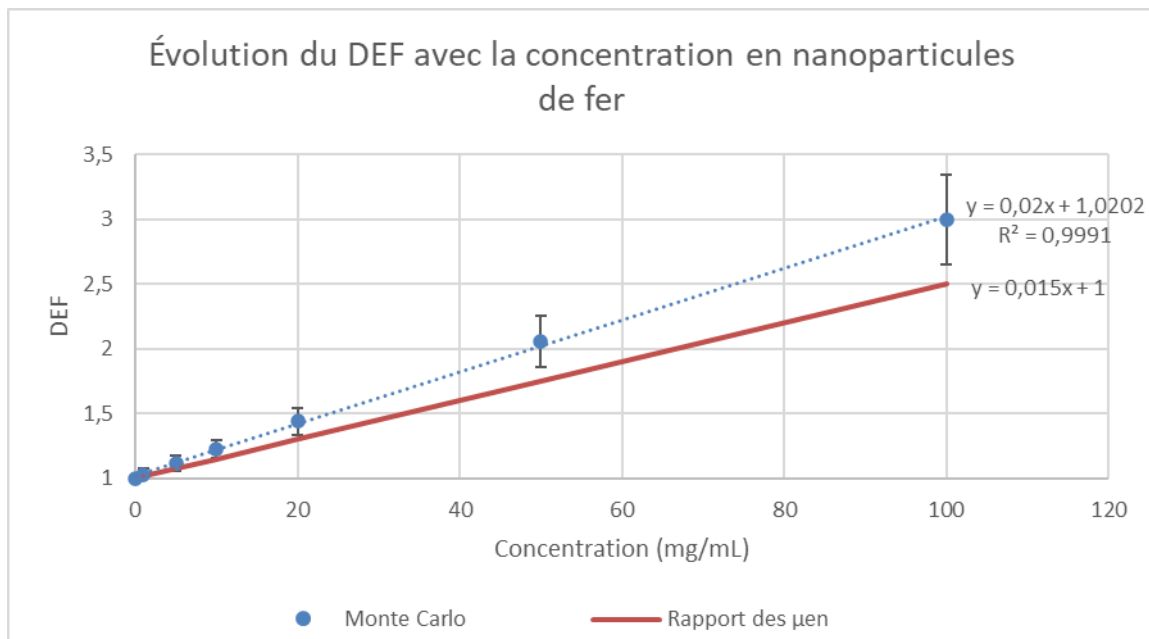


Figure 3.3.4 : Calcul par simulations Monte-Carlo du DEF à différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer dans un fantôme cylindrique d'eau de 20 mm de diamètre avec une tumeur sphérique de 3 mm de diamètre contenant un mélange d'eau et de nanoparticule d'oxyde de fer. La courbe rouge représente le DEF estimé par le rapport des μ_{en}/ρ .

Le facteur d'augmentation de dose simulé dans ce fantôme est linéaire avec la concentration, sur la gamme de concentration en fer considérée, comprise entre 0 et 100 mg/mL. Le DEF est linéaire en fonction de la concentration de fer, avec un coefficient de détermination de 0,99 et suit l'équation :

$$DEF = 1 + 0,0203 \times C_{Fe_3O_4} \quad 3.4$$

Pour comparaison, Le DEF peut être calculé en prenant simplement en compte le rapport des coefficients d'absorption massique en énergie d'un mélange eau/fer par rapport à l'eau. Si $C_{Fe} \ll 1$ mg/mL, le DEF peut être approximé par l'équation 1.6 (Chapitre 1, page 32), ce qui nous donne:

$$DEF = 1 + 0,015 \times C_{Fe_3O_4} \quad 3.5$$

En considérant les coefficients d'absorption massique en énergie indiqués dans le Tableau 3.3.3 issu du NIST (Seltzer 2004).

Matériau	Coefficient d'absorption massique à 35 keV	Coefficient d'absorption massique à 100 keV
Eau	$1,15 \times 10^{-1}$	$2,54 \times 10^{-2}$
Fer	5,20	$2,18 \times 10^{-1}$
Os	$7,60 \times 10^{-1}$	$4,59 \times 10^{-2}$

Tableau 3.3.3 : Coefficients d'absorption massique de l'eau, du fer et de l'os à 35 et à 100 keV. D'après les données du NIST (Seltzer 2004)

La différence entre les deux équations est probablement due à l'influence du rayonnement diffusé qui est pris en compte dans le calcul Monte-Carlo.

3.3.2.2. Résultats précliniques

Une comparaison de plusieurs conditions d'irradiation a été faite sur un des rats. La Figure 3.3.5 représente une carte de dose pour la condition de faisceaux croisés à 35 keV. On observe une augmentation de dose importante dans le volume de distribution des nanoparticules dans le cerveau ainsi que dans l'os situé sur la trajectoire des faisceaux.

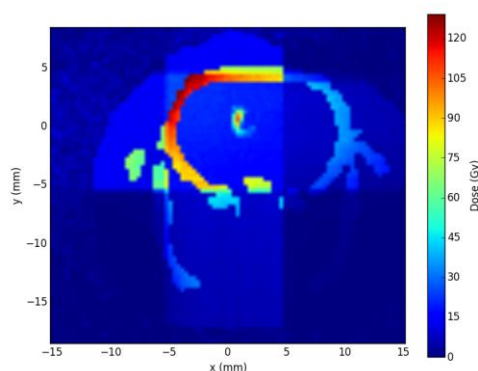


Figure 3.3.5 : Exemple de carte de dose du traitement synchrotron avec renforcement de nanoparticules d'oxyde de fer avec un faisceau d'énergie 35 keV.

Le DEF calculé par simulations Monte-Carlo, en fonction des concentrations mesurées dans les tumeurs des rats par TQRS pour une irradiation à 35 keV, est représenté sur la Figure 3.3.6. La courbe peut être ajustée par la fonction linéaire :

$$DEF = 1 + 0,0286 \times C_{Fe_3O_4} \quad 3.6$$

Avec un coefficient de corrélation R^2 de 0,9957

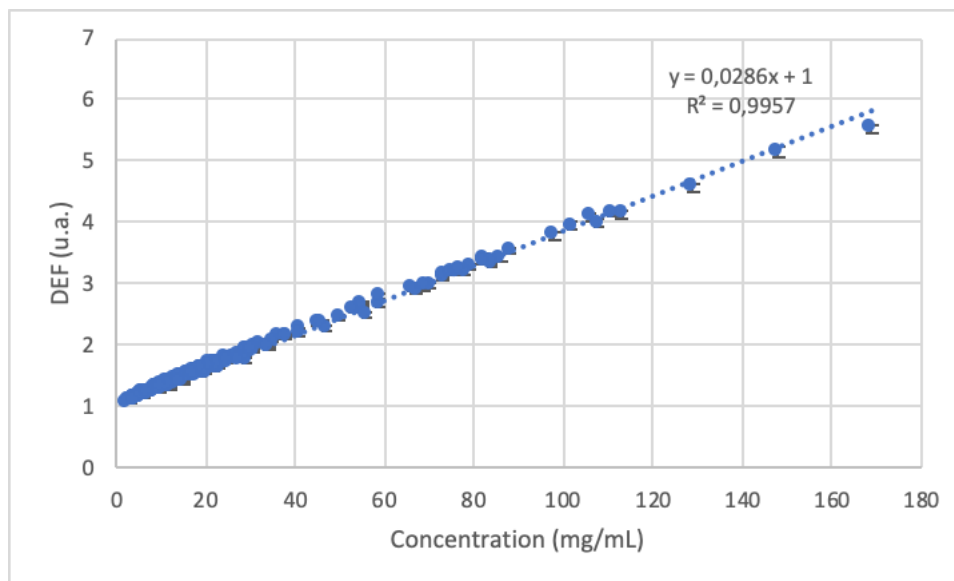


Figure 3.3.6 : Facteur de renforcement de dose en fonction de la concentration dans le rat.

Les DEF calculés dans les tumeurs sont proches des DEFs calculés dans un fantôme cylindrique (équation 3.4).

Histogrammes dose/volume

La Figure 3.3.7 représente les histogrammes dose/volume pour les 4 conditions d'irradiation. Quelle que soit la géométrie d'irradiation (croisée ou tomothérapie), on observe une plus grande augmentation de dose due aux nanoparticules en irradiant avec un faisceau monochromatique d'énergie 35 keV par rapport aux irradiations à 100 keV. Les augmentations de dose résultantes des deux géométries d'irradiation à 35 keV sont comparables (Figure 3.3.7 C), cependant les distributions de dose dans la tumeur sont différentes selon la géométrie d'irradiation utilisée (Figure 3.3.7 A et B).

La dose dans le volume de distribution des nanoparticules a été mesurée et comparée pour chaque condition d'irradiation (Tableau 3.3.4). Les HDV sont représentés pour les 4 conditions étudiées. On observe qu'une dose moyenne plus élevée pour une énergie de 35 keV, par rapport aux conditions 100 keV, que ce soit avec un faisceau monochromatique ou en polychromatique. L'augmentation de dose due au faisceau polychromatique est plus élevée que celle induite par le faisceau monochromatique à 100 keV. Ceci est probablement dû à l'influence des basses énergies du faisceau polychromatique. En revanche, il n'y a pas de différences entre les conditions de faisceaux croisés et tomothérapie à 35 keV.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

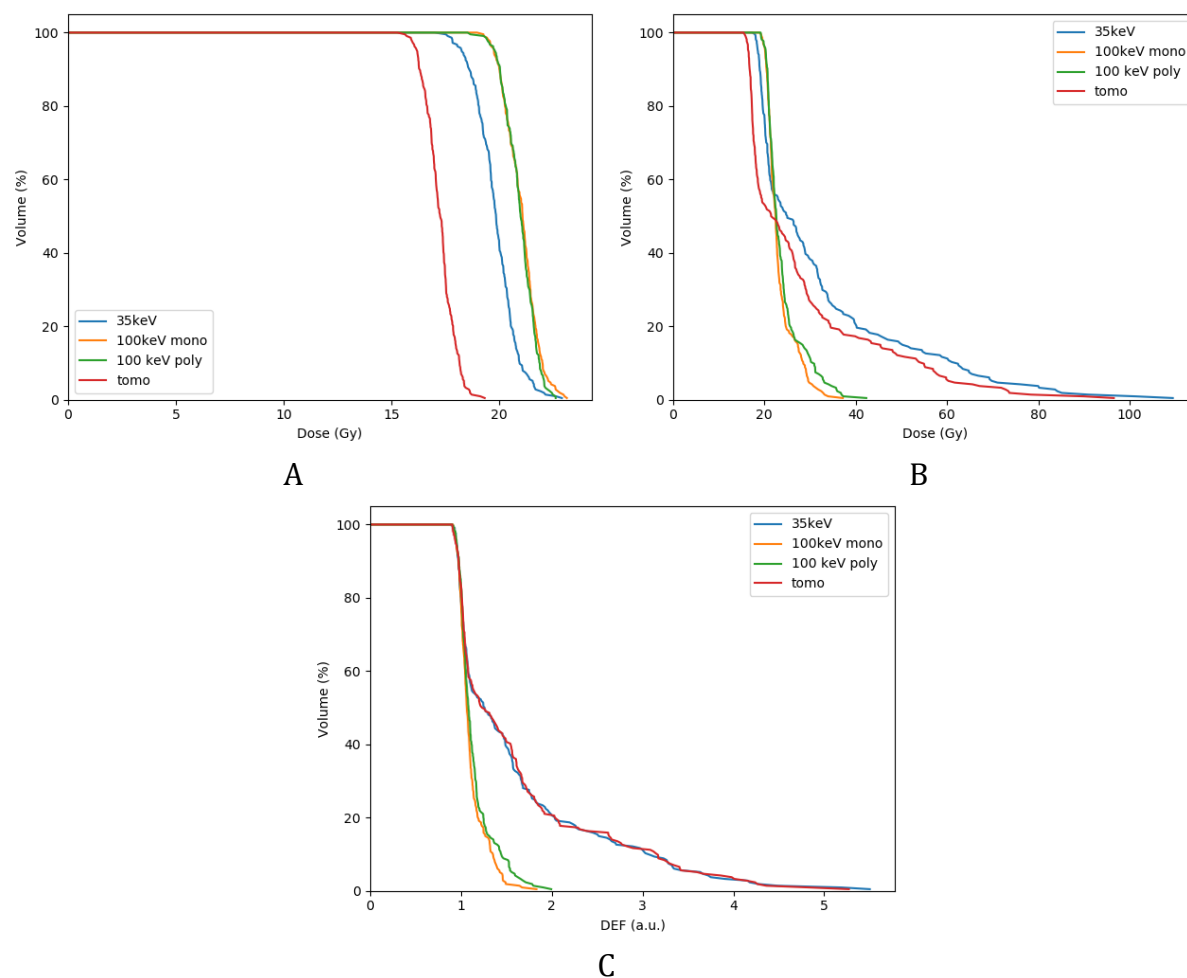


Figure 3.3.7 : Histogrammes dose volume dans la tumeur chez un rat porteur de glioblastomes F98 selon 4 conditions d'irradiation : faisceaux croisés avec une énergie monochromatique de 35 keV (Bleu) ou 100 keV (Orange) ou avec un spectre polychromatique d'énergie équivalente à 100 keV (Vert), tomothérapie avec une énergie monochromatique de 35 keV (Rouge). A. Tumeur sans nanoparticules. B. Tumeur avec injection de 20 μL de nanoparticules de fer à 32 mg /mL. C. DEF calculé dans le volume tumoral avec injection de 20 μL de nanoparticules de fer à 32 mg /mL.

Conditions	Dose moyenne Tumeur sans fer (Gy)	Dose moyenne Tumeur avec fer (Gy)	DEF moyen Tumeur (a.u.)
Faisceaux croisés 35 keV	19,8	32,1	1,62
Tomothérapie 35 keV	17,2	28,1	1,62
Faisceaux croisés 100 keV monochromatiques	21,0	23,3	1,11
Faisceaux croisés 100 keV polychromatiques	21,0	23,9	1,14

Tableau 3.3.4 : Dose et DEF moyen mesuré dans le volume tumoral d'un rat ayant reçu une dose prescrite de 20 Gy avec ou sans nanoparticules d'oxyde de fer pour les quatre conditions d'irradiation étudiées.

Des modèles virtuels de 4 rats ont été réalisés à partir des images tomographiques acquises pendant le traitement (Figure 3.3.8). Ces volumes virtuels ont permis de faire un

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

calcul de dose selon les conditions d'irradiation précédemment décrites. Le calcul permet de déterminer la dose reçue par l'animal pendant le traitement.

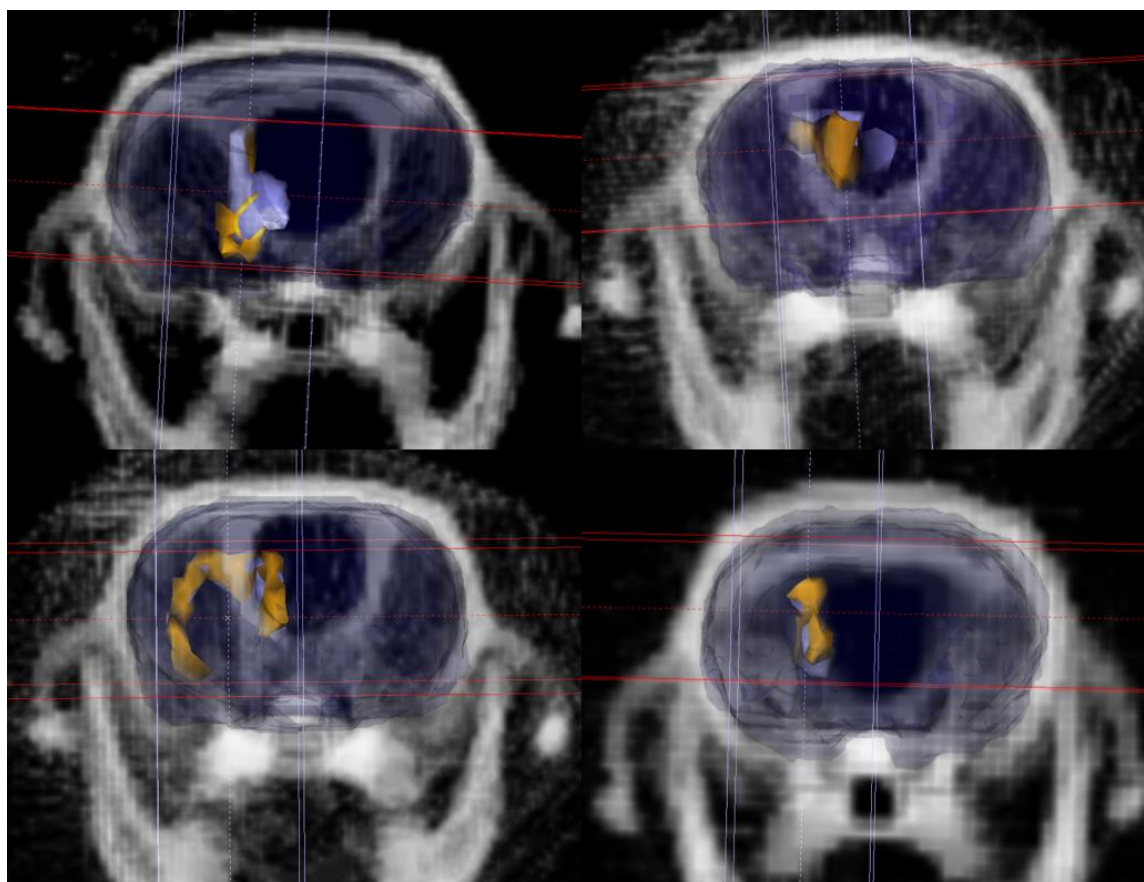


Figure 3.3.8 : Modèles virtuels en 3 dimensions des 4 rats réalisés avec Isogray. Le volume des nanoparticules de fer est représenté par le volume orange, le volume de la tumeur par le volume bleu clair. Le cerveau a été délimité par le volume bleu foncé transparent. Les deux faisceaux d'irradiation se croisent au niveau de la tumeur et sont représentés en bleu et en rouge.

Le Tableau 3.3.5 indique les valeurs de dose et de DEF mesuré dans la tumeur et dans le volume de nanoparticules de fer. La dose moyenne mesurée dans le volume de fer représente la dose maximale théorique qu'aurait reçue la tumeur, dans le cas où celle-ci serait parfaitement recouverte par les nanoparticules d'oxyde de fer.

	Dose moyenne Tumeur (Gy)	Dose moyenne Volume fer (Gy)	DEF moyen Tumeur	DEF moyen volume fer
Rat 1	24	37	1,2	1,8
Rat 2	32	36	1,6	1,8
Rat 3	42	48	2,1	2,4
Rat 4	32	41	1,6	2,1
Moyenne totale	32 ± 7	40 ± 6	1,6 ± 0,4	2,1 ± 0,3

Tableau 3.3.5 : Résultats des mesures de dose et de DEF dans le volume de fer et le volume tumoral.

La Figure 3.3.9 représente les HDV des rats planifiés dans le volume contenant les nanoparticules de fer et dans le volume tumoral avec et sans nanoparticules de fer. Pour chaque rat, la dose et le DEF ont une courbe du HDV similaire. On observe que la tumeur reçoit moins de dose à cause du recouvrement partiel du volume tumoral par les nanoparticules. Le maximum de dose mesuré est entre 100 et 140 Gy correspondant à un DEF entre 5 et 7. L'augmentation de dose dans la tumeur est seulement partielle dans tous les rats. Cette différence est due au recouvrement incomplet des nanoparticules qui limite l'augmentation de la dose dans la tumeur.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

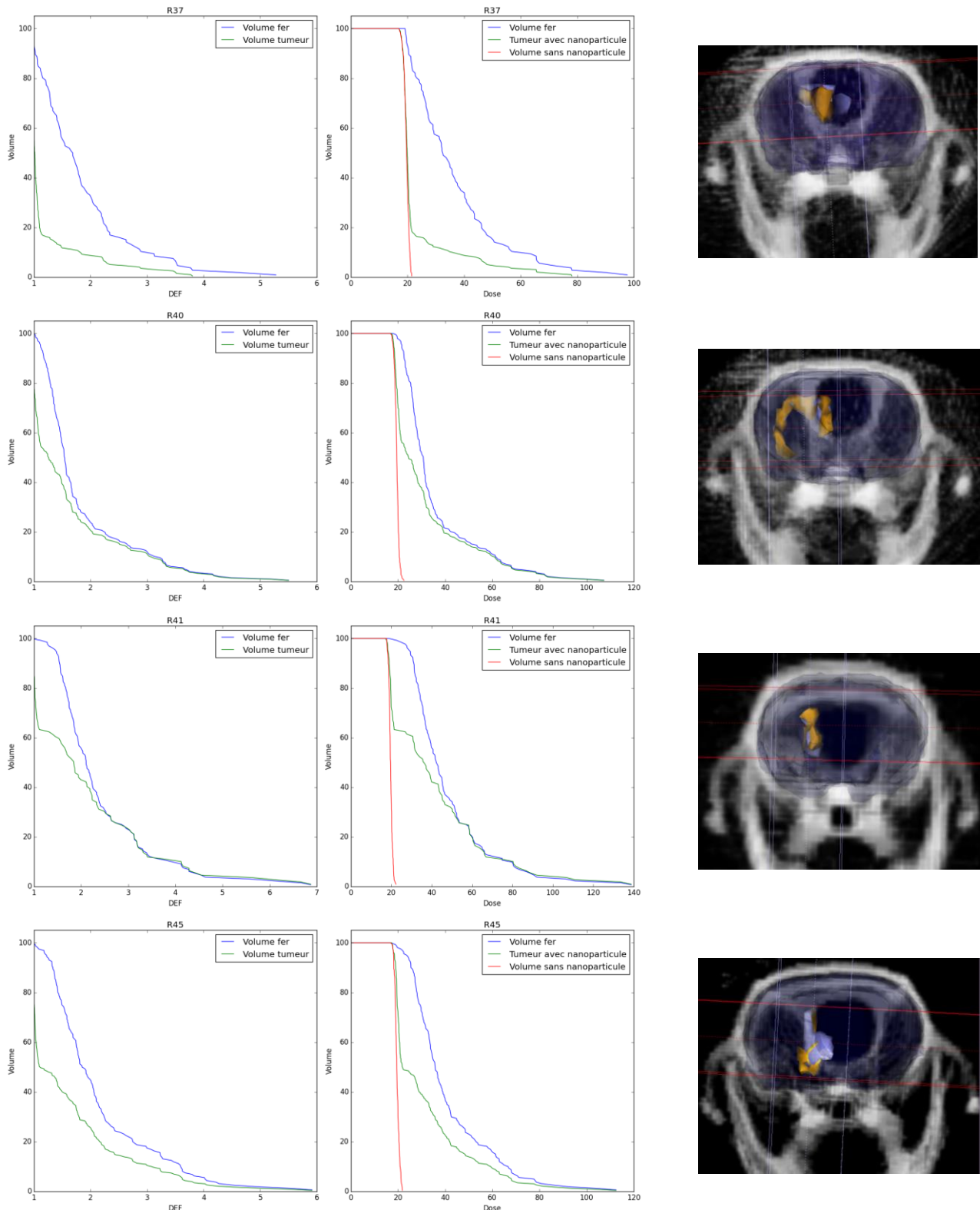


Figure 3.3.9 : Histogrammes dose volumes chez 4 rats ayant reçu 20 μL de nanoparticules à 44 mg/mL. À gauche, représentation de la répartition du DEF dans les volumes de fer et tumorale. Au centre, répartition de la dose dans les volumes de fer et tumorale ainsi que la dose déposée dans la tumeur sans nanoparticules. À droite, vue 3D représentant le volume visible de nanoparticules de fer (orange) ainsi que le volume tumoral (bleu).

3.4. Discussion des résultats

Dans cette partie, les résultats obtenus par imagerie après injection des nanoparticules d'oxyde de fer par voie intraveineuse ou en CED sont discutés et comparés à la littérature. Les distributions de dose ont été calculées selon plusieurs géométries de traitement, en prenant en compte les concentrations en nanoparticules mesurées dans le cerveau des rats. L'originalité de ce travail consiste en l'implémentation de techniques d'imagerie et de planification de traitement spécifiques au rayonnement synchrotron pour évaluer l'augmentation de dose macroscopique *in vivo* induite par les nanoparticules d'oxyde de fer.

3.4.1. Distribution de la concentration de nanoparticules en CED

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons mis en place les méthodes d'imagerie qui permettent d'obtenir les données quantitatives nécessaires aux simulations. L'utilisation de la tomographie monochromatique nous a permis de quantifier le fer présent dans le cerveau des animaux. Nous avons démontré au chapitre 2 que les images IRM ne peuvent pas être utilisées, car une saturation du signal IRM induit par les nanoparticules d'oxyde de fer empêche d'évaluer la biodistribution des nanoparticules. De plus, l'IRM ne produit pas de données quantitatives des concentrations de façon simple.

Lors de l'injection CED, nous mesurons par tomographie synchrotron une concentration de nanoparticules dans un volume moyen de $11,4 \pm 1,3 \text{ mm}^3$ pour une injection de 20 mm^3 . Ce volume est plus faible que ce qui était attendu. Après injection CED dans le cerveau, les drogues vont se loger dans l'espace interstitiel, puis éventuellement être captées par les cellules. Lorsqu'elles restent dans l'espace interstitiel, les volumes de distribution sont alors plus élevés que le volume d'injection.

D'un point de vue macroscopique, il faudrait idéalement que le volume de nanoparticules recouvre totalement la tumeur. Une autre étude utilisant de l'iode en agent de contraste montre que le volume de prise de contraste occupe un volume équivalent à 4 fois le volume injecté par CED. (Julia Rousseau et al. 2007). Les auteurs émettent l'hypothèse que ce volume élevé est dû à la part du volume interstitiel ou l'agent de contraste diffuse.

Pour les nanoparticules d'oxyde de fer, ce volume de distribution est de $11,3 \text{ mm}^3$ pour un volume d'injection de 20 mm^3 . Ceci peut être dû à la taille des nanoparticules utilisées, qui après sonication ont un diamètre hydrodynamique supérieur à 100 nm à cause de l'agglomération des nanoparticules, alors que la taille du noyau métallique des nanoparticules va de 10 à 15 nm . (Reymond 2018). De plus il a été observé que le diamètre hydrodynamique augmente lorsque les nanoparticules sont mises dans du milieu de culture (Reymond 2018).

Dans une autre étude (Besse 2011), il a été également observé que lors d'une injection par CED de gadolinium-DOTA, le volume de distribution était de 3 à 4 fois le volume d'injection (Figure 3.4.1) et la concentration macroscopique était d'environ 20% à 25% la concentration de la solution d'injection.

Bobyk et al. ont étudié la distribution de nanoparticules d'or (15 nm) par tomographie quantitative dans le temps (Bobyk et al. 2013). La concentration tumorale des nanoparticules mesurée au temps initial était de 20% celle de la solution d'injection et décroissait au cours du temps selon une courbe exponentielle avec une constante de temps de 500 minutes (Bobyk et al. 2013).

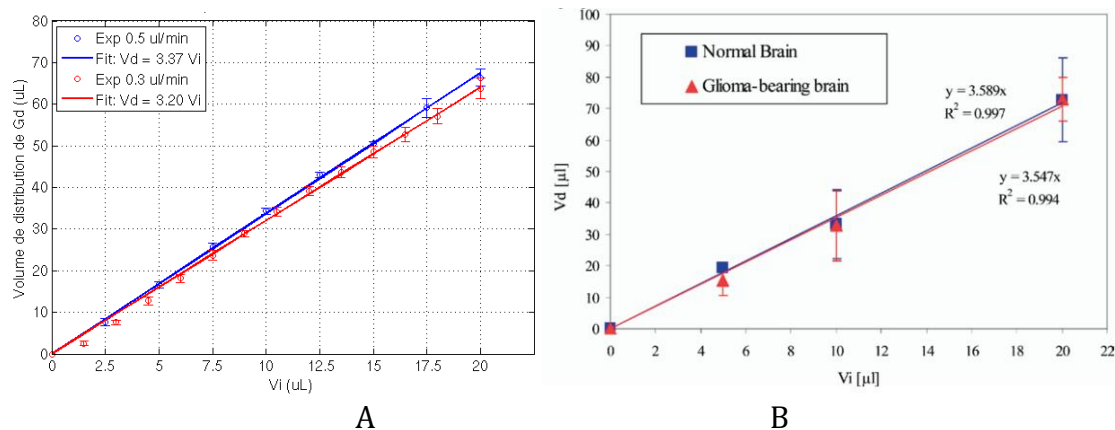


Figure 3.4.1 : Évolution du volume de distribution par rapport au volume d'injection des agents de contrastes. A. Gadolinium (Gd-DOTA) à une concentration de 1 mmol/L¹ (Besse 2011). La courbe rouge correspond à une vitesse d'injection de 3 μ L/min et la courbe bleue correspond à une vitesse d'injection de 0,5 μ L/min. La concentration du volume injecté est de 1 mmol/L. B. Iode (Iopamidol) à une concentration de 100 mg/mL avec une vitesse d'injection de 0,5 μ L/min dans un cerveau de rat normal (bleu) et dans un cerveau de rat porteur d'une tumeur F98 (Rousseau et al. 2007).

Les agents de contraste restent majoritairement dans l'espace interstitiel du tissu cérébral qui représente environ 25% du volume. La mesure étant macroscopique avec une résolution spatiale de quelques centaines de microns, la concentration est moyennée entre la concentration de l'agent dans l'espace interstitiel et la concentration de l'agent dans les cellules qui pénètre peu et/ou très lentement lorsqu'il s'agit d'agents de contraste.

La taille des nanoparticules joue un rôle important sur le volume de distribution. En particulier, si les nanoparticules s'agglomèrent, elles peuvent rester au point d'injection et faiblement diffuser dans les tissus interstitiels. (M. Y. Chen et al. 2005; Besse 2011).

La concentration des nanoparticules d'oxyde de fer observée au cours de notre étude est élevée en comparaison des concentrations observées avec d'autres nanoparticules utilisées en renforcement de dose (Taupin 2013; Krishnan 2020). En comparaison, les concentrations tumorales moyennes de nanoparticules d'or observées sont de 5 mg/mL (après injection de 5 μ L à 25 mg/mL) et de 3,5 mg/mL (après injection de 5 μ L à 22 mg/mL) pour les nanoparticules de gadolinium (Bobyk et al. 2013; Taupin 2013). D'autres études ont montré qu'il est possible d'atteindre des concentrations encore plus élevées. Pour la thérapie notamment, l'équipe de Maier-Hauff a montré qu'il était possible d'injecter par CED chez le rat 2 mol/L de nanoparticules (\approx 110 mg/mL) dans un volume de 20 μ L. (Jordan et al. 2006). Cette équipe a aussi effectué des essais cliniques chez l'homme qui ont abouti à une autorisation de mise sur le marché pour un traitement chez l'homme incluant une injection intracérébrale de 4,5 mL de nanoparticules de fer à la concentration de 112 mg/mL (Maier-Hauff et al. 2011).

Les nanoparticules de fer utilisées dans le cadre de notre étude s'agglomèrent fortement et une sonication est nécessaire avant l'injection. Cependant, même après sonication, la taille hydrodynamique reste supérieure à 100 nm. (Reymond 2018) (Figure 3.4.2). Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules a été mesuré par diffusion dynamique de la lumière ou DLS (*Dynamic Light Scattering*). Le diamètre hydrodynamique prend en compte le revêtement ainsi que la couronne de protéines éventuelles qui peuvent se fixer sur les nanoparticules. Cette taille prend en compte la taille du cœur métallique, et aussi de toute modification de la structure de surface qui pourrait modifier sa vitesse de diffusion. D'autres études utilisant les nanoparticules de fer ont aussi observé une agglomération des nanoparticules. (Hauser et al. 2016; S.-J. Seo et al. 2013). Chen et al montre que l'utilisation d'albumine dans le revêtement des nanoparticules permettrait une meilleure distribution malgré la taille des agglomérats de nanoparticules (M. Y. Chen et al. 2005).

D'un point de vue microscopique, à l'échelle cellulaire, la taille des nanoparticules va aussi influencer sur la captation par les cellules tumorales. Les cellules de gliome F98 sont dérivées des astrocytes qui sont des cellules phagocytaires. (Cahoy et al. 2008). Une étude réalisée avec des cellules F98 en culture pendant 24h avec les nanoparticules d'oxyde de fer (Reymond 2018) a montré que ces cellules accumulaient davantage de nanoparticules lorsque les agglomérats de nanoparticules n'étaient pas soniqués et donc plus gros. Cet avantage d'incorporation des nanoparticules par les cellules tumorales peut être contrebalancé par la faible diffusion des nanoparticules dans les tissus. Un compromis doit être trouvé entre ces deux facteurs pour obtenir un effet thérapeutique optimal.

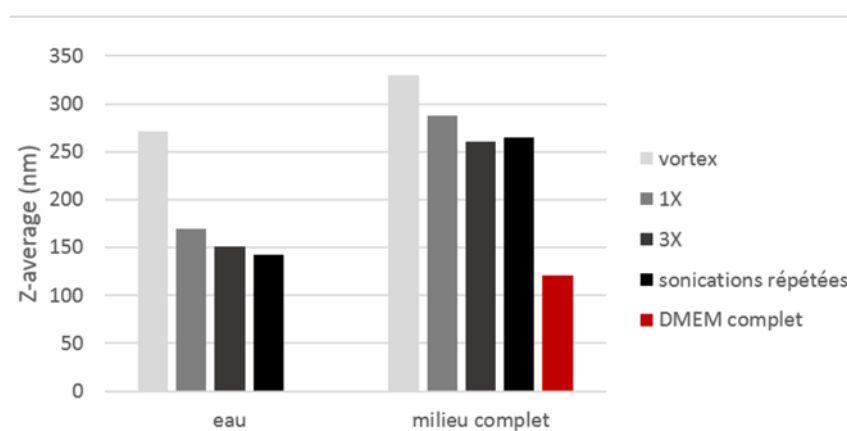


Figure 3.4.2 : Mesure du diamètre hydrodynamique par DLS (*Dynamic Light Scattering*) des FeONP après une ou plusieurs sonications (600 W, 20 kHz) de 15 minutes. Même après sonication, les agglomérats de FeONP ont toujours un diamètre supérieur à 100 nm. (Reymond 2018).

La limitation du volume de distribution influence le recouvrement de la tumeur par les nanoparticules. Pour les rats injectés en CED, on observe un recouvrement tumoral par les nanoparticules de fer de $30\% \pm 20\%$, ce qui est relativement faible et aura très certainement une influence sur l'efficacité du traitement. La distribution reste à améliorer pour obtenir un effet thérapeutique important.

L'injection d'un agent de contraste iodé qui passe la barrière hématoencéphalique dans la zone tumorale où la barrière est partiellement rompue nous a permis d'évaluer le volume tumoral. Toutefois le volume tumoral complet est toujours très difficile à mesurer de façon précise et les techniques d'imagerie ne permettent pas de détecter les cellules

migrantes qui donnent souvent lieu à la reprise tumorale. Une étude a comparé la tomographie synchrotron avec prise de contraste d'iode avec l'analyse histologique ainsi qu'avec d'autres techniques d'imagerie. (Taupin 2013). Le volume d'iode mesuré par tomographie a été trouvé maximal à 15 minutes après injection et une diminution du volume d'iode est observé au cours du temps, lorsque le produit de contraste s'élimine. Comparée avec les autres techniques d'imagerie, la mesure par tomographie à 15 minutes d'injection d'iode surestime le volume tumoral observé par les autres techniques dans le cas des plus gros volumes tumoraux. Les temps pour lesquels le contraste d'iode représente le mieux la tumeur est de 17 minutes pour une tumeur d'environ 5 mm³, contre 48 minutes pour une tumeur de 166 mm³. Connaître l'étendue de la tumeur macroscopique permet un meilleur ciblage, mais le volume de distribution nécessite d'être grand par rapport à ce volume afin de détruire les cellules tumorales distantes de la masse principale et qui ne sont pas visibles par imagerie macroscopique *in vivo*.

3.4.2. Dosimétrie

Dans une première étude, le calcul de dose a été réalisé dans un fantôme et dans un modèle CT basé sur les images tomographiques acquises chez les rats. Le calcul de dose a été réalisé pour quatre conditions chez un rat :

- Deux faisceaux croisés de 35 keV monochromatiques ;
- Deux faisceaux croisés de 100 keV monochromatiques ;
- Deux faisceaux croisés de 100 keV polychromatiques ;
- Une irradiation sur 360° (tomothérapie) de 35 keV monochromatique.

Ces quatre conditions correspondent aux conditions d'irradiations pratiquées dans l'étude préclinique chez le rat porteur d'une tumeur F98 présenté dans le chapitre 4.

L'impact de la géométrie d'irradiation sur la dose calculée a été mis en évidence (voir Section 3.3.2.2). Le traitement en mode tomothérapie à 35 keV induit une dose dans la tumeur sans agent légèrement plus faible par rapport à un traitement par faisceaux croisés à la même énergie. Ceci peut être expliqué par le fait que la dose de référence est calculée dans le fantôme d'eau à 1 cm, ce qui correspond à la profondeur d'irradiation pour les faisceaux croisés qui sont émis depuis le côté du rat où se trouve la tumeur (le centre du faisceau). Cependant en tomothérapie, la dose est émise de manière homogène autour du rat, des faisceaux d'irradiation seront émis depuis le côté du rat qui n'est pas à 1 cm de profondeur ce qui va faire baisser la dose moyenne.

L'énergie a également une influence sur la distribution de la dose (Tableau 3.3.4). L'irradiation avec une énergie de 100 keV induit une dose moyenne dans la tumeur calculée dans la tumeur de 21,0 Gy en l'absence de nanoparticules, que ce soit en rayonnement monochromatique ou polychromatique, pour une dose prescrite au centre de 20 Gy. En comparaison, le traitement simulé à 35 keV donne une dose de 19,8 et 17,2 Gy, respectivement pour les modes d'irradiations croisées et mode tomothérapie. Ceci est sans doute causé par la présence de l'os sur le parcours du faisceau. En effet, aux basses énergies, l'os atténue plus fortement les rayons X à cause de l'effet photoélectrique. En effet, d'après le NIST (Seltzer 2004), 0,5 mm d'os correspond à une atténuation de 8,3 % de l'intensité du faisceau primaire à 35 keV contre 1,8 % à 100 keV. La dose prescrite de 20 Gy étant mesurée par une chambre d'ionisation dans un fantôme cylindrique de 20 mm de diamètre constitué uniquement d'eau (sans os), on surestime

pendant la calibration la dose à basses énergies comparativement aux hautes énergies et cela induit des doses délivrées à la tumeur différente en fonction de l'énergie d'irradiation.

L'influence des nanoparticules de fer pour ces 4 conditions d'irradiation a ensuite été prise en compte. On observe une augmentation de dose de 1,62 en moyenne à 35 keV pour les conditions de faisceaux croisés et pour la tomothérapie. À 100 keV, on observe une différence entre une irradiation avec un faisceau monochromatique et polychromatique. L'augmentation de dose est de 1,11 pour le faisceau monochromatique alors qu'elle est de 1,14 pour le faisceau polychromatique, soit une différence de 2,7 %. Cette différence est due à l'influence des basses énergies pour le spectre polychromatique. Ces résultats sont importants pour pouvoir comparer l'influence des différentes conditions de traitement sur la survie dans le chapitre 4.

Dans la seconde étude, nous avons réalisé un plan de traitement pour des animaux ayant reçu des nanoparticules d'oxyde de fer. Le plan de traitement de 4 animaux a été mis en place pour la radiothérapie avec augmentation de dose par nanoparticules de fer. Pour chaque animal, une carte de dose et une carte du DEF ont été calculées. À partir de ces cartes, les histogrammes dose-volume ont été extraits dans les volumes d'intérêts : le volume de fer et le volume tumoral (Figure 3.3.5).

Le DEF moyen calculé dans la tumeur (N=4 rats) pour une irradiation réalisée à 35 keV est de $1,6 \pm 0,4$ (Tableau 3.3.5). Cependant, le recouvrement de la tumeur par les nanoparticules est partiel et ne permet un renforcement de dose effectif dans toute la tumeur. De plus, on observe sur les images tomographiques un reflux des nanoparticules dans le corps calleux chez certains rats ce qui déplace la région de renforcement de dose hors de la région tumorale et peut conduire à des effets délétères.

L'augmentation de dose par les nanoparticules affecte les cellules selon 2 effets principaux : l'altération de l'ADN par le rayonnement ce qui provoque la mort cellulaire (effet direct) et la création d'espèces réactives de l'oxygène dans le milieu, ce qui entraîne des réactions chimiques en cascade qui peuvent provoquer une dénaturation de la cellule (effet indirect).

Pour atteindre l'ADN, il faut que les nanoparticules soient proches des cellules à atteindre, ou idéalement, intégrées dans les cellules. En effet, les électrons secondaires émis par les nanoparticules de fer lorsqu'elles sont irradiées par un rayonnement de 35 keV ont un parcours de l'ordre de 23 μm (Figure 3.4.3), soit de l'ordre de la dimension d'une cellule (environ 10 μm pour les cellules F98). Pour avoir une efficacité sur les cellules tumorales, il est important que les nanoparticules soient à proximité des cellules tumorales. L'efficacité du traitement sera supérieure si les cellules ont internalisé et concentré les nanoparticules (Figure 3.3.6).

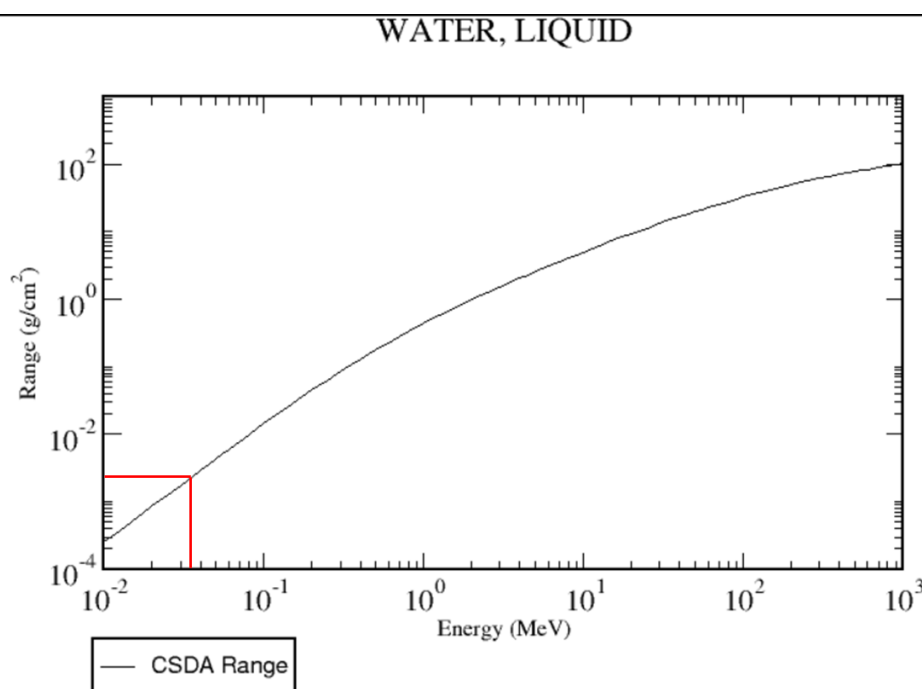


Figure 3.4.3 : Parcours des électrons dans l'eau selon l'approximation du ralentissement continu (CSDA). En rouge les photons de 35 keV ont un parcours de $2,3 \cdot 10^{-3}$ g/cm², soit 23 μ m pour une masse volumique de 1 g/cm³. (Berger 1992)

Les travaux de Solveig Reymond montrent qu'en 24 h, les nanoparticules de Fer sont internalisées en plus forte concentration dans les cellules F98 que le Dotarem, un agent de contraste à base de Gadolinium. Dans cette expérience, des cellules F98 ont été incubées dans un milieu de culture contenant 0,06 mg (Fe)/mL de nanoparticules de Fer ou 5 mg (Gd)/mL de Dotarem. Les cellules ayant reçu les nanoparticules de Fer ont internalisé 71 ± 22 pg [Fe]/cellule, alors que les cellules ayant reçu le Dotarem en ont internalisé $2,10 \pm 0,26$ pg (Gd)/cellule. (Reymond 2018). Les cellules F98 ont donc internalisé plus de nanoparticules de Fer alors que les nanoparticules étaient moins concentrées dans le milieu de culture que le Dotarem.

Les mesures d'augmentation de dose sur les volumes tumoraux sont encourageantes. Le DEF moyen mesuré de $1,6 \pm 0,4$ chez les rats étudiés permettrait d'observer des augmentations significatives du temps de survie des rats. Par contre, le faible taux de recouvrement de la distribution des nanoparticules par rapport au volume tumoral pourra poser problème.

Dans le cas de la survie cellulaire mesurée par tests clonogéniques, les courbes de survie peuvent être approximées par le modèle linéaire quadratique comme représenté (Figure 3.4.4) pour les cellules F98. On voit qu'une augmentation de dose aurait plus d'effet pour une dose prescrite élevée par rapport aux faibles doses. Cependant, ce modèle issu de données *in vitro* ne permet pas de prédire le comportement des tumeurs dans le cadre d'essais précliniques avec une des doses de rayonnement administrées lors d'un traitement hypofractionné, comme c'est le cas dans notre expérience. (Delorme et al. 2017).

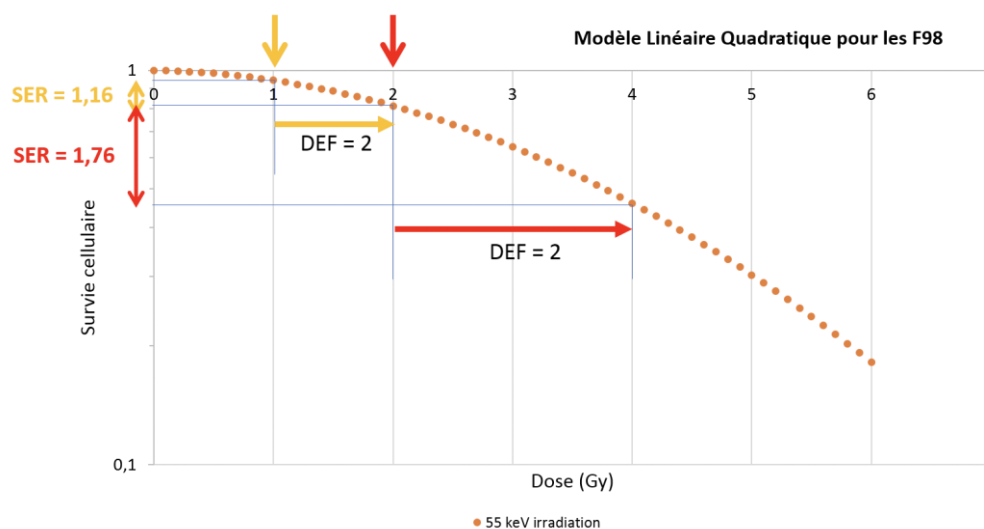


Figure 3.4.4 : Modèle linéaire quadratique : La survie des cellules tumorales diminue avec la dose selon la formule $S/S_0 = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$. (Reymond 2018)

La différence entre le DEF mesuré de façon macroscopique (qui est le seul accessible *in vivo*) et le DEF microscopique ajoute une complexité supplémentaire. En effet, au niveau microscopique, l'effet des nanoparticules sur le rayonnement dépend de la distance des nanoparticules avec le noyau des cellules, qui est considéré comme la cible principale. Ainsi, la distribution des nanoparticules au sein des cellules au niveau microscopique aura une forte influence sur l'impact du rayonnement sur la survie cellulaire. La concentration observée au niveau macroscopique ne présupposant pas une distribution homogène des nanoparticules au niveau microscopique.

Enfin, les fortes concentrations de nanoparticules observées dans certains volumes du cerveau non ciblés, comme le corps calleux lors du reflux au moment de l'injection, par exemple, pourra exposer les animaux traités à un risque de toxicité intrinsèque aux nanoparticules ou bien par surirradiation qui peut avoir un impact sur la survie des animaux et limiter l'efficacité du traitement.

3.5. Conclusion

Dans ce chapitre, un outil de calcul a été développé pour la planification de traitement en radiothérapie synchrotron en présence de nanoparticules d'oxyde de fer. Ce système a été utilisé pour estimer la dose dans le cas de différentes configurations d'irradiation. Les mesures de concentration sur fantôme nous ont permis de valider la méthode de mesure par tomographie synchrotron. Pour atteindre cet objectif, une méthode d'imagerie capable de séparer un minimum de 3 éléments dans un mélange était nécessaire. La tomographie à 2 énergies permet de séparer la contribution de 3 éléments et a été utilisée dans cette étude pour séparer l'iode injecté par voie intraveineuse par la veine caudale, les nanoparticules de fer injectées par CED au lieu d'injection de la tumeur, et le tissu cérébral. Ensuite, ces informations nous ont permis de créer un module de simulation dosimétrique, qui utilise ces données pour créer un modèle virtuel du rat et qui permet de reproduire les conditions d'irradiations expérimentales et ainsi obtenir une estimation de la dose absorbée dans l'ensemble du volume irradié.

Les résultats de cette étude nous ont permis d'une part de déterminer l'impact de la géométrie d'irradiation sur la distribution de dose ainsi que l'influence de l'augmentation de dose par les nanoparticules. Ces calculs nous ont permis de faire une estimation de l'efficacité de la radiothérapie combinée pour le traitement des rats porteurs d'une tumeur F98. Il en ressort que les nanoparticules en forte concentration dans la tumeur permettraient d'augmenter considérablement la dose déposée dans la tumeur. Cependant, le faible taux de recouvrement de la distribution des nanoparticules par rapport au volume tumoral vient pondérer l'efficacité attendue. L'étude préclinique de survie présentée dans le chapitre suivant permettra de mesurer l'efficacité thérapeutique de ce traitement combiné et de proposer des pistes d'amélioration.

Chapitre 4. Étude *in vivo* de la radiothérapie synchrotron par photo-activation de nanoparticules de fer chez le rat porteur du gliome F98

Chapitre 4. Étude <i>in-vivo</i> de la radiothérapie synchrotron par photo-activation de nanoparticules de fer chez le rat porteur du gliome F98	154
4.1. Contexte et objectifs	154
4.1.1. Objectifs de l'expérience.....	155
4.2. Matériel et méthodes	156
4.2.1. Préparation des animaux	156
4.2.2. Conditions d'irradiation	156
4.2.3. Suivi post-traitement	158
4.2.4. Analyse statistique.....	158
4.2.5. Groupement et protocoles.....	159
4.3. Résultats de survie	160
4.3.1. Effets des nanoparticules sans irradiation.....	160
4.3.2. Effets de la radiothérapie seule.....	162
4.3.3. Effet de la radiothérapie combinée à l'injection de nanoparticules d'oxydes de fer	165
4.4. Discussion	170
4.5. Conclusion.....	171

4.1. Contexte et objectifs

Dans le traitement du cancer, la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron utilise des éléments lourds déposés dans la tumeur pour augmenter la dose localement à l'aide d'un faisceau de rayons X monochromatiques. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont un bon candidat pour ce traitement, grâce à leur capacité à s'accumuler dans les cellules tumorales et à la bonne tolérance tissulaire. Cette tolérance tissulaire des nanoparticules de fer et leur nature ferromagnétique font d'elles de bonnes candidates pour être utilisées comme transporteurs pour délivrer des gènes ou des médicaments de manière ciblée, ou encore comme agent pour détruire les tissus tumoraux par hyperthermie. (Singh et al. 2010). Ces transporteurs peuvent être guidés par un champ magnétique externe afin de cibler un tissu ou un organe spécifique (Muthana et al. 2015).

La thèse présente est la suite des travaux de thèse réalisés *in vitro* par Paul Gimenez et Solveig Reymond. Paul Gimenez a 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 nanoparticules 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 FeONP induit une augmentation très élevée de la mort cellulaire par rapport à l'irradiation seule. On observe que ce phénomène a une dépendance à l'énergie ainsi qu'une dépendance à la concentration d'exposition. L'importance de l'effet mesuré (augmentation par trois de la mort cellulaire) reste élevée, même à une énergie de 80 keV, qui pourrait être utilisée dans le cadre d'essais cliniques pour le traitement de tumeurs cérébrales.

Les travaux de Paul Gimenez ont été poursuivis par Solveig Reymond. Elle a mesuré la concentration de ces nanoparticules de fer dans les cellules F98 et a observé que les nanoparticules d'oxyde de fer sont internalisées de manière importante par rapport à d'autres nanoparticules testées dans le laboratoire. (Reymond 2018). En effet, on observe une concentration de Fe_3O_4 allant jusqu'à 120 pg Fe/cellule pour une concentration dans le milieu de culture de 0,3 mg/mL et un temps d'incubation de 24 h. Reymond *et al.* (Reymond 2018) estiment que 100 pg/cellule correspond approximativement à une concentration de 100 mg/mL. Ces travaux concordent avec ceux de Choi *et al.* (G.-H. Choi et al. 2012) qui trouve une concentration en fer de 168 $\mu\text{g}/10^6$ cellules, soit 168 pg/cellule avec une concentration d'incubation de 2 mg/mL de nanoparticules pendant une nuit. Les nanoparticules s'accumulent dans les vésicules du cytoplasme en plus grande quantité pour de plus grosses nanoparticules, ou si les nanoparticules se sont agglomérées. Pour les temps d'incubations étudiés (24 h), il n'a pas été observé d'accumulation de nanoparticules d'oxyde de fer dans le noyau. (Reymond 2018). Toutefois, comme vu précédemment, les photoélectrons produits sur la couche K des atomes de fer avec un rayonnement d'énergie > 25 keV ont des parcours supérieurs aux diamètres des cellules tumorales F98 (section 3.4.2 page 150) et cela ne devrait donc pas constituer un problème.

Des simulations et des études *in vitro* ont été réalisées et ont montré une augmentation de dose significative et une efficacité améliorée pour détruire les cellules tumorales F98. Dans ce chapitre, un essai préclinique a été réalisé pour vérifier l'efficacité du traitement dans un modèle de gliome implanté chez le rat.

4.1.1. Objectifs de l'expérience

Différents groupes de rats porteurs du modèle de glioblastome F98 ont reçu des traitements par radiothérapie avec ou sans nanoparticules et ont été comparés entre eux. La survie de ces différents groupes a été suivie et une analyse post-mortem a été réalisée pour évaluer la quantité de nanoparticules de fer restant dans le cerveau.

Deux modes d'injections des nanoparticules ont été évalués :

- Une injection par intraveineuse (IV) dans la veine caudale
- Une injection intratumorale par CED.

Pour ces deux modalités, différentes concentrations de nanoparticules ont été testées.

Concernant le traitement par radiothérapie, différentes modalités ont été évaluées :

- Une énergie d'irradiation correspondant au maximum du facteur d'augmentation de dose du fer de 35 keV en rayonnement monochromatique a été utilisée, soit en irradiation par deux faisceaux d'incidences croisées, soit en tomothérapie.
- Un faisceau polychromatique d'énergie équivalente à 100 keV pour tester l'efficacité de l'effet FLASH à très haut débit de dose (2 faisceaux d'incidences croisées).
- Une irradiation monochromatique à 100 keV pour comparer directement avec l'effet FLASH (2 faisceaux d'incidences croisées).

4.2. Matériel et méthodes

Les essais précliniques chez le rat Fisher porteur d'une tumeur pour la radiothérapie synchrotron par renforcement de dose avec les nanoparticules d'oxyde de fer nécessitent plusieurs étapes qui seront développées dans cette partie.

Les étapes sont : l'implantation de tumeur F98 dans l'hémisphère droit des rats, l'injection des nanoparticules d'oxyde de fer soit par voie intraveineuse soit en CED, la radiothérapie et enfin le suivi de la survie après le traitement, tel que représenté (Figure 4.2.1).



Figure 4.2.1 : Frise chronologique représentant les différentes étapes de l'expérience.

4.2.1. Préparation des animaux

Les animaux ont reçu une implantation de 5000 cellules F98 dans l'hémisphère droit du cerveau, 9 jours avant la radiothérapie, tels que développés dans la section 2.2.1. Le diamètre tumoral attendu le jour du traitement est d'environ 3 mm.

Les nanoparticules de fer ont été synthétisées par l'équipe du Pr Jong Ki Kim de l'université de Daegu en Corée du Sud. La concentration de la solution mère obtenue est de 25 mg/mL de Fe_3O_4 , soit 18 mg Fe/mL. Cette solution mère a été évaporée sous flux d'azote afin d'obtenir des concentrations jusqu'à 54 mg Fe/mL. La synthèse des nanoparticules est détaillée dans la section 2.2.2.1.

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont été administrées par deux méthodes : administration par injection intraveineuse (IV) et administration intracérébrale par *Convection Enhanced Delivery* (CED). Ces deux modes d'administration sont développés dans la section 2.2.2.2. Les nanoparticules ont été administrées soit 3 h avant la radiothérapie, soit 24 h avant en fonction du groupe (section 4.2.3). Pour tous les groupes IV, 1 mL de solution de nanoparticules a été injecté dans la veine caudale du rat, suivi d'un bolus de 1 mL de solution physiologique. Pour tous les groupes CED, une injection de 20 μL de solution de nanoparticules a été réalisée aux coordonnées stéréotaxiques du site d'implantation de la tumeur, avec un débit de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

4.2.2. Conditions d'irradiation

L'irradiation a été réalisée sur la ligne ID17 de l'ESRF. Le faisceau est tout d'abord filtré par des filtres de carbone et d'aluminium pour s'affranchir des très basses énergies et réduire la charge thermique sur le monochromateur. Le monochromateur permet de sélectionner un rayonnement d'énergie ayant une bande passante $dE/E = 0,1 \%$, ce qui permet de le considérer comme monochromatique.

L'installation d'irradiation se trouve à 150 m de la source. Un cadre stéréotaxique, dans lequel la tête de l'animal sera maintenue, est placé verticalement sur une plateforme motorisée permettant de positionner précisément les animaux à irradier.

4.2.2.1. Dosimétrie

Afin de déterminer la dose délivrée, le débit de dose du faisceau est calculé pour nos conditions de traitement. Pour ce calcul, nous avons utilisé un fantôme cylindrique de 3 cm de diamètre rempli d'eau. Le fantôme a été placé sur le cadre stéréotaxique et une chambre d'ionisation de type PinPoint PTW 31014, placée au centre du cylindre, a servi de dosimètre.

La chambre d'ionisation a été calibrée par les services de métrologie de PTW pour une mesure de la dose dans l'eau avec une qualité de faisceau TH200 (200 KVp, 109 keV, 4 mm Al, 1 mm Cu) et le courant est mesuré par un électromètre PTW Unidos Weblin.

4.2.2.2. Centrage de la tumeur sur l'axe de rotation

Avant le traitement, les animaux sont anesthésiés avec un mélange de kétamine/xylazine (64.5/5.4 mg/kg) en injection intrapéritonéale, puis sont installés verticalement maintenus par un cadre stéréotaxique en PMMA. Une tomographie de la tête du rat est effectuée, puis l'animal est positionné pour placer la tumeur au centre de rotation du système d'irradiation.

Une acquisition tomographique 3D constituée de 32 coupes jointives, de 0,5 mm d'épaisseur, est réalisée. Cette acquisition est réalisée en mode coupe à coupe avec le détecteur germanium. Pour l'imagerie, le faisceau est atténué avec 10 cm de PMMA, placés juste après le monochromateur d'angiographie. Chaque coupe est réalisée en 2 s ($180^\circ/s$) par l'acquisition de 1024 profils d'atténuation. La dose moyenne délivrée est de 92 mGy dans le cerveau et de 360 mGy dans l'os. L'énergie du faisceau est réglée à 35 keV ($\Delta E/E = 0,1\%$). Les coordonnées de l'acquisition dans le plan horizontal sont repérées à l'aide des positions absolues des moteurs. Cette acquisition volumique sert à la fois pour centrer l'hémisphère droit sur l'axe de rotation pour les irradiations et sert d'images de référence pour la soustraction temporelle. Ceci permet d'obtenir, après injection, des images résolues en concentrations absolues d'iode et de fer (voir section 3.2.2).

L'image représentant la coupe du centre théorique de la tumeur est utilisée pour le centrage de l'animal pour la radiothérapie. Le centre de l'hémisphère droit est repéré et le rat est déplacé à l'aide des deux translations motorisées horizontales et perpendiculaires placées au-dessus de la rotation, afin de faire coïncider ce point avec l'axe de rotation. Le centre de la tumeur est supposé être situé au point d'injection des cellules tumorales approximativement au centre de l'hémisphère droit du cerveau. On repère dans l'os du crâne l'orifice ayant permis l'implantation des cellules tumorales, cette position sera nommée isocentre par la suite.

4.2.2.3. Traitements de radiothérapie

Plusieurs conditions d'irradiation ont été étudiées en faisant varier l'énergie du rayonnement et la géométrie d'irradiation. Ces conditions sont détaillées dans le chapitre 3 et sont les suivantes :

- Radiothérapie monochromatique — Énergie : 35 keV
 - a. Géométrie d'irradiation : deux faisceaux croisés
 - b. Géométrie d'irradiation : tomothérapie
- Radiothérapie monochromatique Énergie : 100 keV
 - a. Géométrie d'irradiation : deux faisceaux croisés
- Radiothérapie FLASH : Faisceau polychromatique
 - a. Géométrie d'irradiation : deux faisceaux croisés.

Pour la radiothérapie, la largeur du faisceau est de 10 mm et la hauteur du faisceau de 1,35 mm. L'atténuateur en PMMA utilisé pour l'imagerie est retiré du faisceau. Le débit de dose mesuré dans la zone tumorale à irradier est de 1,5 mGy/s/mA. Le courant dans l'anneau de stockage est approximativement de 200 mA, ce qui nous donne un débit de dose dans l'eau à la tumeur de 18 Gy/min.

4.2.3. Suivi post-traitement

Après le traitement, les rats sont surveillés quotidiennement afin de relever leur poids et de suivre l'état physique des animaux.

Des points limites ont été définis pour réduire la souffrance des animaux. Les animaux ont été euthanasiés si les signes suivants étaient observés :

- Perte de poids supérieure à 20 % par rapport à leur poids initial,
- perte de poids pendant plusieurs jours ainsi que deux des points limites suivants : chromodacryorrhée (excrétions rouges ressemblant à un saignement autour des yeux et du nez), prostration, déplacements circulaires, poils ébouriffés.

Le temps de survie des animaux euthanasiés a été allongé de 1 jour par rapport à la date de l'euthanasie. Lorsqu'un animal était retrouvé mort, son temps de survie a été compté au jour de la mort de l'animal.

4.2.4. Analyse statistique

Pour chaque groupe d'animaux, la courbe de survie de Kaplan-Meier a été tracée et les valeurs médianes et moyennes de survie ont été calculées. Les groupes ont été comparés 2 à 2 avec un test du log-rank. Le pourcentage relatif d'augmentation de temps de survie % ILS (*Increase Life Span*) par rapport aux contrôles non traités, ont été calculés de la manière suivante :

$$\%ILS = \frac{MST_t - MST_c}{MST_c} \quad 4.1$$

Avec MST_t , le temps de survie médian ou moyen des groupes traités et MST_c celui du groupe contrôle non traité, exprimé en jours.

4.2.5. Groupement et protocoles

Trois séries d'expériences ont eu lieu au synchrotron tel que décrit ci-dessous. Pour donner plus de cohérence aux comparaisons de traitements, nous avons par la suite choisi de présenter les résultats non pas par ordre chronologique, mais par comparaison de traitements.

Dans la première expérience, 10 groupes de rats ont été constitués :

- Non irradiés :
 - Sans nanoparticules
 - Administration IV de 44 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer
 - Administration CED de 1,8 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer.
- Radiothérapie par tomothérapie avec un faisceau monochromatique de 35 keV :
 - Sans nanoparticules
 - Administration IV de 44 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer 24 h avant la radiothérapie
 - Administration CED de 1,8 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer 24 h avant la radiothérapie.
- Radiothérapie par irradiation en faisceaux croisés avec un faisceau monochromatique de 100 keV
 - Administration CED de 1,8 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer 24 h avant la radiothérapie.
- Radiothérapie par irradiation en faisceaux croisés avec un faisceau polychromatique équivalent à 100 keV à très haut débit de dose.
 - Administration CED de 1,8 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer 24 h avant la radiothérapie.

Dans la seconde expérience, une combinaison de traitements a été expérimentée avec les nanoparticules à la concentration de la solution mère. Les rats ont donc été séparés en quatre groupes :

- Non irradiés :
 - Sans nanoparticules
 - Administration CED de 18 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer.
- Irradiation en faisceaux croisés avec un faisceau monochromatique de 35 keV
 - Sans nanoparticules
 - Administration CED de 18 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer 24 h avant irradiation.

Dans la troisième expérience, 6 groupes d'animaux ont été créés. Dans cette expérience, les nanoparticules ont été injectées le jour même du traitement, 3 h avant l'irradiation.

- Non irradiés :
 - Sans nanoparticules,
 - Administration CED de 32 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer
 - Administration IV de 54 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer
- Irradiation en faisceaux croisés avec un faisceau monochromatique de 35 keV :
 - Sans nanoparticules,
 - Administration CED de 32 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer 3 h avant irradiation
 - Administration IV de 54 mg Fe/mL de nanoparticules d'oxyde de fer 3 h avant irradiation.

Les conditions expérimentales de ces trois expériences sont synthétisées dans le Tableau 4.2.1

Concentration Nanoparticules	Groupe Contrôle Non irradiés	Énergie : 35 keV Monochromatique 2 Faisceaux croisés	Énergie : 35 keV Monochromatique Tomothérapie	Énergie : 100 keV Monochromatique 2 Faisceaux croisés	Faisceau polychromatique 2 Faisceaux croisés
0	Expérience 1 (N=5) Expérience 2 (N=3) Expérience 3 (N=8)	Expérience 2 (N=5) Expérience 3 (N=8)	Expérience 1 (tomo, N=5)	Expérience 1 (N=5)	Expérience 1 (N=5)
CED 1,8mg/mL	Expérience 1 (N=5)		Expérience 1 (tomo, N=10)	Expérience 1 (N=9)	Expérience 1 (N=8)
CED 18 mg/mL	Expérience 2 (N=3)	Expérience 2 (N=7)			
CED 32 mg/mL	Expérience 3 (N=5)	Expérience 3 (N=10)			
IV 54 mg/mL	Expérience 1 (N=4)		Expérience 1 (tomo, N=9)		
IV 54 mg/mL	Expérience 3 (N=5)	Expérience 3 (N=9)			

Tableau 4.2.1 : Tableau récapitulatif des différents modes d'injection des nanoparticules et conditions d'irradiation. Le nombre de rats dans chaque groupe est précisé. La radiothérapie est réalisée avec un rayonnement monochromatique avec d'énergie 35 keV ou 100 keV, ou polychromatique avec une énergie équivalente de 100 keV. Les nanoparticules ont été injectées soit en injection intraveineuse (IV) soit par Convection-Enhanced Delivery (CED).

4.3. Résultats de survie

Dans cette section, nous allons présenter les résultats des expériences de survie. Cette section est divisée en trois parties. En premier lieu, nous allons évaluer l'effet des nanoparticules sans irradiation, puis nous allons regarder l'effet des radiations sans nanoparticules et enfin nous allons aborder l'effet combiné de la radiothérapie avec les nanoparticules d'oxyde de fer.

4.3.1. Effets des nanoparticules sans irradiation

Les courbes de Kaplan-Meier des groupes témoins et des groupes ayant reçu uniquement des nanoparticules, soit par voie veineuse, soit par injection directe intracérébrale sont représentées dans la Figure 4.3.1.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

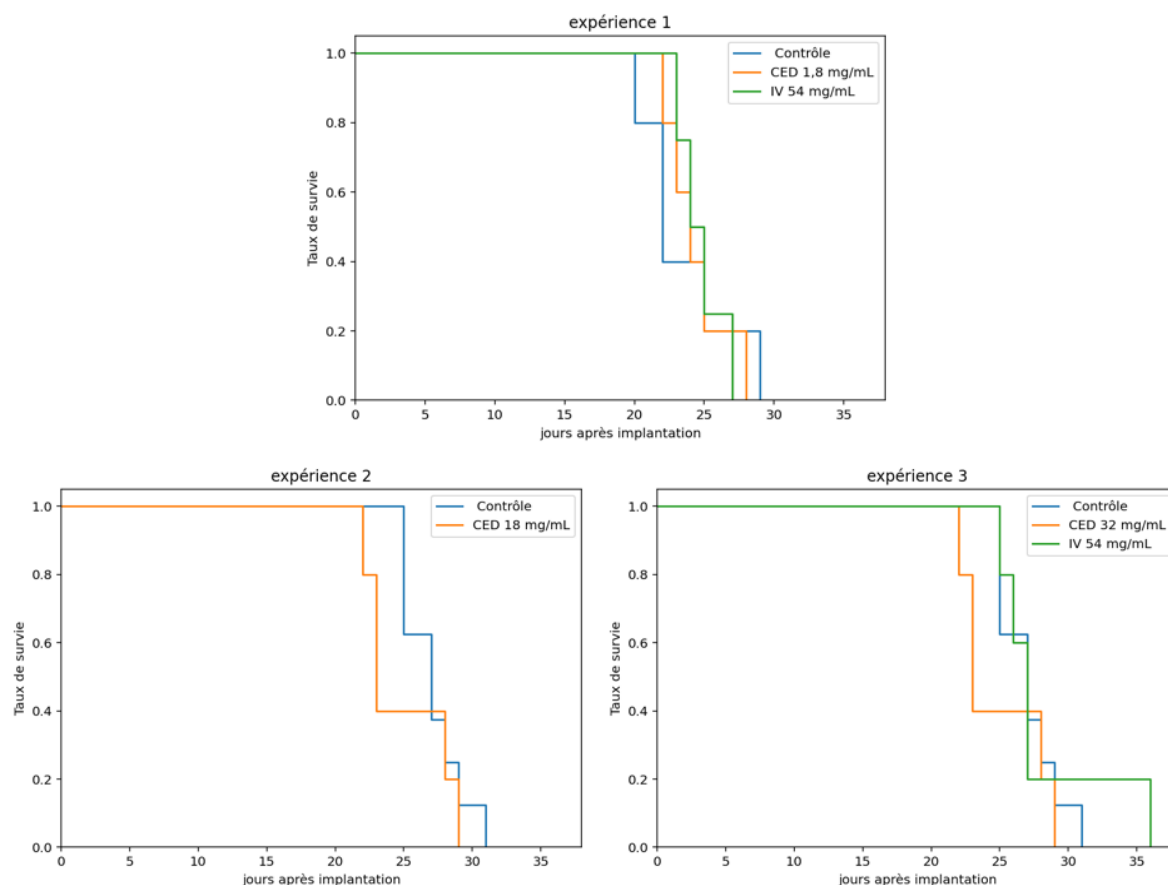


Figure 4.3.1 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une injection de nanoparticules d'oxyde de fer par convection-enhanced delivery (CED) ou par voie intraveineuse (IV).

La survie médiane des différents groupes non irradiés est comprise entre 22 jours et 28 jours (Tableau 4.3.1). Les groupes de rats témoins ne recevant aucun traitement ont des médianes de survie proches. Notons que le groupe témoins de la première expérience a une survie non significativement inférieure aux survies des groupes témoins des deux expériences suivantes ($p=0,15$).

	Voie d'injection/ Concentration Nanoparticules [mg/mL]	N	Survie Médiane (j)	Survie Moyenne (j)	%ILS Médiane	%ILS Moyenne	Test Log-Rank (p-value)
Expérience 1	0	5	22,0	23,6	-	-	-
Expérience 2	0	8	26,0	25,7	-	-	0,69
Expérience 3	0	3	27,0	27,1	-	-	0,15-
Expérience 1	CED / 1,8	5	24,0	24,4	9%	3%	0,96
Expérience 2	CED / 18	3	22,0	24,3	-15%	-5%	0,94
Expérience 3	CED / 32	5	23,0	25,0	-15%	-8%	0,35
Expérience 1	IV / 44	4	24,5	24,8	11%	5%	0,87
Expérience 3	IV / 54	5	27,0	28,2	0%	19%	0,70

Tableau 4.3.1 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 n'ayant pas reçu de radiothérapie. Les rats ont reçu une injection par CED de 20 μ L de nanoparticules d'oxyde de fer ou par IV de 1 mL aux concentrations indiquées dans le tableau. N : nombre d'animaux par groupe.

Il n'y a pas de différence significative entre les courbes de survie des groupes traités par rapport à leur groupe contrôle (test de log-rank). On observe une légère toxicité des nanoparticules injectées par CED aux fortes concentrations (18 et 32 mg/mL qui ont des survies médianes et moyennes inférieures aux contrôles, mais la différence n'est pas significative ($p > 0,05$).

4.3.2. Effets de la radiothérapie seule

4.3.2.1. Radiothérapie à 35 keV

Les survies des animaux après radiothérapie en rayonnement monochromatique à 35 keV selon les différentes conditions d'irradiation, telles que décrites dans la section 4.2.5, sont comparées entre elles sur la Figure 4.3.2 et le Tableau 4.3.2.

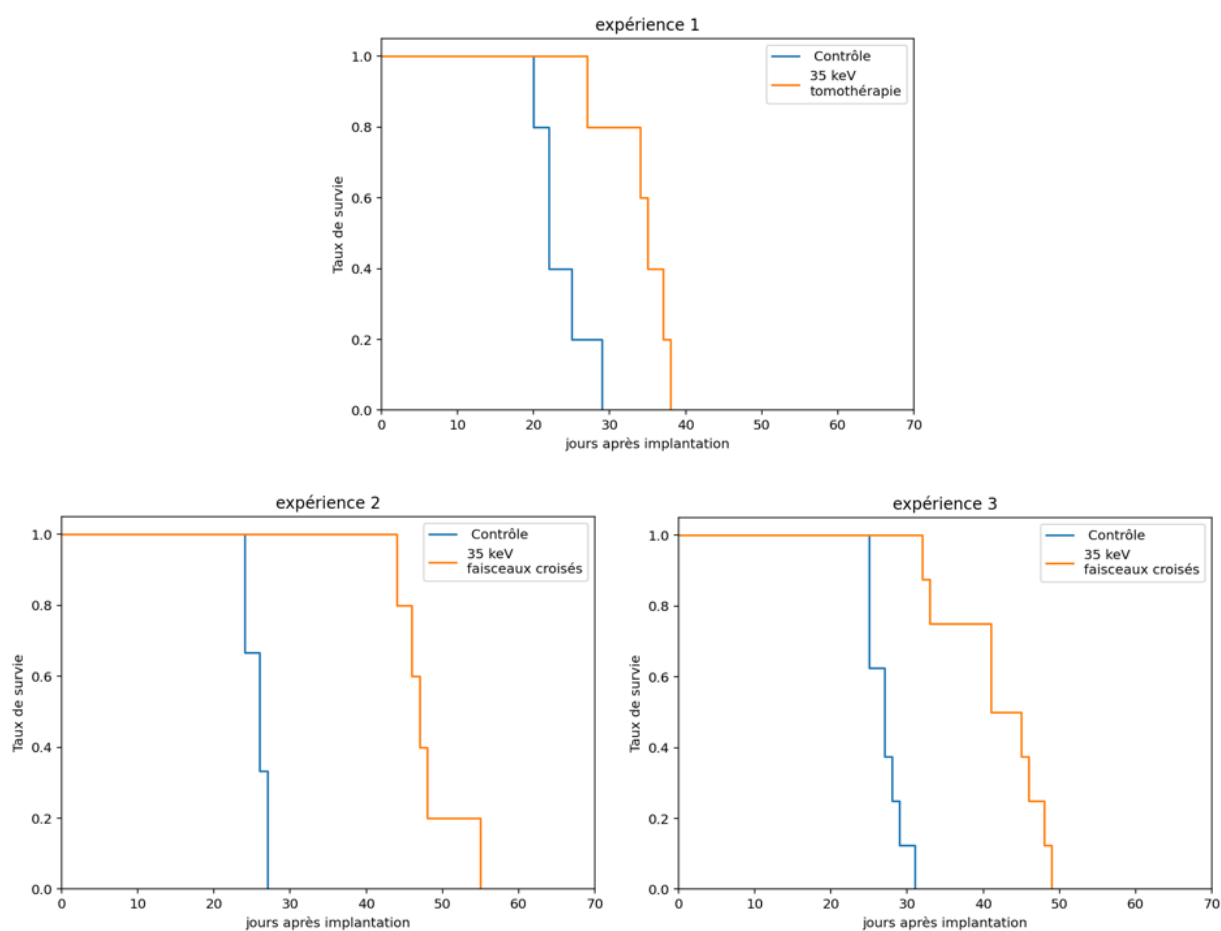


Figure 4.3.2 : Courbes de survie de rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une irradiation de 20 Gy prescrits à la tumeur à 35 keV en tomothérapie ou en faisceaux croisés, sans injection de nanoparticules.

	Irradiation	N	Survie Médiane (j)	Survie Moyenne (j)	%ILS Médiane	%ILS Moyenne	Test Log-Rank/ Contrôles	Test Log-Rank/ Tomo 35
Expérience 1	-	5	22,0	23,6	-	-	-	-
Expérience 2	-	8	26,0	25,7	-	-	-	-
Expérience 3	-	3	27,0	27,1	-	-	-	-
Expérience 1	Tomo 35 keV mono	5	35,0	34,2	59%	45%	<0,01	
Expérience 2	Croisés 35 keV mono	5	47,0	48,0	81%	87%	<0,01	<0,01
Expérience 3	Croisés 35 keV mono	8	43,0	41,9	59%	55%	<0,01	0,02
Expérience 1	Croisés 100 keV mono	5	45,0	48,6	104%	106%	<0,01	<0,01
Expérience 1	Croisés 100 keV poly	5	45,0	45,0	104%	91%	<0,01	<0,01

Tableau 4.3.2 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu la radiothérapie sans nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en tomothérapie (tomo) de 35 keV ou en faisceaux croisés (croisés) aux énergies de 35 keV et de 100 keV avec un faisceau monochromatique (mono) ou polychromatique (poly). N : nombre d'animaux par groupe.

Par rapport aux témoins non irradiés, une augmentation significative de la survie après la radiothérapie est obtenue, quelle que soit la modalité d'irradiation. L'augmentation de survie après irradiation en mode tomothérapie à 35 keV est inférieure à celle obtenue après traitement en faisceaux croisés (Figure 4.3.2 et Tableau 4.3.2). Ceci peut être dû à un mauvais recouvrement de la tumeur par les faisceaux. Rappelons en effet que l'irradiation est réalisée à l'endroit où la tumeur est supposée se situer, sans imagerie de contrôle. Une autre hypothèse, développée dans le chapitre précédent, suggère que pour une même dose prescrite, la dose à l'isocentre en tomothérapie est plus faible qu'en condition de faisceaux croisés. Ainsi dans les simulations présentées précédemment, une dose prescrite de 20 Gy en tomothérapie correspond à une dose moyenne délivrée à la tumeur sans nanoparticules de 17,2 Gy contre 19,8 Gy en faisceaux croisés à 35 keV (Tableau 3.3.4) Ceci est dû au fait que l'isocentre ne se situe pas au centre du rat et que les faisceaux arrivant par le côté le plus long sont plus atténués en tomothérapie.

4.3.2.2. Comparaison Radiothérapies à 35 keV et 100 keV en faisceaux croisés monochromatiques

La Figure 4.3.3 compare l'influence sur la survie des animaux d'une radiothérapie réalisée en faisceaux croisés, à une énergie de 35 ou 100 keV, en rayonnement monochromatique.

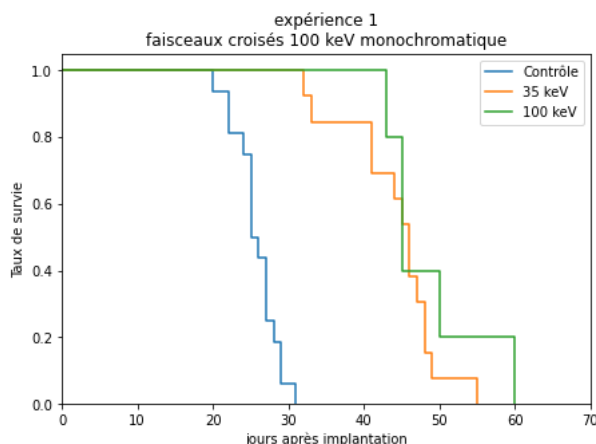


Figure 4.3.3 : Courbes de survie de rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une irradiation en faisceaux croisés de 20 Gy réalisée à 35 keV ou à 100 keV, en rayonnement monochromatique, sans injection de nanoparticules.

Les deux modes d'irradiation induisent une augmentation significative de la survie des animaux par rapport aux groupes témoins non irradiés ($p < 0,05$). Il n'y a pas de différence significative entre les deux modes d'irradiation ($p > 0,05$).

4.3.2.3. Comparaison radiothérapies à 100 keV, en faisceaux croisés, rayonnement monochromatique ou polychromatique

La Figure 4.3.4 représente les courbes de survies des rats ayant reçu une radiothérapie par faisceaux croisés à 100 keV en utilisant soit un rayonnement polychromatique à haut débit de dose (~ 5000 Gy/s), soit un rayonnement monochromatique à faible débit de dose ($\sim 0,4$ Gy/s).

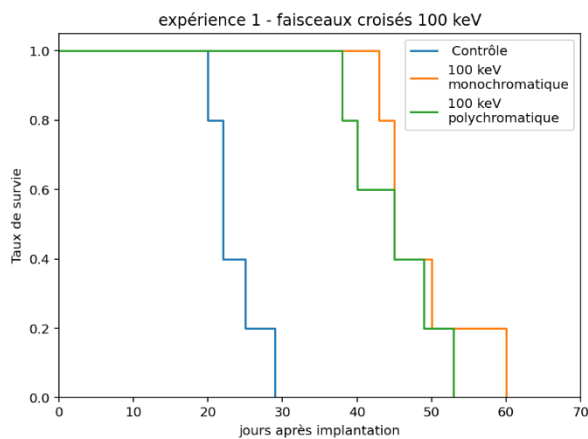


Figure 4.3.4 : Courbes de survie de rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une irradiation en faisceaux croisés de 20 Gy à 100 keV avec un rayonnement monochromatique (débit de dose 0,4 Gy/s) ou polychromatique (débit de dose 5000 Gy/s).

On observe des augmentations significatives de la survie des rats irradiés par rapport à leur groupe contrôle. Les survies médianes et moyennes sont similaires entre les groupes monochromatiques et polychromatiques. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux groupes ($p > 0,05$).

Dans tous les essais réalisés, la radiothérapie seule améliore la survie des animaux de manière significative par rapport au groupe d'animaux non irradiés ($p < 0,01$). Pour la radiothérapie réalisée à 35 keV, une augmentation de survie de 45% est observée en mode tomothérapie (Expérience 1), alors que pour l'irradiation en condition de faisceaux croisés l'augmentation de survie est de 87% et 55% (Expériences 2 et 3, respectivement). Pour les irradiations réalisées à 100 keV, les augmentations de survie par rapport aux groupes contrôles sont de 106% et 107% en rayonnement monochromatiques et polychromatiques respectivement ($p < 0,001$, par rapport aux contrôles). Les courbes de Kaplan-Meier sont représentées dans la Figure 4.3.2. Il n'y a pas de différence significative entre les irradiations en conditions monochromatiques et polychromatiques pour le faisceau de 100 keV ($p > 0,05$).

4.3.3. Effet de la radiothérapie combinée à l'injection de nanoparticules d'oxydes de fer

Dans un premier temps, nous allons présenter les résultats de l'essai préclinique réalisé après injection par CED des nanoparticules et irradiation à 35 keV ; puis les irradiations réalisées à 100 keV et enfin les résultats après injection des nanoparticules par voie IV et irradiation réalisée à 35 keV.

4.3.3.1. Radiothérapie à 35 keV avec injection de nanoparticules de fer.

La

Figure 4.3.5 représente les courbes de Kaplan-Meier des rats ayant reçu le traitement combiné de radiothérapie à 35 keV en tomothérapie avec les nanoparticules injectées en CED à une concentration de 1,8 mg/mL ; ou en faisceaux croisés avec les nanoparticules injectées en CED à 18 mg/mL et 32 mg/mL. Les résultats de survie et les tests statistiques par rapport aux contrôles irradiés sont indiqués dans le Tableau 4.3.3.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

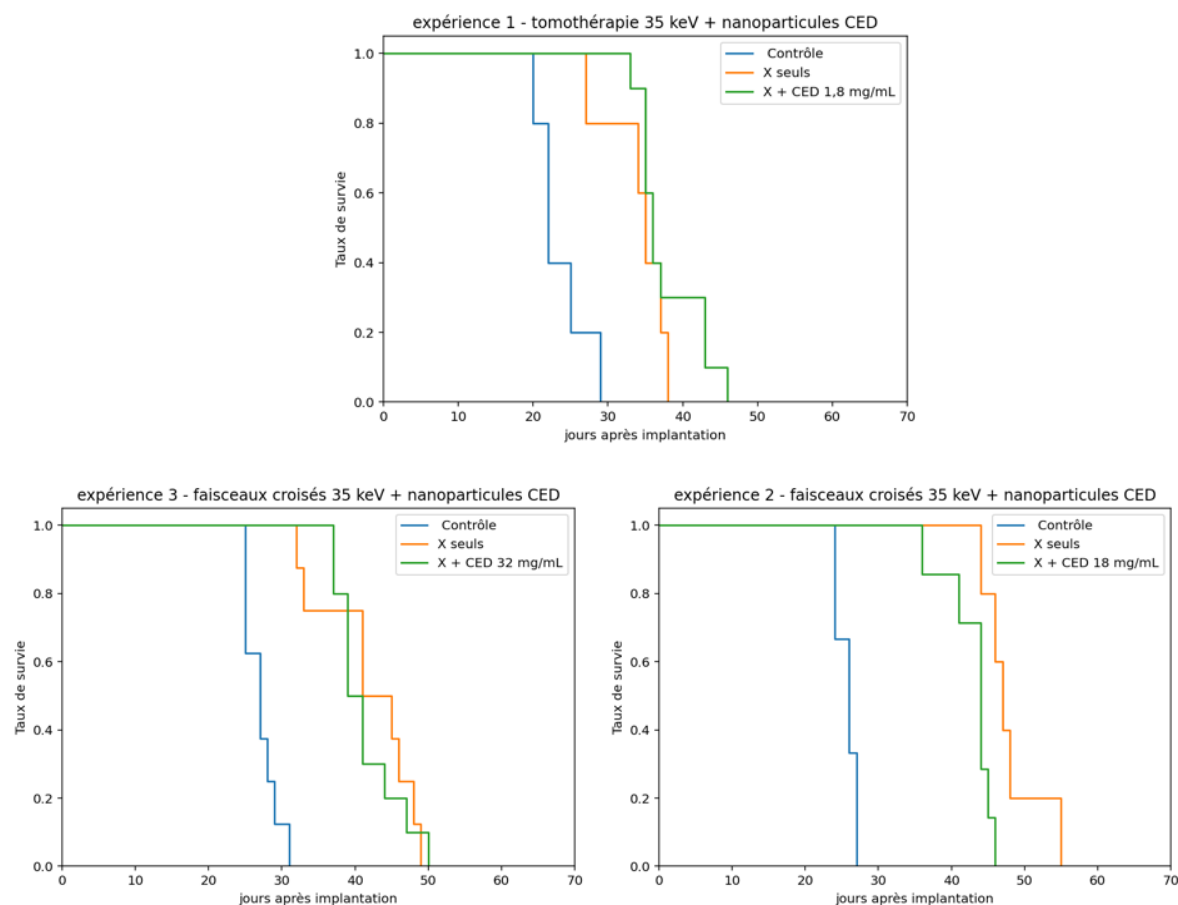


Figure 4.3.5 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy à 35 keV monochromatique en mode tomothérapie avec les nanoparticules d'oxyde de fer injectées par CED à une concentration de 1.8 mg/mL (expérience 1), en faisceaux croisés avec les nanoparticules d'oxyde de fer injectées par CED à une concentration de 18 mg/mL (expérience 2) et 32 mg/mL (expérience 3).

	Méthodes d'injection	Irradiation	N	Survie Médiane (j)	Survie Moyenne (j)	%ILS Médiane	%ILS Moyenne	Test Log-rank
Expérience 1	-	-	5	22,0	23,6	-	-	-
Expérience 2	-	-	8	26,0	25,7	-	-	-
Expérience 3	-	-	3	27,0	27,1	-	-	-
Expérience 1	-	Tomo	5	35,0	34,2	59%	45%	-
Expérience 2	-	Croisés	5	47,0	48,0	81%	87%	-
Expérience 3	-	Croisés	8	43,0	41,9	59%	55%	-
Expérience 1	CED 1,8 mg/mL	Tomo	10	36,0	37,9	64%	61%	0,25
Expérience 2	CED 18 mg/mL	Croisés	7	44,0	42,9	69%	67%	0,01
Expérience 3	CED 32 mg/mL	Croisés	10	40,0	41,4	48%	53%	0,76

Tableau 4.3.3 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu le traitement combiné de radiothérapie avec injection de nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en tomothérapie (tomo) de 35 keV ou en faisceaux croisés (croisés) aux énergies de 35 keV monochromatiques. Les rats ont reçu une injection par CED de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer aux concentrations notées dans le tableau. Les comparaisons et calculs d'augmentation de survie ont été réalisés par rapport au groupe contrôle « non traité » de chaque expérience. N: nombre d'animaux par groupe.

On n'observe pas d'accroissement significatif de la survie entre les groupes ayant reçu les traitements combinés de radiothérapie en présence de nanoparticules et les groupes irradiés seulement. Les différences des moyennes et des médianes de survie sont inférieures à 3 jours. Une toxicité significative ($p = 0,01$) est observée pour le groupe ayant reçu la radiothérapie en faisceaux croisés et les nanoparticules d'oxyde de fer à une concentration de 18 mg/mL par CED par rapport au groupe de rats irradiés seulement dans les mêmes conditions (Expérience 2), le groupe de rats irradiés seulement ayant une survie supérieure au groupe de rats recevant le traitement combiné.

4.3.3.2. Irradiation 100 keV monochromatiques faisceaux croisés et nanoparticules de fer injectées par CED à 1,8 mg/mL.

Les courbes de survie des rats ayant reçu une irradiation à 100 keV en faisceaux croisés monochromatiques, avec ou sans nanoparticules de fer, sont représentées Figure 4.3.6. Le débit de dose était de 0,4 Gy/ s. Les survies médianes sont de 43 jours pour les animaux ayant reçu les nanoparticules et de 45 jours pour ceux qui n'ont pas reçu les nanoparticules (Tableau 4.3.4). Un test de log-rank montre une différence significative ($p < 0,05$). L'ajout de nanoparticules a diminué la survie des animaux par rapport à l'irradiation seule.

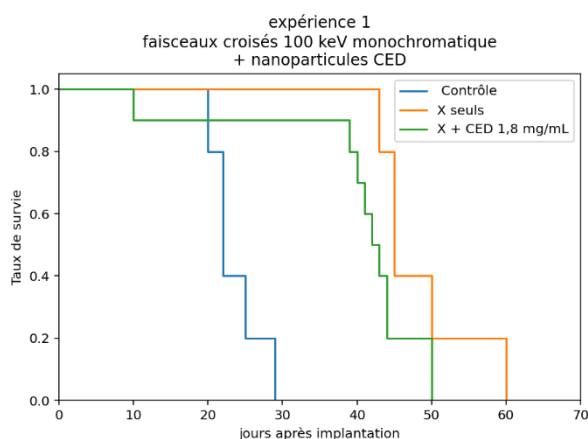


Figure 4.3.6 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy à 100 keV rayonnement monochromatique en faisceaux croisés avec (vert) ou sans (orange) nanoparticules d'oxyde de fer injectées en CED à la concentration de 1,8mg/mL.

4.3.3.3. Irradiation 100 keV polychromatiques faisceaux croisés et nanoparticules de fer injectées par CED à 1,8 mg/mL.

Les courbes de survie des rats ayant reçu une irradiation FLASH avec ou sans nanoparticules de fer sont représentées dans la Figure 4.3.7. Le débit de dose était de ~ 5000 Gy/s dans cette expérience. La survie médiane des animaux est de 45 jours pour les deux groupes d'animaux sans différence significative des survies ($p > 0,05$). Notons qu'un animal survit 70 jours lors de cette expérience dans le groupe ayant reçu les nanoparticules et la radiothérapie haut débit.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

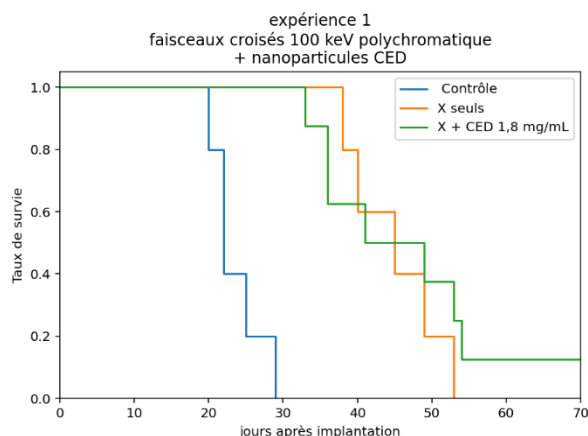


Figure 4.3.7 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy avec un faisceau polychromatique d'énergie équivalente à 100 keV (FLASH) en faisceaux croisés avec (vert) ou sans (orange) nanoparticules d'oxyde de fer injectées en CED à la concentration de 1,8mg/mL.

	Méthodes d'injection	Irradiation	N	Survie Médiane (j)	Survie Moyenne (j)	%ILS Médiane	%ILS Moyenne	Test Log-rank
Expérience 1	-	-	5	22,0	23,6	-	-	-
	-	Croisés 100 keV mono	5	45,0	48,6	104%	106%	-
	-	Croisés 100 keV poly	5	45,0	45,0	104%	91%	-
	CED 1,8 mg/mL	Croisés 100 keV mono	9	43,0	43,7	95%	85%	< 0,01
	CED 1,8 mg/mL	Croisés 100 keV poly	8	45,0	48,9	105%	107%	0,56

Tableau 4.3.4 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu le traitement combiné de radiothérapie avec injection de nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en faisceaux croisés (croisés) aux énergies de 35 keV et de 100 keV avec un faisceau monochromatique (mono) ou polychromatique (poly). Les rats ont reçu une injection par CED de 20 μ L de nanoparticules d'oxyde de fer, aux concentrations notées dans le tableau. N : nombre d'animaux par groupe.

4.3.3.4. Radiothérapie en faisceaux croisés à 35 keV avec injection IV de nanoparticules d'oxyde de fer.

Les courbes de survie des rats ayant reçu les nanoparticules par voie veineuse et une radiothérapie à 35 keV monochromatiques en mode tomothérapie et en faisceaux croisés sont représentées Figure 4.3.8.

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

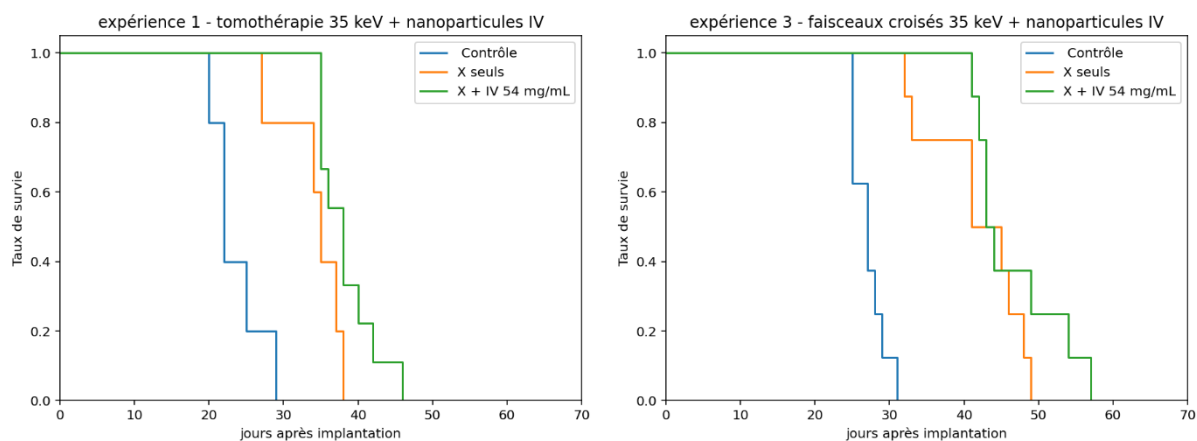


Figure 4.3.8 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy à 35 keV monochromatiques et des concentrations croissantes de nanoparticules d'oxyde de fer injectées en IV. (Irradiation en mode tomothérapie à gauche et faisceaux croisés à droite).

Groupe	Méthode d'injection	Irradiation	N	Survie Médiane (j)	Survie Moyenne (j)	%ILS Médiane	%ILS Moyenne	Test log-rank
Contrôle Non irradiés	-	-	5	22,0	23,6	-	-	-
Expérience 1	-	-	5	22,0	23,6	-	-	-
Expérience 3	-	-	3	27,0	27,1	-	-	-
Expérience 1	-	Tomo	5	35,0	34,2	59%	45%	-
Expérience 3	-	Croisés	8	43,0	41,9	59%	55%	-
Expérience 1	IV 54 mg/mL	Tomo	9	38,0	38,3	73%	62%	0,07
Expérience 3	IV 54 mg/mL	Croisés	9	43,0	44,4	59%	64%	0,22

Tableau 4.3.5 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu le traitement combiné de radiothérapie avec injection de nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en tomothérapie (tomo) ou en faisceaux croisés (croisés) à 35 keV avec un faisceau monochromatique. Les rats ont reçu une injection de nanoparticules d'oxyde de fer ou par IV de 1 mL à la concentration de 54 mg/mL.

Par rapport au groupe irradié seulement, on observe une augmentation de 12% de la survie moyenne pour le groupe irradié en mode tomothérapie après injection par voie veineuse des nanoparticules ($p = 0,07$). Lors de la seconde expérience, en mode faisceaux croisés, l'augmentation de la survie moyenne est de 6 % ($p = 0,22$). Bien que les survies soient augmentées après injection des nanoparticules par voie IV, par rapport aux irradiations seules, on n'atteint pas une différence significative à $p < 0,05$.

4.4. Discussion

Les conditions de nos expériences étaient sensiblement différentes des expériences réalisées antérieurement dans le laboratoire (J.-F. Adam et al. 2003 ; Julia Rousseau et al. 2010 ; Bobyk et al. 2013). En effet, usuellement 1000 cellules tumorales sont implantées, et le traitement est effectué au bout de 14 jours, soit 12 jours avant le temps de survie moyen des animaux. Dans nos expériences, nous avons implanté 5000 cellules tumorales, puis la radiothérapie a eu lieu 9 jours après l'implantation, soit 12 jours avant traitement.

La survie médiane des animaux sans radiothérapie est de 26 jours. Dans nos résultats nous observons que la survie des rats avec les nanoparticules d'oxydes de fer ne change pas significativement la survie des rats seuls. On n'a pas d'effet intrinsèque des nanoparticules de fer sur la survie des animaux à aucune concentration ni de toxicité.

Quatre conditions d'irradiations ont été testées. On observe une augmentation de survie significative des animaux avec l'irradiation par rapport aux animaux non irradiés. Cette augmentation de survie des animaux face aux rayons X ne change pas avec l'énergie ni avec un éventuel effet FLASH.

En revanche, on observe une diminution de la survie significative dans le cas d'une irradiation en tomothérapie. Cette technique implique d'irradier en étage l'animal puisque le rayonnement synchrotron n'a pas une hauteur suffisante pour irradier le champ désiré en entier. Les problèmes de recouvrement entre les différents étages d'irradiation provoquent des inhomogénéités qui sont sûrement responsables de la diminution de la survie.

Pour une injection de 1000 cellules tumorales dans le cerveau des animaux avec un traitement 14 jours après implantation (J.-F. Adam 2003), les survies augmentaient exponentiellement avec la dose (Figure 4.4.1). Dans notre étude nous avons implanté 5000 cellules ce qui dans notre modèle nous donne un volume tumoral équivalent au bout de 9 jours (dans ces 2 cas, le temps correspond à 12 jours avant la fin de survie sans traitement). Mais les survies observées dans notre expérience ne correspondent pas à ce qu'on s'attendrait par rapport à la progression observée pour l'injection de 1000 cellules, alors que le volume tumoral théorique au moment de l'irradiation est le même.

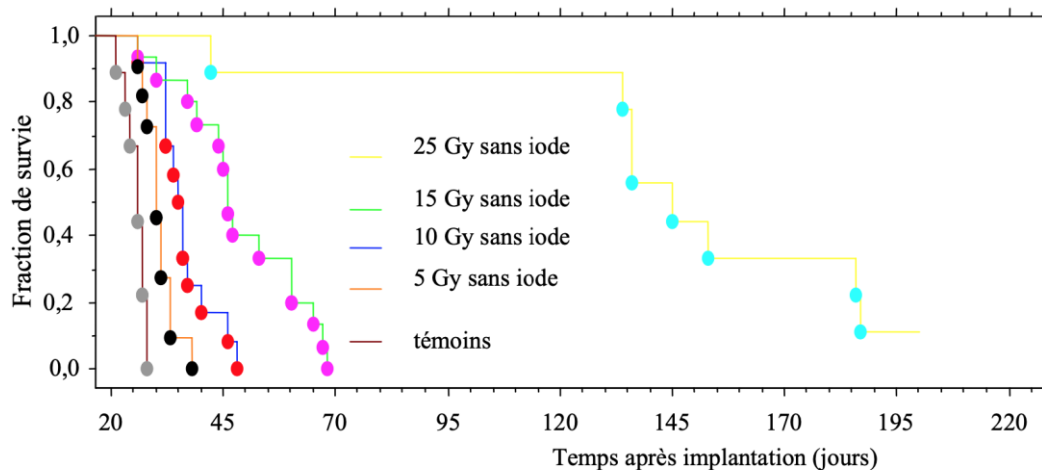


Figure 4.4.1 : Temps de survie théorique (d'après Adam 2003)

Pour chaque condition de radiothérapie, un traitement combiné avec injection de nanoparticules de fer a été testé. Avec une injection en CED, aucune augmentation significative de survie n'a été observée. Dans la dernière expérience, l'administration de nanoparticules à 18 mg/mL en CED montre une diminution non significative de la survie des animaux. Cette concentration correspond à celle de la solution mère. Dans le chapitre 2, les résultats obtenus en LIBS avec les nanoparticules d'oxyde de fer montrent que les nanoparticules sont transportées dans les tissus sains, ce qui pourrait provoquer un effet toxique. La CED permet d'avoir un renforcement de dose macroscopique, mais elle est sujette à la difficulté de distribuer correctement les nanoparticules dans la tumeur.

Le plan de traitement d'un des groupes d'animaux a été mis en place, et montre une corrélation entre l'augmentation de dose due aux nanoparticules dans la tumeur et la survie des animaux. Ces résultats sont encourageants, mais le nombre d'animaux étudié est petit (5 rats) et le coefficient de corrélation $R^2=0,58$ est relativement faible. Cependant, la survie des animaux de ce groupe ne surpasse pas celle des animaux ayant reçu la radiothérapie seule.

Les rats ayant reçu une injection IV combinée avec la radiothérapie montrent une amélioration non significative de la survie. Les résultats obtenus dans le Chapitre 2 ont montré la présence de nanoparticules dans le cerveau jusqu'à 24 h après injection IV. Ces nanoparticules ont pu créer une augmentation de la survie des rats par radiosensibilisation. Ces nanoparticules se sont accumulées dans la lésion d'implantation, cependant, nous n'avons pas pu montrer d'accumulation préférentielle dans la tumeur, ce qui limite l'efficacité des nanoparticules, puisqu'elles n'ont pas pu être internalisées par les cellules tumorales.

Lors de la dernière expérience, un nouveau protocole d'anesthésie a été instauré en préconisant l'utilisation de buprénorphine pour le bien-être des animaux après les opérations chirurgicales. Lors de l'établissement de ce protocole, 8 animaux sont décédés subitement, ce qui nous a fait chercher les causes de cet incident.

Le protocole d'anesthésie préimplantatoire consiste en une injection péritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine, la xylazine provoquant une importante dépression cardio-respiratoire. La buprénorphine a aussi comme effet secondaire, une dépression respiratoire. Lors de l'injection de buprénorphine post-chirurgical, les animaux, toujours anesthésiés, ont probablement subi une dépression respiratoire qui a été fatale pour un certain nombre d'entre eux. Un effet similaire a été observé précédemment. (Hedenqvist, Roughan, and Flecknell 1999; Roughan, Burzaco Ojeda, and Flecknell 2000). Dans ces études, les animaux ont été anesthésiés avec un mélange kétamine/médétomidine. La médétomidine est un médicament de la famille des alpha-2 agoniste, comme la xylazine. Dans ces études, les chercheurs ont observé que l'association entre cette méthode d'anesthésie avec l'injection de buprénorphine provoque un taux important de décès dus à une défaillance respiratoire. Ce protocole a été modulé en retardant l'administration de buprénorphine.

4.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats des essais précliniques réalisés chez des rats Fischer porteurs d'une tumeur cérébrale F98. Cette étude est, à notre

Méthodes physiques et études radiobiologiques pour la thérapie multimodale combinant irradiation synchrotron et injection de nanoparticules d'oxyde de fer

connaissance, la première étude de survie combinant nanoparticules d'oxyde de fer et radiothérapie pour le traitement du glioblastome.

Dans cette expérience, différentes conditions de traitement ont été évaluées. Si la radiothérapie a montré une augmentation de la survie des rats traités, les nanoparticules ne semblent pas avoir d'influence sur la survie.

Un résultat important de ce chapitre est une légère augmentation de la survie après une injection intraveineuse de nanoparticules combinée avec la radiothérapie. Ces résultats ne sont pas significatifs, mais montrent une piste de recherche possible, puisque les nanoparticules sont présentes dans le cerveau. La survie dépend des conditions d'irradiation, mais l'injection de nanoparticules ne montre pas d'effet. La survie est plus faible que ce qui est observé dans les études précédentes.

L'augmentation limitée de la survie due au renforcement de dose par les nanoparticules peut être expliquée par la distribution cérébrale de ces dernières, comme nous avons vu dans les précédents chapitres. Dans le chapitre suivant, nous allons mettre en relation les résultats observés dans une discussion générale.

Chapitre 5. Discussion Générale

Chapitre 5. Discussion Générale.....	173
5.1. Biodistribution des nanoparticules.....	173
5.2. Calcul de dose en présence de fer	175
5.3. Essais précliniques	177
5.4. Conclusion.....	178

Cette discussion générale va nous permettre de mettre en relation les résultats discutés dans chaque chapitre afin de dresser un bilan sur le travail effectué. Elle sera suivie d'une conclusion ouvrant sur les perspectives pour la radiothérapie combinée aux nanoparticules d'oxyde de fer.

5.1. Biodistribution des nanoparticules

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié la distribution des nanoparticules dans le cerveau de rat porteur d'un glioblastome F98. Nous avons étudié deux modes d'administration pour les nanoparticules d'oxyde de fer, l'injection intraveineuse (IV) et l'administration renforcée par convection (CED).

L'injection intraveineuse permet une administration pratique des nanoparticules, ce qui en fait le mode d'administration le plus aisé. Nous avons pu observer par IRM, la présence des nanoparticules dans le cerveau avec des concentrations de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$, 24 h après injection des nanoparticules. Ces résultats sont corrélés avec les mesures réalisées précédemment par Seo et al. (S.-J. Seo et al. 2013) (Tableau 5.1.1). Les nanoparticules restent longtemps dans la circulation sanguine et pourraient potentiellement s'accumuler dans la tumeur par effet EPR.

Nous avons mis en place des méthodes d'analyse de la distribution des nanoparticules après injection IV qui nous ont donné des résultats encourageants. Cependant à ce stade, les résultats ne montrent pas d'accumulation tumorale différente significative, comme nous l'attendions dû à l'effet EPR.

Une explication de ces résultats serait que les nanoparticules utilisées s'agglomèrent fortement, ce qui limite leur passage à travers la barrière hématoencéphalique. Une étude plus approfondie pourra être réalisée pour évaluer les conditions permettant d'optimiser l'accumulation tumorale. Un suivi par IRM quantitative pourrait être utilisé afin d'étudier les mécanismes qui influencent l'effet EPR des nanoparticules de fer. Parmi les facteurs pouvant exercer une influence sur l'agglomération, on peut citer le temps de conservation, la stabilité des nanoparticules qui dépend du revêtement de la nanoparticule, et enfin la sonication. (Reymond 2018; Hauser et al. 2016; Gimenez 2015a).

Référence	Nanoparticule	Concentration tumorale	Concentration injectée	Volume injecté	Masse injectée
Chapitre 2	Oxyde de Fer	>10 µg/mL	75 mg/mL	1 ml	75 mg
(S.-J. Seo et al. 2013)	Oxyde de Fer	37,6 µg/ml	25 mg/mL	Variable	300 mg/kg
	Oxyde de Fer	19,6 µg/ml	25 mg/mL	Variable	100 mg/kg

Tableau 5.1.1 : Synthèse des études mesurant la concentration tumorale de nanoparticules d'oxyde de fer chez le rat porteur d'une tumeur cérébrale, après injection des nanoparticules en IV.

Contrairement à l'injection IV, la CED est une technique invasive qui nécessite des manipulations complexes permettant l'administration locale d'une grande quantité de nanoparticules.

Lors de ces expériences, les nanoparticules avaient été synthétisées longtemps en avance et étaient fortement agglomérées. Ceci a rendu difficile le transport par convection créé par le système d'injection.

Lors de nos expériences, nous avons utilisé la méthode de spectrométrie d'émission atomique induite par laser (LIBS). Cette technique est une méthode efficace pour mesurer de faibles quantités de nanoparticules, mais c'est une technique utilisée en post-mortem, nécessitant de sacrifier l'animal pour étudier les tissus. Nous avons pu observer deux phénomènes dans les échantillons analysés par LIBS : une grande quantité de nanoparticules restent au lieu d'injection et seule une quantité faible de nanoparticules diffuse dans les tissus. Les nanoparticules ont également tendance à se diffuser dans les tissus offrant moins de résistance, comme la diffusion transversale dans le corps calleux.

La tomographie quantitative par rayons synchrotron avec contraste de phase nous a permis de suivre l'évolution temporelle des nanoparticules dans les tissus in vivo. Malheureusement, la limite de détection élevée de cette technique ne permet de suivre que les grandes quantités de nanoparticules, puisque le fer a un numéro atomique relativement faible. Nous avons pu voir que le volume de distribution était très dépendant de la concentration injectée. Les nanoparticules utilisées s'agglomèrent fortement. À cause de ce phénomène, la convection des nanoparticules dans le tissu cérébral reste limitée à une région autour du site d'injection. En effet, le volume de distribution des nanoparticules concentrées est de 20 mm³, alors que nous attendions un volume de distribution supérieur à 60 mm³, dû à la proportion du volume interstitiel.

Ce mode d'administration reste cependant la technique permettant d'amener dans la tumeur des concentrations de nanoparticules significatives pour faire de l'augmentation de dose physique.

Référence	Nanoparticule	Concentration tumorale	Concentration injectée	Volume injecté
Chapitre 2 Chapitre 3	Oxyde de Fer	17 mg/ml 10 mg/ml 2 mg/ml	32 mg/ml 32 mg/ml 18 mg/ml	20 µl
(Taupin 2013)	Gadolinium	3,41 mg/ml 3,84 mg/ml 3,64 mg/ml	22 mg/ml	5 µl
(Bobyk et al. 2013)	Or	5,0 mg/ml	25 mg/ml	5 µl
(Besse 2011)	Iode	34,03 mg/ml 32,45 mg/ml	100 mg/ml	20 µL
(Julia Rousseau et al. 2007)	Iode	20,20 mg/ml	100 mg/ml	5 µl
(Jordan et al. 2006)	Oxyde de Fer	Non mesuré	112 mg/ml	20 µl

Tableau 5.1.2 : Synthèse des études mesurant la concentration tumorale de nanoparticules d'oxyde de fer chez le rat porteur d'une tumeur cérébrale, après injection des nanoparticules en CED.

Différentes études utilisant des nanoparticules de fer, d'or et de gadolinium ont été réalisées, utilisant deux techniques différentes d'injection. Concernant les nanoparticules injectées en CED, on parvient à injecter des quantités de fer dans le même ordre de grandeur que ce qui est fait pour l'or et le gadolinium en nanoparticules dans la tumeur (Tableau 5.1.2).

En conclusion, ces deux méthodes d'administration ont été abordées et nous ont permis de connaître leur limite, mais aussi d'envisager des solutions. Ces expériences nous montrent que les nanoparticules utilisées ne sont pas adaptées pour l'injection intraveineuse, puisqu'elles ne s'accumulent pas suffisamment dans la tumeur. Une modification du revêtement des nanoparticules pourrait les rendre plus stables, afin de diminuer l'agglomération des nanoparticules et améliorer l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur. En outre, la CED est une technique permettant d'accumuler suffisamment de nanoparticules dans le cerveau, mais la distribution des nanoparticules est inégale. En utilisant des nanoparticules de plus petite taille, elles pourraient avoir une distribution plus homogène et ainsi mieux recouvrir la tumeur.

5.2. Calcul de dose en présence de fer

Dans le deuxième chapitre, nous avons mis en place une étude de planification de traitement. Nous avons étudié l'influence des nanoparticules sur la dose déposée dans la tumeur à l'aide de simulations sur GATE, une plateforme permettant de calculer la dose par simulation de Monte-Carlo. Deux expériences ont été réalisées à partir des images tomographiques des rats irradiés. Dans cette étude, nous cherchions à déterminer principalement la dose déposée dans la tumeur.

Les simulations effectuées en fonction des différents plans de traitement nous ont permis de visualiser la dose déposée dans le cerveau, premièrement, en fonction des balistiques d'irradiations étudiées, deuxièmement, en prenant en compte la présence des concentrations de nanoparticules mesurées par imagerie de rayons X. Afin de prendre en compte les différentes conditions d'irradiation utilisées dans les essais précliniques, deux géométries d'irradiations, en faisceaux croisés et en tomothérapie, ainsi que deux énergies différentes, 35 et 100 keV, ont été étudiées.

Nous avons commencé par des simulations dans un fantôme d'eau cylindrique pour étudier la sensibilité des rayons X aux nanoparticules. Cette expérience nous permet de confirmer la linéarité du renforcement de dose en fonction de la concentration des nanoparticules d'oxyde de fer jusqu'à 100 mg/mL de fer.

Nous avons ensuite utilisé des images tomographiques de rats dans les conditions d'irradiation pour simuler la dose reçue dans la tumeur. Les expériences précédentes réalisées à l'ESRF pour le renforcement de dose avec d'autres éléments ont été réalisées dans une seule condition d'irradiation. (Adam et al., 2006 ; Bobyk et al., 2013 ; Rousseau et al., 2010). Cette simulation était donc nécessaire afin de comparer la survie des différents groupes. Ces premières simulations nous ont permis d'observer des variations de la dose reçue à la tumeur en fonction de la géométrie d'irradiation. En effet, on observe une différence de 2 Gy entre l'irradiation par faisceaux croisés et la tomothérapie. Cette différence de dose à la tumeur permet d'expliquer la différence de survie entre ces 2 groupes dans les essais précliniques.

Des simulations ont ensuite été réalisées avec les nanoparticules et nous ont permis d'observer l'influence des nanoparticules d'oxyde de fer sur la distribution de dose macroscopique pour le mode d'administration en CED. La dose déposée dans les volumes ayant des nanoparticules est renforcée d'un facteur 2 en moyenne. Ces simulations montrent un fort impact des nanoparticules sur la distribution de dose observée. Cependant, ce facteur d'augmentation de dose ne se reflète pas avec la même intensité dans une étude de survie. Le faible changement d'augmentation de survie observé dans les études précliniques peut être dû à la distribution inégale des nanoparticules dans la tumeur.

Dans ces analyses, nous faisons l'hypothèse simplificatrice que la concentration de fer est considérée comme homogène dans les voxels pour le calcul de la dose. Cependant, nous savons que la distribution de dose dépend de la taille et de la répartition des nanoparticules. Des simulations prenant en compte l'oxyde de fer aux dimensions de la nanoparticule permettraient d'avoir des résultats plus proches de la réalité (Reymond 2018).

Le DEF est le facteur d'augmentation de dose induit par les nanoparticules. Il correspond au rapport entre la dose déposée en présence de nanoparticules et la dose sans nanoparticules dans le milieu.

Nous nous sommes placés dans la continuité de ces essais en utilisant des nanoparticules de fer.

Référence	Nanoparticules	DEF	Énergie	Concentration moyenne
Ocadiz	Fer	2,10	35 keV	Moyenne = 17 mg/ml
	Fer	1,11	100 keV	Moyenne = 17 mg/ml
(Magali Edouard 2010)	Iode	2,37	58 keV	10 mg/ml
	Gadolinium	2,27	58 keV	10 mg/ml
	Or	2,30	43 keV	10 mg/ml
Hwang, Kim, and Kim 2017)	Comparaison Fe, Au, Gd, I	<1,05	4 MV à 15 MV	7, 18, 30 mg/ml

Tableau 5.2.1 : Synthèse des calculs de DEF pour différentes nanoparticules réalisées avec des concentrations réalisables biologiquement.

Peu d'études de simulations ont été réalisées avec des nanoparticules de fer. Les études récentes réalisées avec des nanoparticules ont été faites avec des faisceaux ayant des énergies de l'ordre du MeV. (Martelli, 2020; Hwang, Kim, and Kim 2017). Les études réalisées avec des faisceaux de basse énergie ont essentiellement été réalisées sur les atomes de Z plus élevé comme le gadolinium ou l'or (Magali Edouard 2010). Si l'on considère les concentrations réellement observées dans la tumeur, le DEF du fer s'approche des valeurs de DEF mesuré pour les autres éléments analysés, pour l'énergie optimale de DEF.

5.3. Essais précliniques

Dans la dernière partie, nous avons réalisé des essais in vivo sur les rats porteurs de tumeurs F98. Ces expériences sont, à notre connaissance, la première étude de survie chez les rats porteurs de gliomes malins pour la radiothérapie avec renforcement de dose par les nanoparticules d'oxyde de fer.

Dans ces expériences, différentes conditions ont été testées, mais les résultats n'ont pas été à la hauteur du potentiel pressenti lors des études de planifications. Nous avons pu observer un renforcement de dose limité par rapport à l'irradiation seule. En effet, seul un groupe de rat ayant reçu les nanoparticules de fer en intraveineux a montré une augmentation qui s'approche du seuil de significativité sans pour autant l'atteindre ($p=0,07$). Les nanoparticules injectées en IV ont un potentiel de recouvrement tumoral élevé, mais la concentration qu'il est possible d'injecter est limitée. On peut cependant supposer que les nanoparticules sont internalisées par les cellules tumorales, permettant au niveau microdosimétrique une augmentation de la radiosensibilité des cellules tumorales. Des études microdosimétriques réalisées avec des nanoparticules de gadolinium montrent une augmentation de la dose déposée dans le noyau des cellules lorsque les nanoparticules sont internalisées par rapport à des nanoparticules en contact avec la membrane plasmique de la cellule. (Delorme et al., 2017). Des travaux comparatifs entre les nanoparticules d'oxyde de fer et de gadolinium ont montré que les nanoparticules de fer sont internalisées en plus grandes quantités dans les cellules tumorales que les nanoparticules de gadolinium (Reymond, 2018).

Pour les nanoparticules injectées par CED, les concentrations élevées utilisées n'ont pas permis de contrôler la tumeur mieux que l'irradiation seule. Il semblerait que le taux de recouvrement reste en deçà de ce qui est nécessaire pour une couverture thérapeutique. En effet, nous avons pu observer dans l'étude de distribution que la structure des nanoparticules empêchait la convection des nanoparticules dans le cerveau et donc dans la tumeur, rendant difficile d'avoir un recouvrement tumoral efficace. Le glioblastome F98 permet la croissance tumorale à partir d'un faible nombre de cellules ce qui le rend plus susceptible à une repousse tumorale dans le cas où l'irradiation serait imparfaite. De plus, le parcours des électrons secondaires, créés par les nanoparticules, est limité à une dizaine de μm . Cette distance correspondant approximativement au diamètre des cellules tumorales, les cellules qui ne sont pas au contact des nanoparticules ne sont probablement pas affectées par l'augmentation de dose due aux nanoparticules.

La structure des nanoparticules empêche un bon recouvrement tumoral, principalement à cause de la taille des agglomérats. Pour mieux valoriser la technique, il faut modifier les nanoparticules, les rendant plus stables afin de favoriser la diffusion passive dans les tissus.

Cette étude est à notre connaissance la première étude de traitement préclinique intracérébral de glioblastome de rat combinant nanoparticules d'oxyde de fer et rayonnement synchrotron. Cette spécificité apporte une complexité supplémentaire par rapport à d'autres études étudiant l'efficacité du renforcement de dose des nanoparticules d'oxyde de fer. Une étude récente a cependant montré une efficacité du traitement combiné de nanoparticules d'oxyde de fer avec la radiothérapie dans le cadre de tumeurs sous-cutanées de souris. (Russell et al. 2021). Cette étude a pu montrer une réduction significative de la croissance tumorale avec un traitement associant 50 μL de nanoparticules d'oxyde de fer à la concentration de 23,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec une irradiation de 12 Gy avec un faisceau polychromatique de 220 kVp (énergie moyenne = 113 keV).

5.4. Conclusion

En conclusion, nous avons réalisé dans le cadre de cette thèse le premier essai préclinique d'irradiation de glioblastomes par rayonnement synchrotron renforcé par les nanoparticules de fer. Nous avons mis en place des études *in vivo* et *in silico* permettant d'évaluer les facteurs influençant le traitement effectué. Malgré des résultats modérés en termes d'augmentation de survie pure, nous avons mis en place un protocole global permettant le suivi des nanoparticules et leur influence sur la distribution de dose. Ces études nous permettent de guider les recherches futures afin d'optimiser le traitement. Nous avons pu évaluer que le facteur principal limitant l'efficacité du traitement est l'agglomération des nanoparticules qui limite l'administration des nanoparticules autant en IV qu'en CED.

Les deux modes d'administration des nanoparticules ont chacun le potentiel d'obtenir une augmentation de survie. L'injection intraveineuse permet, d'une part, d'avoir une meilleure répartition des nanoparticules dans la tumeur, et d'autre part, un plus grand potentiel de transfert clinique dû à son caractère non invasif. Cependant, une injection locale permet d'atteindre de plus grandes concentrations intracérébrales et permet donc de profiter de la dépendance à la concentration de l'effet du renforcement de dose.

Les recherches futures devraient se concentrer sur la synthèse de nanoparticules stables avec un comportement prédictible. Les nanoparticules d'oxyde de fer dont nous disposions présentaient une forte agglomération, puisque leur diamètre hydrodynamique était supérieur à 100 nm. Ces limitations peuvent être contournées de différentes manières. Certes, on pourrait chercher à créer des nanoparticules avec des fonctionnalisations permettant de cibler les cellules tumorales ou les structures subcellulaires, cependant, travailler pour obtenir des nanoparticules biocompatibles stables de taille inférieures à 100 nm permettrait d'améliorer leur biodistribution cérébrale. De ce fait, un travail de caractérisation des nanoparticules permettrait de mieux comprendre comment optimiser la biodistribution de celles-ci.

Le travail réalisé dans cette thèse, qui prend en compte les expérimentations réalisées dans les travaux précédents, amène à de nouvelles pistes à suivre dans le traitement combiné utilisant les nanoparticules de fer. Il pose des bases pour de futures expérimentations ayant pour objectif un futur transfert clinique pour la radiothérapie synchrotron avec renforcement de dose par les nanoparticules de fer.

Bibliographie

- Abbott, N. Joan, Adjanie A. K. Patabendige, Diana E.M. Dolman, Siti R. Yusof, and David J. Begley. 2010. "Structure and Function of the Blood-Brain Barrier." *Neurobiology of Disease*. Neurobiol Dis. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
- Achrol, Achal Singh, Robert C Rennert, Carey Anders, Riccardo Soffietti, Manmeet S Ahluwalia, Lakshmi Nayak, Solange Peters, et al. 2019. "Brain Metastases." *Nature Reviews Disease Primers* 5 (1): 5. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0055-y>.
- Adam, Jean François, Marie Claude Biston, Aurélie Joubert, Anne Marie Charvet, Jean François le Bas, François Estève, and Hélène Elleaume. 2005. « Enhanced Delivery of Iodine for Synchrotron Stereotactic Radiotherapy by Means of Intracarotid Injection and Blood-Brain Barrier Disruption: Quantitative Iodine Biodistribution Studies and Associated Dosimetry. » *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 61 (4): 1173 – 82. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.12.026>.
- Adam, Jean-François. 2003. « Tumeurs Cérébrales et Rayonnement Synchrotron : Développements Méthodologiques En Imagerie Quantitative de La Perfusion et En Radiothérapie Renforcée Par Effet Photoélectrique. »
- Adam, Jean-François, Hélène Elleaume, Aurélie Joubert, Marie-Claude Biston, Anne-Marie Charvet, Jacques Balosso, Jean-François le Bas, and François Estève. 2003. « Synchrotron Radiation Therapy of Malignant Brain Glioma Loaded with an Iodinated Contrast Agent: First Trial on Rats Bearing F98 Gliomas. » *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 57 (5) : 1413 – 26. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2003.07.007>.
- Adam, Jean-François, Aurélie Joubert, Marie-Claude Biston, Anne-Marie Charvet, Michel Peoc'h, Jean-François le Bas, Jacques Balosso, François Estève, and Hélène Elleaume. 2006. « Prolonged Survival of Fischer Rats Bearing F98 Glioma after Iodine-Enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy. » *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 64 (2): 603 – 11. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2005.09.004>.
- Ahnesjö, Anders, and Maria Mania Aspradakis. 1999. "Dose Calculations for External Photon Beams in Radiotherapy." *Physics in Medicine and Biology* 44 (11): 99–155. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/44/11/201>.
- Akashi, Misturu, Takami Akagi, and Matsusaki Michiya. 2014. *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application*. *Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application*. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55139-3>.
- Ali, Attarad, Hira Zafar, Muhammad Zia, Ihsan ul Haq, Abdul Rehman Phull, Joham Sarfraz Ali, and Altaf Hussain. 2016. "Synthesis, Characterization, Applications, and Challenges of Iron Oxide Nanoparticles." *Nanotechnology, Science and Applications*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/NSA.S99986>.
- Allard, Emilie, Catherine Passirani, and Jean Pierre Benoit. 2009. "Convection-Enhanced Delivery of Nanocarriers for the Treatment of Brain Tumors." *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.003>.
- Amelio, Dante, Marcus Winter, Daniel Habermehl, Oliver Jäkel, Jurgen Debus, and Stephanie E. Combs. 2013. "Analysis of Inter- and Intrafraction Accuracy of a Commercial Thermoplastic Mask System Used for Image-Guided Particle

- Radiation Therapy." *Journal of Radiation Research* 54 (SUPPL.1). <https://doi.org/10.1093/jrr/rrr038>.
- Anja Sommer, Stefanie Klein. 2014. "Oxidized Silicon Nanoparticles and Iron Oxide Nanoparticles for Radiation Therapy." *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology* s2. <https://doi.org/10.4172/2324-8777.s2-002>.
- Arevalo, O. J., R. Valenzuela, Y. Esquenazi, M. Rao, B. Tran, J. Zhu, M. Bhattacharjee, N. Doyle, and R. F. Riascos. 2017. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Practical Approach for Gliomas, Part 2. Isocitrate Dehydrogenase Status—Imaging Correlation." *Neurographics* 7 (5): 344–49. <https://doi.org/10.3174/ng.9170231>.
- Askri, Dalel. 2018. « Etude de La Biodistribution et de La Toxicité Des Nanoparticules de Fer Chez Le Rat et Sur Une Lignée de Neuroblastome. » Université Grenoble Alpes ; Université de Carthage (Tunisie). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02384612>.
- Bailey, P, and HW Cushing. 1926. *Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenic Basis with a Correlated Study of Prognosis*. Philadelphia, PA, Lippincott.
- Barrett, Ann, Stephen Morris, Jane Dobbs, and Tom Roques. 2009. *Practical Radiotherapy Planning*. *Practical Radiotherapy Planning*. <https://doi.org/10.1201/b13373>.
- Barth, R. F., and B. Kaur. 2009. "Rat Brain Tumor Models in Experimental Neuro-Oncology: The C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 Gliomas." *Journal of Neuro-Oncology* 94 (3): 299. <https://doi.org/10.1007/S11060-009-9875-7>.
- Barth, Rolf F., Weilian Yang, Tianyao Huo, Kent J. Riley, Peter J. Binns, John C. Grecula, Nilendu Gupta, Julia Rousseau, and Hélène Elleaume. 2011. "Comparison of Intracerebral Delivery of Carboplatin and Photon Irradiation with an Optimized Regimen for Boron Neutron Capture Therapy of the F98 Rat Glioma." *Applied Radiation and Isotopes* 69 (12): 1813–16. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.03.019>.
- Bayart, Emilie, Frédéric Pouzoulet, Lucie Calmels, Jonathan Dadoun, Fabien Allot, Johann Plagnard, Jean Luc Ravanat, et al. 2017. "Enhancement of IUDR Radiosensitization by Low-Energy Photons Results from Increased and Persistent DNA Damage." *PLoS ONE* 12 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168395>.
- Beaumont, Marine, Benjamin Lemasson, Régine Farion, Christoph Segebarth, Chantal Rémy, and Emmanuel L. Barbier. 2009. "Characterization of Tumor Angiogenesis in Rat Brain Using Iron-Based Vessel Size Index MRI in Combination with Gadolinium-Based Dynamic Contrast-Enhanced MRI." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29 (10): 1714–26. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.86>.
- Benda, Philippe, James Lightbody, Gordon Sato, Lawrence Levine, and William Sweet. 1968. "Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture." *Science* 161 (3839): 370–71. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.370>.
- Berger, MJ. 1992. "ESTAR, PSTAR, and ASTAR: Computer Programs for Calculating Stopping-Power and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions."
- Bernal, Giovanna M., Michael J. LaRiviere, Nassir Mansour, Peter Pytel, Kirk E. Cahill, David J. Voce, Shijun Kang, et al. 2014. "Convection-Enhanced Delivery and in Vivo Imaging of Polymeric Nanoparticles for the Treatment of Malignant

- Glioma." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10 (1): 149–57. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.07.003>.
- Besse, Sebastien. 2011. "Écoulement et Transport Convectif Lors d'Injections Locales Dans Le Tissu Cérébral Sain et Tumoral : Quantifications Par Imagerie et Développements Prédicatifs."
- Biston, Marie-Claude, Aurélie Joubert, Jean-François Adam, Hélène Elleaume, Sylvain Bohic, Anne-Marie Charvet, François Estève, Nicolas Foray, and Jacques Balosso. 2004. "Cure of Fisher Rats Bearing Radioresistant F98 Glioma Treated with Cis-Platinum and Irradiated with Monochromatic Synchrotron X-Rays." *Cancer Research* 64 (7): 2317–23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3600>.
- Boateng, Francis, and Wilfred Ngwa. 2019. "Delivery of Nanoparticle-Based Radiosensitizers for Radiotherapy Applications." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (1): 273. <https://doi.org/10.3390/ijms21010273>.
- Bobyk, Laure. 2010. "Renforcement de La Dose Par Rayonnement Synchrotron et Atomes Lourds Dans Le Cadre Du Traitement Des Gliomes."
- Bobyk, Laure, Magali Edouard, Pierre Deman, Julia Rousseau, Jean François Adam, Jean Luc Ravanat, François Estève, Jacques Balosso, Rolf F. Barth, and Hélène Elleaume. 2012. "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 and Clinical Cancer Research* 31 (1). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-78>.
- Bobyk, Laure, Magali Edouard, Pierre Deman, Mathias Vautrin, Karin Pernet-Gallay, Julie Delaroche, Jean-François Adam, François Estève, Jean-Luc Ravanat, and Hélène Elleaume. 2013. "Photoactivation of Gold Nanoparticles for Glioma Treatment." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9 (7): 1089–97. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.04.007>.
- Bonvalot, Sylvie, Cécile le Pechoux, Thierry de Baere, Guy Kantor, Xavier Buy, Eberhard Stoeckle, Philippe Terrier, et al. 2017. « 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* 23 (4) : 908 – 17. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1297>.
- Bonvalot, Sylvie, Piotr L. Rutkowski, Juliette Thariat, Sébastien Carrère, Anne Ducassou, Marie Pierre Sunyach, P. Agoston, et al. 2019. « NBTXR3, a First-in-Class Radioenhancer Hafnium Oxide Nanoparticle, plus Radiotherapy versus Radiotherapy Alone in Patients with Locally Advanced Soft-Tissue Sarcoma (Act.In.Sarc): A Multicentre, Phase 2–3, Randomised, Controlled Trial. » *The Lancet Oncology* 20 (8) : 1148 – 59. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30326-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30326-2).
- Boucher, Yves, Laurence T Baxter, and Rakesh K. Jain. 1990. "Interstitial Pressure Gradients in Tissue-Isolated and Subcutaneous Tumors: Implications for Therapy." *Cancer Research* 50 (15): 4478–84. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/50/15/4478.short>.
- Boudou, Caroline. 2006. "Dosimétrie Pour La Radiothérapie stéréotaxique En Rayonnement Synchrotron : Calculs Monte-Carlo et Gels Radiosensibles." [Http://Www.Theses.Fr](http://www.theses.fr), January.
- Brauer-Krisch, Elke, Jean Francois Adam, Enver Alagoz, Stefan Bartzsch, Jeff Crosbie, Carlos DeWagter, Andrew Dipuglia, et al. 2015. "Medical Physics Aspects of the Synchrotron Radiation Therapies: Microbeam Radiation Therapy (MRT) and

- Synchrotron Stereotactic Radiotherapy (SSRT).” *Physica Medica* 31 (6): 568–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.04.016>.
- Bravin, Alberto, Paola Coan, and Pekka Suortti. 2013a. “X-Ray Phase-Contrast Imaging: From Pre-Clinical Applications towards Clinics.” *Physics in Medicine and Biology* 58 (1). <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/1/R1>.
- . 2013b. “X-Ray Phase-Contrast Imaging: From Pre-Clinical Applications towards Clinics.” *Physics in Medicine and Biology* 58 (1): R1–35. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/1/R1>.
- Burkart, Werner, Thomas Jung, and Gerhard Frasc. 1999. “Damage Pattern as a Function of Radiation Quality and Other Factors.” *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences — Serie III* 322 (2–3): 89–101. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(99\)80029-8](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(99)80029-8).
- Burns, William G., and Howard E. Sims. 1981. “Effect of Radiation Type in Water Radiolysis.” *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 77 (11): 2803–13. <https://doi.org/10.1039/F19817702803>.
- Cahoy, John D, Ben Emery, Amit Kaushal, Lynette C Foo, Jennifer L Zamanian, Karen S Christopherson, Yi Xing, et al. 2008. “A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function.” <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>.
- Calugaru, Valentin, Nicolas Magné, Joel Héroult, Sylvie Bonvalot, Christophe le Tourneau, and Juliette Thariat. 2015. “Nanoparticules et Radiothérapie.” *Bulletin Du Cancer* 102 (1): 83–91. <https://doi.org/10.1016/J.BULCAN.2014.10.002>.
- Castilho, Marcus S., Alexandre A. Jacinto, Gustavo A. Viani, Andre Campana, Juliana Carvalho, Robson Ferrigno, Paulo E. R. S. Novaes, Ricardo C. Fogaroli, and Joao v. Salvajoli. 2006. “Intensity Modulated Radiotherapy (IMRT) in the Postoperative Treatment of an Adenocarcinoma of the Endometrium Complicated by a Pelvic Kidney.” *Radiation Oncology* 1 (1). <https://doi.org/10.1186/1748-717X-1-44>.
- Chakrour, Rami Walid, Pengcheng Zhang, Ran Lin, Paula Schiapparelli, Alfredo Quinones-Hinojosa, and Honggang Cui. 2018. “Nanotherapeutic Systems for Local Treatment of Brain Tumors.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/wnan.1479>.
- Chargari, Cyrus, Nicolas Magne, Jean Baptiste Guy, Chloé Rancoule, Antonin Levy, Karyn A. Goodman, and Eric Deutsch. 2016. “Optimize and Refine Therapeutic Index in Radiation Therapy: Overview of a Century.” *Cancer Treatment Reviews*. W. B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.03.001>.
- Chatterjee, Dev Kumar, Li Shan Fong, and Yong Zhang. 2008. “Nanoparticles in Photodynamic Therapy: An Emerging Paradigm.” *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.003>.
- Chavanne, J., E. Chinchio, M. Diot, P. Elleaume, D. Frachon, X. Marechal, C. Mariaggi, and F. Revol. 1992. “Status of the European Synchrotron Radiation Facility Insertion Devices.” *Review of Scientific Instruments* 63 (1): 317–20. <https://doi.org/10.1063/1.1143805>.
- Chen, Kevin C., and Charles Nicholson. 2000. “Changes in Brain Cell Shape Create Residual Extracellular Space Volume and Explain Tortuosity Behavior during Osmotic Challenge.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* 97 (15): 8306–11.
<https://doi.org/10.1073/pnas.150338197>.
- Chen, Michael Y, Alan Hoffer, Paul F Morrison, John F Hamilton, Jeffrey Hughes, Kurt S Schlageter, Jeongwu Lee, Brandon R Kelly, and Edward H Oldfield. 2005. "Surface Properties, More than Size, Limiting Convective Distribution of Virus-Sized Particles and Viruses in the Central Nervous System." *Journal of Neurosurgery* 103 (2).
- Chen, Wei, and Jun Zhang. 2006. "Using Nanoparticles to Enable Simultaneous Radiation and Photodynamic Therapies for Cancer Treatment." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6 (4): 1159–66.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2006.327>.
- Cheng, Qinqin, and Yangzhong Liu. 2017. "Multifunctional Platinum-Based Nanoparticles for Biomedical Applications." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9 (2): e1410.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1410>.
- Chertok, Beata, Bradford A. Moffat, Allan E. David, Faquan Yu, Christian Bergemann, Brian D. Ross, and Victor C. Yang. 2008. "Iron Oxide Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle for MRI Monitored Magnetic Targeting of Brain Tumors." *Biomaterials* 29 (4): 487–96.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.050>.
- Cho, S. H. 2005. "Estimation of Tumor Dose Enhancement Due to Gold Nanoparticles During Typical Radiation Treatments: A Preliminary Monte Carlo Study." *Medical Physics* 32 (6): 2162. <https://doi.org/10.1118/1.1998660>.
- Choi, Gi-Hwan, Seung-Jun Seo, Ki-Hong Kim, Hong-Tae Kim, Sung-Hwan Park, Jae-Hong Lim, and Jong-Ki Kim. 2012. "Photon Activated Therapy (PAT) Using Monochromatic Synchrotron x-Rays and Iron Oxide Nanoparticles in a Mouse Tumor Model: Feasibility Study of PAT for the Treatment of Superficial Malignancy." *Radiation Oncology* 7 (1): 184. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-184>.
- Choi, Jinhyang, Hye Yeong Kim, Eun Jin Ju, Joohee Jung, Jaesook Park, Hye Kyung Chung, Jin Seong Lee, et al. 2012. "Use of Macrophages to Deliver Therapeutic and Imaging Contrast Agents to Tumors." *Biomaterials* 33 (16): 4195–4203.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.022>.
- Corde, Stéphanie. 2002. « Développement Méthodologique de l'application d'agents Pharmacologiques Renforcateurs de l'effet Photoélectrique Pour l'utilisation Du Rayonnement Synchrotron En Radiothérapie Anticancéreuse. » Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Cortajarena, Aitziber L, Daniel Ortega, Sandra M Ocampo, Alberto Gonzalez-García, Pierre Couleaud, Rodolfo Miranda, Cristobal Belda-Iniesta, and Angel Ayuso-Sacido. 2014. "Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings." *Nanobiomedicine* 1 (September): 2. <https://doi.org/10.5772/58841>.
- Cucinotto, Iole, Lucia Fiorillo, Simona Gualtieri, Mariamena Arbitrio, Domenico Ciliberto, Nicoletta Staropoli, Anna Grimaldi, et al. 2013. "Nanoparticle Albumin Bound Paclitaxel in the Treatment of Human Cancer: Nanodelivery Reaches Prime-Time?" Edited by Giuseppe de Rosa. *Journal of Drug Delivery* 2013:905,091. <https://doi.org/10.1155/2013/905091>.
- Dawson, P, M Penhaligon, E Smith, and J Saunders. 1988. "Synergistic Cytotoxicity of Iodinated Contrast Agents and X-Radiation." *Investigative Radiology* 23 Suppl 1: S110-3. <https://doi.org/10.1097/00004424-198809001-00012>.

- Delorme, Rachel. 2013. « Radiothérapie Par Photoactivation de Nanoparticules : Modélisation à l'Échelle Sub-Micrométrique et Comparaison Expérimentale. » Paris 11.
- Delorme, Rachel, Florence Taupin, Mélanie Flaender, Jean-Luc Ravanat, Christophe Champion, Mathieu Agelou, and Hélène Elleaume. 2017. "Comparison of Gadolinium Nanoparticles and Molecular Contrast Agents for Radiation Therapy-Enhancement." *Medical Physics* 44 (11): 5949–60. <https://doi.org/10.1002/mp.12570>.
- Dobrovolskaia, Marina A., and Scott E. McNeil. 2007. "Immunological Properties of Engineered Nanomaterials." *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.223>.
- Dormann, J. L. 1981. « Le Phénomène de Superparamagnétisme. » *Revue de Physique Appliquée* 16 (6): 275–301. <https://doi.org/10.1051/rphysap:01981001606027500>.
- Duc, Géraldine le, Stéphanie Corde, Anne-Marie Charvet, Hélène Elleaume, Régine Farion, Jean-François le Bas, and François Estève. 2004. « In Vivo Measurement of Gadolinium Concentration in a Rat Glioma Model by Monochromatic Quantitative Computed Tomography: Comparison Between Gadopentetate Dimeglumine and Gadobutrol. » *Investigative Radiology* 39 (7). https://journals.lww.com/investigativeradiology/Fulltext/2004/07000/In_Vivo_Measurement_of_Gadolinium_Concentration_in.1.aspx.
- Dyk, Jacob van. 1999. "The Modern Technology of Radiation Oncology A Compendium for Medical Physicists and Radiation Oncologists." www.medicalphysics.org.
- Edouard, M., D. Broggio, Y. Prezado, F. Estève, H. Elleaume, and J. F. Adam. 2010. "Treatment Plans Optimization for Contrast-Enhanced Synchrotron Stereotactic Radiotherapy." *Medical Physics* 37 (6Part1): 2445–56. <https://doi.org/10.1118/1.3327455>.
- Edouard, Magali. 2010. « Dosimétrie Pour La Radiothérapie stéréotaxique Par Rayonnement Synchrotron : D'une Vision Macroscopique Aux Considérations Microscopiques Des Dépôts d'énergie. »
- Elleaume, H., A. M. Charvet, P. Berkvens, G. Berruyer, T. Brochard, Y. Dabin, M. C. Dominguez, et al. 1999. « Instrumentation of the ESRF Medical Imaging Facility. » *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 428 (2): 513–27. [https://doi.org/10.1016/S0168-9002\(99\)00167-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9002(99)00167-9).
- Elleaume, H., A. M. Charvet, S. Corde, F. Estève, and J. F. le Bas. 2002. « Performance of Computed Tomography for Contrast Agent Concentration Measurements with Monochromatic X-Ray Beams: Comparison of K-Edge versus Temporal Subtraction. » *Physics in Medicine and Biology* 47 (18): 3369 – 85. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/47/18/307>.
- Elleaume, Hélène, Rolf F. Barth, Julia Rousseau, Laure Bobyk, Jacques Balosso, Weilian Yang, Tianyao Huo, and Robin Nakkula. 2020. "Radiation Therapy Combined with Intracerebral Convection-Enhanced Delivery of Cisplatin or Carboplatin for Treatment of the F98 Rat Glioma." *Journal of Neuro-Oncology* 149 (2): 193–208. <https://doi.org/10.1007/S11060-020-03600-X>.
- Elleaume, Pascal. 1992. "Insertion Devices for the New Generation of Synchrotron Sources: A Review." *Review of Scientific Instruments*. American Institute of Physics AIP. <https://doi.org/10.1063/1.1142744>.

- Emerit, J, C Beaumont, and F Trivin. 2001. "Iron Metabolism, Free Radicals, and Oxidative Injury." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 55 (6): 333–39. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)00068-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)00068-3).
- Favaudon, Vincent, Laura Caplier, Virginie Monceau, Frédéric Pouzoulet, Mano Sayarath, Charles Fouillade, Marie France Poupon, et al. 2014. « Ultrahigh Dose-Rate FLASH Irradiation Increases the Differential Response between Normal and Tumor Tissue in Mice. » *Science Translational Medicine* 6 (245) : 245ra93-245ra93. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008973>.
- Fleming, C. J., E. L.C. Salisbury, P. Kirwan, D. M. Painter, and R. S. Barnetson. 1996. "Chrysiasis after Low-Dose Gold and UV Light Exposure." *Journal of the American Academy of Dermatology* 34 (2 II): 349–51. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(07\)80006-5](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(07)80006-5).
- Friák, Martin, Arno Schindlmayr, and Matthias Scheffler. 2007. "Ab Initio Study of the Half-Metal to Metal Transition in Strained Magnetite." *New Journal of Physics* Volume 9 (January). <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1367-2630/9/1/005>.
- Gamarra, L. F., W. M. Pontuschka, E. Amaro, A. J. Costa-Filho, G. E. S. Brito, E. D. Vieira, S. M. Carneiro, D. M. Escriba, A. M. F. Falleiros, and V. L. Salvador. 2008. "Kinetics of Elimination and Distribution in Blood and Liver of Biocompatible Ferrofluids Based on Fe₃O₄ Nanoparticles: An EPR and XRF Study." *Materials Science and Engineering C* 28 (4): 519–25. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.06.005>.
- Gao, Huajian, Wendong Shi, and Lambert B. Freund. 2005. "Mechanics of Receptor-Mediated Endocytosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (27): 9469–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503879102>.
- Gaspar, Laurie E., Charles Scott, Kevin Murray, and Walter Curran. 2000. "Validation of the RTOG Recursive Partitioning Analysis (RPA) Classification for Brain Metastases." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 47 (4): 1001–6. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(00\)00547-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(00)00547-2).
- Gimenez, Paul. 2015a. "Radiotherapy by Photoactivation of Nanoparticles and Mössbauer Effect." Theses, Université Grenoble Alpes. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01235396>.
- . 2015b. "Radiotherapy by Photoactivation of Nanoparticles and Mössbauer Effect." Theses, Université Grenoble Alpes. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01235396v2>.
- Goutayer, Mathieu. 2008. "Nanoemulsion for Therapeutic or Diagnostic Agents Vectorisation: Biodistribution Study by in Vivo Fluorescence Imaging." Theses, Université Pierre et Marie Curie — Paris VI. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00811983>.
- Green, Dave. 2015. "Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Body Radiation Therapy." *Journal of Radiotherapy in Practice* 14 (1): 105–6. <https://doi.org/DOI:10.1017/S146039691400048X>.
- Greenwood, N N, and A Earnshaw. 1997. "Iron, Ruthenium and Osmium." In *Chemistry of the Elements*, 1070–1112. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-3365-9.50031-6>.
- Grosu, Anca Ligia, Anca Ligia Grosu, Lars Frings, Lars Frings, Iryna Bentsalo, Oliver Oehlke, Oliver Oehlke, et al. 2020. « Whole-Brain Irradiation with Hippocampal Sparing and Dose Escalation on Metastases: Neurocognitive Testing and Biological Imaging (HIPPORAD)—A Phase II Prospective Randomized

- Multicenter Trial (NOA-14, ARO 2015-3, DTK-ROG).» *BMC Cancer*.
<https://doi.org/10.1186/s12885-020-07011-z>.
- Gupta, Ajay Kumar, and Adam S. G. Curtis. 2004. "Surface Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Interaction Studies with Human Fibroblasts in Culture." In *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15:493–96. Springer.
<https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000021126.32934.20>.
- Hainfeld, James F., Sharif M. Ridwan, Yaroslav Stanishevskiy, Rahul Panchal, Daniel N. Slatkin, and Henry M. Smilowitz. 2019. "Iodine Nanoparticles Enhance Radiotherapy of Intracerebral Human Glioma in Mice and Increase Efficacy of Chemotherapy." *Scientific Reports* 9 (1): 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41174-5>.
- Hainfeld, James F., Daniel N. Slatkin, and Henry M. Smilowitz. 2004. "The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice." *Physics in Medicine and Biology* 49 (18): N309. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/18/N03>.
- Hainfeld, James F., Henry M. Smilowitz, Michael J. O'connor, Farrokh Avraham Dilmanian, and Daniel N. Slatkin. 2013. "Gold Nanoparticle Imaging and Radiotherapy of Brain Tumors in Mice." *Nanomedicine* 8 (10): 1601–9. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.165>.
- Hanaor, Dorian, Marco Michelazzi, Cristina Leonelli, and Charles C. Sorrell. 2012. "The Effects of Carboxylic Acids on the Aqueous Dispersion and Electrophoretic Deposition of ZrO₂." *Journal of the European Ceramic Society* 32 (1): 235–44. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2011.08.015>.
- Hanif, Farina, Kanza Muzaffar, Kahkashan Perveen, Saima M. Malhi, and Shabana U. Simjee. 2017. "Glioblastoma Multiforme: A Review of Its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>.
- Hauser, Anastasia K, Mihail I Mitov, Emily F Daley, Ronald C McGarry, Kimberly W Anderson, and J Zach Hilt. 2016. "Targeted Iron Oxide Nanoparticles for the Enhancement of Radiation Therapy." *Biomaterials* 105:127–35. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.032>.
- Hedenqvist, P., J. v. Roughan, and P. A. Flecknell. 1999. "The Influence of Pre-Anaesthetic Administration of Buprenorphine on the Anaesthetic Effects of Ketamine/Medetomidine and Pentobarbitone in Rats and the Consequences of Repeated Anaesthesia." *Laboratory Animals* 33 (3): 234–42. <https://doi.org/10.1258/002367799780578183>.
- Hoskins, Clare. 2014. "The Use of Iron Oxide Nanoparticles for Pancreatic Cancer Therapy." *Journal of Nanomedicine Research* 1 (1). <https://doi.org/10.15406/jnmr.2014.01.00004>.
- Hsu, Chia Yen, Ching Wen Chen, Hsiu Ping Yu, Yan Fu Lin, and Ping Shan Lai. 2013. "Bioluminescence Resonance Energy Transfer Using Luciferase-Immobilized Quantum Dots for Self-Illuminated Photodynamic Therapy." *Biomaterials* 34 (4): 1204–12. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.044>.
- Huang, Chien Wen, Yao Wu Hao, James Nyagilo, Digant P Dave, Li Feng Xu, and Xian Kai Sun. 2010. "Porous Hollow Gold Nanoparticles for Cancer SERS Imaging." *Journal of Nano Research* 10:137–48. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.10.137>.

- Huang, Xiaohua, Ivan H. El-Sayed, Wei Qian, and Mostafa A. El-Sayed. 2006. "Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods." *Journal of the American Chemical Society* 128 (6): 2115–20. <https://doi.org/10.1021/ja057254a>.
- Huang, Xiaohua, Prashant K. Jain, Ivan H. El-Sayed, and Mostafa A. El-Sayed. 2008. "Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles." *Lasers in Medical Science*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>.
- Hunt Bobo, R., Douglas W. Laske, Aytac Akbasak, Paul F. Morrison, Robert L. Dedrick, and Edward H. Oldfield. 1994. "Convection-Enhanced Delivery of Macromolecules in the Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (6): 2076–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2076>.
- Hwang, Chulhwan, Ja Mee Kim, and JungHoon Kim. 2017. "Influence of Concentration, Nanoparticle Size, Beam Energy, and Material on Dose Enhancement in Radiation Therapy." *Journal of Radiation Research* 58 (4): 405–11. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx009>.
- ICRU. 1994. "Prescribing, Recording, and Reporting Photon Beam Therapy (Report 50)." <https://icru.org/home/reports/prescribing-recording-and-reporting-photon-beam-therapy-report-50>.
- ISO/TS 80004-2:2015 (fr). 2015. "Nanotechnologies — Vocabulaire — Partie 2 : Nano-Objets." *International Organization for Standardization*.
- Iwamoto, K. S., A. Norman, D. B. Freshwater, M. Ingram, and R. G. Skillen. 1993. "Diagnosis and Treatment of Spontaneous Canine Brain Tumors with a CT Scanner." *Radiotherapy and Oncology* 26 (1): 76–78. [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(93\)90,030-C](https://doi.org/10.1016/0167-8140(93)90,030-C).
- Iwamoto, K. S., A. Norman, A. R. Kagan, M. Wollin, A. Olch, J. Bellotti, M. Ingram, and R. G. Skillen. 1990. "The CT Scanner as a Therapy Machine." *Radiotherapy and Oncology* 19 (4): 337–43. [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(90\)90,034-T](https://doi.org/10.1016/0167-8140(90)90,034-T).
- Iyer, Arun K., Greish Khaled, Jun Fang, and Hiroshi Maeda. 2006. "Exploiting the Enhanced Permeability and Retention Effect for Tumor Targeting." *Drug Discovery Today*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.07.005>.
- Jacinto, Filipe v., and Manel Esteller. 2007. "MGMT Hypermethylation: A Prognostic Foe, a Predictive Friend." *DNA Repair* 6 (8): 1155–60. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.03.013>.
- Jain, Rakesh K., and Laurence T. Baxter. 1988. "Mechanisms of Heterogeneous Distribution of Monoclonal Antibodies and Other Macromolecules in Tumors: Significance of Elevated Interstitial Pressure." *Cancer Research* 48:7022–32. https://cancerres.aacrjournals.org/content/48/24_Part_1/7022.short.
- Jain, Rakesh K., Emmanuelle di Tomaso, Dan G. Duda, Jay S. Loeffler, A. Gregory Sorensen, and Tracy T. Batchelor. 2007. "Angiogenesis in Brain Tumours." *Nature Reviews Neuroscience*. Nat Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1038/nrn2175>.
- Jain, Tapan K, Maram K Reddy, Marco A Morales, Diandra L Leslie-Pelecky, and Vinod Labhasetwar. 2008. "Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats." *Molecular Pharmaceutics* 5 (2): 316–27. <https://doi.org/10.1021/mp7001285>.
- Jan, S, D Benoit, E Becheva, T Carlier, F Cassol, P Descourt, T Frisson, et al. 2011. « GATE V6: A Major Enhancement of the GATE Simulation Platform Enabling

- Modelling of CT and Radiotherapy. » *PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY Phys. Med. Biol* 56:881—901. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/56/4/001>.
- Jeon, Jae Kun, Sung Mi Han, and Jong Ki Kim. 2016. "Fluorescence Imaging of Reactive Oxygen Species by Confocal Laser Scanning Microscopy for Track Analysis of Synchrotron X-Ray Photoelectric Nanoradiator Dose: X-Ray Pump-Optical Probe." *Journal of Synchrotron Radiation* 23:1191–96. <https://doi.org/10.1107/S1600577516009103>.
- Jeon, Jae Kun, Sung Mi Han, Soon Ki Min, Seung Jun Seo, Kyuwook Ihm, Won Seok Chang, and Jong Ki Kim. 2016. "Coulomb Nanoradiator-Mediated, Site-Specific Thrombolytic Proton Treatment with a Traversing Pristine Bragg Peak." *Scientific Reports* 6 (November): 37,848. <https://doi.org/10.1038/srep37848>.
- Jeon, Jae Kun, and Jong Ki Kim. 2018. "Track Analysis of a Synchrotron X-Ray Photoelectric Nanoradiator by in Situ Fluorescence Imaging of Reactive Oxygen Species: Comparative Study of Gold and Iron Oxide Nanoparticles." *Journal of Synchrotron Radiation* 25 (6): 1768–73. <https://doi.org/10.1107/S1600577518011396>.
- Jordan, Andreas, Regina Scholz, Klaus Maier-Hauff, Frank K.H. van Landeghem, Norbert Waldoefner, Ulf Teichgraeber, Jens Pinkernelle, et al. 2006. "The Effect of Thermotherapy Using Magnetic Nanoparticles on Rat Malignant Glioma." *Journal of Neuro-Oncology* 78 (1): 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-9059-z>.
- Kang, Seong Hee, Seong Pyo Hong, and Bo Sun Kang. 2018. "Targeting Chemo-Proton Therapy on C6 Cell Line Using Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Folate and Paclitaxel." *International Journal of Radiation Biology* 94 (11): 1006–16. <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1495854>.
- Karim, Reatul, Claudio Palazzo, Brigitte Evrard, and Geraldine Piel. 2016. "Nanocarriers for the Treatment of Glioblastoma Multiforme: Current State-of-the-Art." *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.026>.
- Keshavarz, Sajad, and Dariush Sardari. 2019. "Different Distributions of Gold Nanoparticles on the Tumor and Calculation of Dose Enhancement Factor by Monte Carlo Simulation." *Nuclear Energy and Technology* 5 (4): 361–71. <https://doi.org/10.3897/nucet.5.39096>.
- Kim, Hong-Tae, Ki-Hong Kim, Gi-Hwan Choi, Sanghoon Jheon, Sung-Hwan Park, Bong-Il Kim, Kazuyuki Hyodo, Masami Ando, and Jong-Ki Kim. 2009. "Photodynamic Synchrotron X-Ray Therapy in Glioma Cell Using Superparamagnetic Iron Nanoparticle." In *Photodynamic Therapy: Back to the Future*, edited by David H. Kessel, 7380:73802P. SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.822919>.
- Kim, Jong Ki, Seung Jun Seo, Hong Tae Kim, Ki Hong Kim, Myung Hwan Chung, Kye Ryung Kim, and Sung Jun Ye. 2012. "Enhanced Proton Treatment in Mouse Tumors through Proton Irradiated Nanoradiator Effects on Metallic Nanoparticles." *Physics in Medicine and Biology* 57 (24): 8309–23. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/24/8309>.
- Kim, Jong Ki, Seung Jun Seo, Ki Hong Kim, Tae Jeong Kim, Myung Hwan Chung, Kye Ryung Kim, and Tae Keun Yang. 2010. "Therapeutic Application of Metallic Nanoparticles Combined with Particle-Induced x-Ray Emission Effect." *Nanotechnology* 21 (42): 425,102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/42/425102>.

- Klein, Stefanie, Anja Sommer, Luitpold V.R. Distel, Jean Louis Hazemann, Wolfgang Kröner, Winfried Neuhuber, Paul Müller, Olivier Proux, and Carola Kryschi. 2014. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Novel X-Ray Enhancer for Low-Dose Radiation Therapy." *Journal of Physical Chemistry B* 118 (23): 6159–66. <https://doi.org/10.1021/jp5026224>.
- Klein, Stefanie, Anja Sommer, Luitpold V.R. Distel, Winfried Neuhuber, and Carola Kryschi. 2012. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Radiosensitizer via Enhanced Reactive Oxygen Species Formation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425 (2): 393–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.108>.
- Kleinauskas, Andrius, Jong-Ki Kim, Gi-Hwan Choi, Hong-Tae Kim, Kathrine Røe, and Petras Juzenas. 2012. "Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles for Cancer Theranostics." *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology* 1 (4): 271–83. <https://doi.org/10.1166/rnn.2012.1018>.
- Komori, Takashi. 2017. "The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision." *Neurologia Medico-Chirurgica* 57 (7): 301–11. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2017-0010>.
- Korchinski, Daniel J, May Taha, Runze Yang, Nabeela Nathoo, and Jeff F Dunn. 2015a. "Iron Oxide as an MRI Contrast Agent for Cell Tracking." *Magnetic Resonance Insights* 8 (S1) : 15 – 29. <https://doi.org/10.4137/MRI.S23557.TYPE>.
- Korchinski, Daniel J., May Taha, Runze Yang, Nabeela Nathoo, and Jeff F. Dunn. 2015b. "Iron Oxide as an Mri Contrast Agent for Cell Tracking: Supplementary Issue." *Magnetic Resonance Insights* 8s1 (January) : MRI.S23557. <https://doi.org/10.4137/mri.s23557>.
- Kornberg, Tiffany, Todd Stueckle, James Antonini, Yon Rojanasakul, Vincent Castranova, Yong Yang, and Liying Wang. 2017. "Potential Toxicity and Underlying Mechanisms Associated with Pulmonary Exposure to Iron Oxide Nanoparticles: Conflicting Literature and Unclear Risk." *Nanomaterials* 7 (10): 307. <https://doi.org/10.3390/nano7100307>.
- Krauze, Michal T., Ryuta Saito, Charles Noble, Matyas Tamas, John Bringas, John W. Park, Mitchel S. Berger, and Krystof Bankiewicz. 2005. "Reflux-Free Cannula for Convection-Enhanced High-Speed Delivery of Therapeutic Agents." *Journal of Neurosurgery* 103 (5): 923–29. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.103.5.0923>.
- Krishnan, Jan Schuemann and Alexander Bagley and Ross Berbeco and Kyle Bromma and Karl T Butterworth and Hilary Byrne and Devika B Chithrani and Sang Hyun Cho and Jason R Cook and Vincent Favaudon and Yaser Hadi Gholami and Elisabetta Gargioni and James F Hainfeld. 2020. "Roadmap for Metal Nanoparticles in Radiation Therapy: Current Status, Translational Challenges, and Future Directions." *Physics in Medicine & Biology*. <http://iopscience.iop.org/10.1088/1361-6560/ab9159>.
- Kros, Johan M., Thierry Gorlia, Mathilde C. Kouwenhoven, Ping-Pin Zheng, V. Peter Collins, Dominique Figarella-Branger, Felice Giangaspero, et al. 2007. "Panel Review of Anaplastic Oligodendroglioma From European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 26,951." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66 (6): 545–51. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000263869.84188.72>.
- Krukemeyer, MG, V Krenn, Wagner W, and Resch R. 2015. "History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress." *J*

- Nanomed Nanotechnol* 6 (6): 336. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000336>.
- La Fuente Herman, Tania de, Salahuddin Ahmad, and Maria T. Vlachaki. 2010. "Intensity Modulated Radiation Therapy versus Three Dimensional Conformal Radiation Therapy for Treatment of High Grade Glioma: A Radiobiological Modeling Study." *Journal of X-Ray Science and Technology* 18 (4): 393–402. <https://doi.org/10.3233/XST-2010-0270>.
- Lei, Cheng, Yuqing Sun, Daniel C. W. Tsang, and Daohui Lin. 2018. "Environmental Transformations and Ecological Effects of Iron-Based Nanoparticles." *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.052>.
- Li, Winnie, Gregory Bootsma, Oscar von Schultz, Per Carlsson, Normand Laperriere, Barbara-Ann Millar, David Jaffray, and Caroline Chung. 2016. "Preliminary Evaluation of a Novel Thermoplastic Mask System with Intra-Fraction Motion Monitoring for Future Use with Image-Guided Gamma Knife." *Cureus* 8 (3). <https://doi.org/10.7759/cureus.531>.
- Li, Xue, Erika Porcel, Mario Menendez-Miranda, Jingwen Qiu, Xiaomin Yang, Christian Serre, Alexandra Pastor, Didier Desmaële, Sandrine Lacombe, and Ruxandra Gref. 2020. "Highly Porous Hybrid Metal—Organic Nanoparticles Loaded with Gemcitabine Monophosphate: A Multimodal Approach to Improve Chemo- and Radiotherapy." *ChemMedChem* 15 (3): 274–83. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900596>.
- Liang, Minmin, Xinrong Liu, Dengfeng Cheng, Guozheng Liu, Shuping Dou, Yi Wang, Mary Rusckowski, and Donald J. Hnatowich. 2010. "Multimodality Nuclear and Fluorescence Tumor Imaging in Mice Using a Streptavidin Nanoparticle." *Bioconjugate Chemistry* 21 (7): 1385–88. <https://doi.org/10.1021/bc100081h>.
- Liao, Feng, Yasukazu Saitoh, and Nobuhiko Miwa. 2011. "Anticancer Effects of Fullerene [C60] Included in Polyethylene Glycol Combined with Visible Light Irradiation through ROS Generation and DNA Fragmentation on Fibrosarcoma Cells with Scarce Cytotoxicity to Normal Fibroblasts." *Oncology Research* 19 (5): 203–16. <https://doi.org/10.3727/096504011X12970940207805>.
- Liu, Jian, Shin ichi Ohta, Akinaga Sonoda, Masatoshi Yamada, Masaya Yamamoto, Norihisa Nitta, Kiyoshi Murata, and Yasuhiko Tabata. 2007. "Preparation of PEG-Conjugated Fullerene Containing Gd³⁺ Ions for Photodynamic Therapy." *Journal of Controlled Release* 117 (1): 104–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.008>.
- Liu, Peidang, Zhihai Huang, Zhongwen Chen, Ruizhi Xu, Hao Wu, Fengchao Zang, Cailian Wang, and Ning Gu. 2013. "Silver Nanoparticles: A Novel Radiation Sensitizer for Glioma?" *Nanoscale* 5 (23): 11,829–36. <https://doi.org/10.1039/c3nr01351k>.
- Loo, Christopher, Alex Lin, Leon Hirsch, Min-Ho Lee, Jennifer Barton, Naomi Halas, Jennifer West, and Rebekah Drezek. 2004. "Nanoshell-Enabled Photonics-Based Imaging and Therapy of Cancer." *Technology in Cancer Research & Treatment* 3 (1): 33–40. <https://doi.org/10.1177/153303460400300104>.
- Louis, David N., Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee, Peter C. Burger, Anne Jouvett, Bernd W. Scheithauer, and Paul Kleihues. 2007. "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System." *Acta Neuropathologica*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>.

- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, and David W. Ellison. 2016. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Lucky, Sasidharan Swarnalatha, Khee Chee Soo, and Yong Zhang. 2015. "Nanoparticles in Photodynamic Therapy." *Chemical Reviews*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr5004198>.
- Lux, François, Lucie Sancey, Andrea Bianchi, Yannick Crémillieux, Stéphane Roux, and Olivier Tillement. 2015. "Gadolinium-Based Nanoparticles for Theranostic MRI-Radiosensitization." *Nanomedicine*. Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.30>.
- Madsen, Steen J., Catherine Christie, Seok Jin Hong, Anthony Trinidad, Qian Peng, Francisco A. Uzal, and Henry Hirschberg. 2015. "Nanoparticle-Loaded Macrophage-Mediated Photothermal Therapy: Potential for Glioma Treatment." *Lasers in Medical Science* 30 (4): 1357–65. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1742-5>.
- Mahmoudi, Keon, Alexandros Bouras, Dominique Bozec, Robert Ivkov, and Constantinos Hadjipanayis. 2018. "Magnetic Hyperthermia Therapy for the Treatment of Glioblastoma: A Review of the Therapy's History, Efficacy and Application in Humans." *International Journal of Hyperthermia*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/02656736.2018.1430867>.
- Maier-Hauff, Klaus, Frank Ulrich, Dirk Nestler, Hendrik Niewhoff, Peter Wust, Burghard Thiesen, Helmut Orawa, Volker Budach, and Andreas Jordan. 2011. "Efficacy and Safety of Intratumoral Thermotherapy Using Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy on Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme." *Journal of Neuro-Oncology* 103 (2): 317–24. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>.
- Manolopoulos, S., C. Wojnecki, S. Green, R. P. Hugtenburg, and B. Jones. 2009. "Treatment Planning for a Synchrotron-Based Radiotherapy Modality." *Applied Radiation and Isotopes* 67 (3): 492–94. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2008.08.005>.
- Mappes, Timo, Norbert Jahr, Andrea Csaki, Nadine Vogler, Jürgen Popp, and Wolfgang Fritzsche. 2012. "The Invention of Immersion Ultramicroscopy in 1912-The Birth of Nanotechnology?" *Angewandte Chemie - International Edition*. Angew Chem Int Ed Engl. <https://doi.org/10.1002/anie.201204688>.
- Martelli, Stefano, and James C. L. Chow. 2020. "Dose Enhancement for the Flattening-Filter-Free and Flattening-Filter Photon Beams in Nanoparticle-Enhanced Radiotherapy: A Monte Carlo Phantom Study." *Nanomaterials* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/nano10040637>.
- Martínez-Rovira, I, J Sempau, and Y Prezado. 2012. "Monte Carlo-Based Treatment Planning System Calculation Engine for Microbeam Radiation Therapy." *Med. Phys.* 39 (5): 2829–38.
- Mayer, Kathryn M., and Jason H. Hafner. 2011. "Localized Surface Plasmon Resonance Sensors." *Chemical Reviews*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr100313v>.
- McMahon, Stephen J., Wendy B. Hyland, Mark F. Muir, Jonathan A. Coulter, Suneil Jain, Karl T. Butterworth, Giuseppe Schettino, et al. 2011. "Biological Consequences

- of Nanoscale Energy Deposition near Irradiated Heavy Atom Nanoparticles.” *Scientific Reports* 1 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep00018>.
- Mello, Renato Santos, Hannes Callisen, James Winter, A. Robert Kagan, and Amos Norman. 1983. “Radiation Dose Enhancement in Tumors with Iodine.” *Medical Physics* 10 (1): 75–78. <https://doi.org/10.1118/1.595378>.
- Mittone, Alberto, Fabien Baldacci, Alberto Bravin, Emmanuel Brun, François Delaire, Claudio Ferrero, Sergei Gasilov, et al. 2013. «An Efficient Numerical Tool for Dose Deposition Prediction Applied to Synchrotron Medical Imaging and Radiation Therapy.» *Journal of Synchrotron Radiation* 20 (5): 785 – 92. <https://doi.org/10.1107/S0909049513017184>.
- Montay-Gruel, Pierre, Audrey Bouchet, Maud Jaccard, David Patin, Raphael Serduc, Warren Aim, Kristoffer Petersson, et al. 2018a. “X-Rays Can Trigger the FLASH Effect: Ultra-High Dose-Rate Synchrotron Light Source Prevents Normal Brain Injury after Whole Brain Irradiation in Mice.” *Radiotherapy and Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.08.016>.
- . 2018b. “X-Rays Can Trigger the FLASH Effect: Ultra-High Dose-Rate Synchrotron Light Source Prevents Normal Brain Injury after Whole Brain Irradiation in Mice.” *Radiotherapy and Oncology* 129 (3): 582–88. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.08.016>.
- Morrison, P. F., D. W. Laske, H. Bobo, E. H. Oldfield, and R. L. Dedrick. 1994. “High-Flow Microinfusion: Tissue Penetration and Pharmacodynamics.” *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.1.r292>.
- Motto-Ros, V, L Sancey, X. C. Wang, Q. L. Ma, F. Lux, X. S. Bai, G. Panczer, O. Tillement, and J. Yu. 2013. “Mapping Nanoparticles Injected into a Biological Tissue Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy.” *Spectrochimica Acta — Part B Atomic Spectroscopy* 87:168–74. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.05.020>.
- Mur, Pilar, Manuela Mollejo, Teresa Hernández-Iglesias, Angel Rodriguez de Lope, Javier S. Castresana, Juan F. García, Concepcion Fiaño, Teresa Ribalta, Juan A. Rey, and Barbara Meléndez. 2015. “Molecular Classification Defines 4 Prognostically Distinct Glioma Groups Irrespective of Diagnosis and Grade.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 74 (3): 241–49. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000167>.
- Muthana, Munitta, Aneurin J. Kennerley, Russell Hughes, Ester Fagnano, Jay Richardson, Melanie Paul, Craig Murdoch, et al. 2015. “Directing Cell Therapy to Anatomic Target Sites in Vivo with Magnetic Resonance Targeting.” *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9009>.
- Nayak, Lakshmi, Eudocia Quant Lee, and Patrick Y. Wen. 2012. “Epidemiology of Brain Metastases.” *Current Oncology Reports* 14 (1): 48–54. <https://doi.org/10.1007/s11912-011-0203-y>.
- Nel, Andre E., Lutz Mädler, Darrell Velegol, Tian Xia, Eric M. V. Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova, and Mike Thompson. 2009. “Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface.” *Nature Materials* 8 (7): 543–57. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- Nelson, Delia, Scott Fisher, and Bruce Robinson. 2014. “The ‘Trojan Horse’ Approach to Tumor Immunotherapy: Targeting the Tumor Microenvironment.” Edited by Eyad Elkord. *Journal of Immunology Research* 2014:789,069. <https://doi.org/10.1155/2014/789069>.

- Neuwelt, Edward A., P. Várallyay, A. G. Bagó, L. L. Muldoon, G. Nesbit, and R. Nixon. 2004. "Imaging of Iron Oxide Nanoparticles by MR and Light Microscopy in Patients with Malignant Brain Tumours." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 30 (5): 456–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00557.x>.
- Nicholson, Charles, and Sabina Hrabětová. 2017. "Brain Extracellular Space: The Final Frontier of Neuroscience." *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.052>.
- Nicole A. Shonka, MD, Jay S. Loeffler, MD, Daniel P. Cahill, MD, PhD, John de Groot, MD. 2015. « Primary and Metastatic Brain Tumors. »
- Noguchi, Youichiro, Jun Wu, Ruth Duncan, Jiří Strohalm, Karel Ulbrich, Takaaki Akaike, and Hiroshi Maeda. 1998. "Early Phase Tumor Accumulation of Macromolecules: A Great Difference in Clearance Rate between Tumor and Normal Tissues." *Japanese Journal of Cancer Research* 89 (3): 307–14. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1998.tb00563.x>.
- Norman, Amos, Forrest H. Adams, and Richard F. Riley. 1978. "Cytogenetic Effects of Contrast Media and Triiodobenzoic Acid Derivatives in Human Lymphocytes." *Radiology* 129 (1): 199–203. <https://doi.org/10.1148/129.1.199>.
- Obeid, Layal. 2016. "Biodistribution d' Un Agent de Contraste Iodé et Impacts Dosimétriques : Étude Pour La Radiothérapie stéréotaxique Par Rayonnement Synchrotron To Cite This Version : HAL Id: Tel-01328805 Biodistribution d' Un Agent de Contraste Iodé et Impacts Dosimé — ."
- Okon, E., D Pouliquen, P Okon, Z. v. Kovaleva, T. P. Stepanova, S. G. Lavit, B. N. Kudryavtsev, and P Jallet. 1994. "Biodegradation of Magnetite Dextran Nanoparticles in the Rat: A Histologic and Biophysical Study." *Laboratory Investigation* 71 (6): 895–903. <https://europepmc.org/article/med/7807971>.
- Ostrom, Quinn T, Haley Gittleman, Peter Liao, Toni Vecchione-Koval, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko, and Jill S Barnholtz-Sloan. 2017. "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2010–2014." *Neuro-Oncology* 19 (suppl_5): v1–88. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158>.
- Paganin, D., S. C. Mayo, T. E. Gureyev, P. R. Miller, and S. W. Wilkins. 2002. "Simultaneous Phase and Amplitude Extraction from a Single Defocused Image of a Homogeneous Object." *Journal of Microscopy* 206 (1): 33–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2002.01010.x>.
- Palanisamy, Sathyadevi, and Yun Ming Wang. 2019. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticulate System: Synthesis, Targeting, Drug Delivery and Therapy in Cancer." *Dalton Transactions*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9dt00459a>.
- Pardridge, William M. 2003. "Blood-Brain Barrier Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development." *Molecular Interventions*. Mol Interv. <https://doi.org/10.1124/mi.3.2.90>.
- Parveen, Suphiya, Ranjita Misra, and Sanjeeb K. Sahoo. 2012. "Nanoparticles: A Boon to Drug Delivery, Therapeutics, Diagnostics and Imaging." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Nanomedicine. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>.
- Perrot, Yann. 2011. "Evaluation of the Dose Deposited by Electron Beams in Radiotherapy in Voxelized Phantoms Using the Monte Carlo GATE Simulation

- Platform Based on GEANT4 in a Grid Environment." Theses, Université Blaise Pascal—Clermont-Ferrand II. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00721940>.
- Pisani, Cédric. 2017. "Etude Toxicogénomique de Nanovecteurs de Silice Mésoporeuse : Relation Entre Décorcation et Toxicité." Université de Montpellier.
- Podgorsak, E. B. 2005. *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*.
- Prezado, Y., J. F. Adam, P. Berkvens, I. Martinez-Rovira, G. Fois, S. Thengumpallil, M. Edouard, et al. 2010. "Synchrotron Radiation Therapy from a Medical Physics Point of View." *AIP Conference Proceeding* 1266 (1): 101–6. <https://doi.org/10.1063/1.3478185>.
- Prezado, Y., G. Fois, M. Edouard, C. Nemoz, M. Renier, H. Requardt, F. Estève, J. F. Adam, H. Elleaume, and A. Bravin. 2009. "Biological Equivalent Dose Studies for Dose Escalation in the Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy Clinical Trials." *Medical Physics* 36 (3): 725–33. <https://doi.org/10.1118/1.3070538>.
- Prezado, Y, M Vautrin, I Martínez-Rovira, a Bravin, F Estève, H Elleaume, P Berkvens, and J F Adam. 2011. "Dosimetry Protocol for the Forthcoming Clinical Trials in Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy (SSRT)." *Medical Physics* 38 (3): 1709–17. <https://doi.org/10.1118/1.3556561>.
- Ramus, Liliane. 2011. "Conception et Utilisation d'atlas Anatomiques Pour La Segmentation Automatique : Application à La Radiothérapie Des Cancers ORL." <Http://Www.Theses.Fr>, January.
- Reymond, Solveig. 2018. « 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. » <Http://Www.Theses.Fr>, December.
- Reynaert, N., S. C. van der Marck, D. R. Schaart, W. van der Zee, C. van Vliet-Vroegindewey, M. Tomsej, J. Jansen, B. Heijmen, M. Coghe, and C. de Wagter. 2007. "Monte Carlo Treatment Planning for Photon and Electron Beams." *Radiation Physics and Chemistry*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2006.05.015>.
- Rodney Withers, H., Jeremy M. G. Taylor, and Boguslaw Maciejewski. 1988. "Treatment Volume and Tissue Tolerance." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 14 (4): 751–59. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(88\)90098-3](https://doi.org/10.1016/0360-3016(88)90098-3).
- Rosa, Soraia, Chris Connolly, Giuseppe Schettino, Karl T. Butterworth, and Kevin M. Prise. 2017. "Biological Mechanisms of Gold Nanoparticle Radiosensitization." *Cancer Nanotechnology*. Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1186/s12645-017-0026-0>.
- Rose, J. Holt, Amos Norman, Marylou Ingram, Chuck Aoki, Tim Solberg, and Albert Mesa. 1999. "First Radiotherapy of Human Metastatic Brain Tumors Delivered by a Computerized Tomography Scanner (CTRx)." *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 45 (5): 1127–32. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(99\)00347-8](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(99)00347-8).
- Rosuel, Nicolas, Jean Michel Létang, Emmanuel Brun, and Jean-François Adam. 2018. "Dosimetry for Synchrotron Imaging Techniques," October.
- Roughan, J. V., O. Burzaco Ojeda, and P. A. Flecknell. 2000. "Effects of Repeated Anaesthesia with Ketamine/Medetomidine and of Pre-Anaesthetic Administration of Buprenorphine in Rats." *Laboratory Animals* 34 (2): 207–11. <https://doi.org/10.1258/002367700780457536>.

- Rousseau, J, C Boudou, RF Barth, ... J Balosso—Clinical cancer, and undefined 2007. 2007. “Enhanced Survival and Cure of F98 Glioma—Bearing Rats Following Intracerebral Delivery of Carboplatin in Combination with Photon Irradiation.” *AACR*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1002>.
- Rousseau, Julia, Rolf F. Barth, Manuel Fernandez, Jean François Adam, Jacques Balosso, François Estève, and Hélène Elleaume. 2010. “Efficacy of Intracerebral Delivery of Cisplatin in Combination with Photon Irradiation for Treatment of Brain Tumors.” *Journal of Neuro-Oncology* 98 (3): 287–95. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0074-3>.
- Rousseau, Julia, Caroline Boudou, François Estève, and Hélène Elleaume. 2007. “Convection-Enhanced Delivery of an Iodine Tracer Into Rat Brain for Synchrotron Stereotactic Radiotherapy.” *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 68 (3): 943–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.01.065>.
- Russell, Emily, Victoria Dunne, Ben Russell, Hibaaq Mohamud, Mihaela Ghita, Stephen J. McMahon, Karl T. Butterworth, Giuseppe Schettino, Conor K. McGarry, and Kevin M. Prise. 2021. “Impact of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on in Vitro and in Vivo Radiosensitisation of Cancer Cells.” *Radiation Oncology* 16 (1): 104. <https://doi.org/10.1186/s13014-021-01829-y>.
- Sadauskas, Evaldas, Gorm Danscher, Meredin Stoltenberg, Ulla Vogel, Agnete Larsen, and Håkan Wallin. 2009. “Protracted Elimination of Gold Nanoparticles from Mouse Liver.” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5 (2): 162–69. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.11.002>.
- Saleh, Andreas, Michael Schroeter, Cornelia Jonkmanns, Hans Peter Hartung, Ulrich Mödder, and Sebastian Jander. 2004. “In Vivo MRI of Brain Inflammation in Human Ischaemic Stroke.” *Brain* 127 (7): 1670–77. <https://doi.org/10.1093/brain/awh191>.
- Salvat, F, JM Fernández-Varea, and J Sempau. 2009. “PENELOPE-2008: A Code System for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport (Issy-Les-Moulineaux, France.”
- Sancey, L., V. Motto-Ros, B. Busser, S. Kotb, J. M. Benoit, A. Piednoir, F. Lux, O. Tillement, G. Panczer, and J. Yu. 2014. “Laser Spectrometry for Multi-Elemental Imaging of Biological Tissues.” *Scientific Reports* 4 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep06065>.
- Santra, Swadeshmukul. 2010. “Fluorescent Silica Nanoparticles for Cancer Imaging.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 624: 151–62. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_10.
- Sarrut, David, Manuel Bardiès, Nicolas Bousson, Nicolas Freud, Sébastien Jan, Jean Michel Létang, George Loudos, et al. 2014. “A Review of the Use and Potential of the GATE Monte Carlo Simulation Code for Radiation Therapy and Dosimetry Applications.” *Medical Physics*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1118/1.4871617>.
- Schuemann, Jan, Ross Berbeco, Devika B. Chithrani, Sang Hyun Cho, Rajiv Kumar, Stephen J. McMahon, Srinivas Sridhar, and Sunil Krishnan. 2016. “Roadmap to Clinical Use of Gold Nanoparticles for Radiation Sensitization.” *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.09.032>.
- Schuler, Emil, Kjell Eriksson, Elin Hynning, Steven L. Hancock, Susan M. Hiniker, Magdalena Bazalova-Carter, Tony Wong, Quynh Thu Le, Billy W. Loo, and Peter

- G. Maxim. 2017. "Very High-Energy Electron (VHEE) Beams in Radiation Therapy; Treatment Plan Comparison between VHEE, VMAT, and PPBS." *Medical Physics* 44 (6): 2544–55. <https://doi.org/10.1002/mp.12233>.
- Seltzer, S. 2004. "X-Ray Mass Attenuation Coefficients."
- Seo, Seung Jun, Jae Kun Jeon, Sung Mi Han, and Jong Ki Kim. 2017. "Reactive Oxygen Species-Based Measurement of the Dependence of the Coulomb Nanoradiator Effect on Proton Energy and Atomic Z Value." *International Journal of Radiation Biology* 93 (11): 1239–47. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1361556>.
- Seo, Seung-Jun, Jae-Kun Jeon, Eun-Ju Jeong, Won-Seok Chang, Gi-Hwan Choi, and Jong-Ki Kim. 2013. "Enhancement of Tumor Regression by Coulomb Nanoradiator Effect in Proton Treatment of Iron-Oxide Nanoparticle-Loaded Orthotopic Rat Glioma Model: Implication of Novel Particle Induced Radiation Therapy." *Journal of Cancer Therapy* 4:25–32. <https://doi.org/10.4236/jct.2013.411A004>.
- Seymour, L. W., Y Miyamoto, H Maeda, M. Brereton, J. Strohalm, K. Ulbrich, and R. Duncan. 1995. "Influence of Molecular Weight on Passive Tumour Accumulation of a Soluble Macromolecular Drug Carrier." *European Journal of Cancer* 31 (5): 766–70. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)00514-6](https://doi.org/10.1016/0959-8049(94)00514-6).
- Shahban, Muhammad, Muhammad Waqar, Quratulain Soomro, Muhammad Qasim, and Umar Ijaz. 2019. "Absorbed Dose Calculation in Irregular Blocked Radiation Fields: Evaluation of Clarkson's Sector Integration Method for Radiation Fields Commonly Used in Conventional Radiotherapy." *Iranian Journal of Medical Physics* 16 (1): 103–11. <https://doi.org/10.22038/ijmp.2018.27328.1285>.
- Sherwood, Louis M., Edith E. Parris, and Judah Folkman. 1971. "Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications." *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>.
- Shi, Lixin, Billy Hernandez, and Matthias Selke. 2006. "Singlet Oxygen Generation from Water-Soluble Quantum Dot-Organic Dye Nanocomposites." *Journal of the American Chemical Society* 128 (19): 6278–79. <https://doi.org/10.1021/ja057959c>.
- Shi, Minghan, and Léon Sanche. 2019. "Convection-Enhanced Delivery in Malignant Gliomas: A Review of Toxicity and Efficacy." *Journal of Oncology*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/9342796>.
- Shin, Seung Won, In Hyun Song, and Soong Ho Um. 2015. "Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity." *Nanomaterials*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano5031351>.
- Simeonova, Iva, and Emmanuelle Huillard. 2014. "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: CMLS*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1675-3>.
- Singh, Neenu, Gareth J.S. Jenkins, Romisa Asadi, and Shareen H Doak. 2010. "Potential Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION)." *Nano Reviews* 1 (1): 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>.
- Skoglund, Sara, Jonas Hedberg, Elena Yunda, Anna Godymchuk, Eva Blomberg, and Inger Odnevall Wallinder. 2017. "Difficulties and Flaws in Performing Accurate Determinations of Zeta Potentials of Metal Nanoparticles in Complex Solutions—Four Case Studies." Edited by Yogendra Kumar Mishra. *PLOS ONE* 12 (7): e0181735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181735>.

- Smilowitz, Henry M., Alexandria Meyers, Khalil Rahman, Nathaniel A. Dymont, Dan Sasso, Crystal Xue, Douglas L. Oliver, et al. 2018. "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* 13:3937-48. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154555>.
- Smith, Andrew M., Shivang Dave, Shuming Nie, Lawrence True, and Xiaohu Gao. 2006. "Multicolor Quantum Dots for Molecular Diagnostics of Cancer." *Expert Review of Molecular Diagnostics*. *Expert Rev Mol Diagn.* <https://doi.org/10.1586/14737159.6.2.231>.
- Sokolov, Konstantin, Michele Follen, Jesse Aaron, Ina Pavlova, Anais Malpica, Reuben Lotan, and Rebecca Richards-Kortum. 2003. "Real-Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles." *Cancer Research* 63 (9): 1999-2004.
- Sokolov, Stanislav, Kristina Tschulik, and Kerstin Jurkschat. 2015. "Reversible or Not? Distinguishing Agglomeration and Aggregation at the Nanoscale Zn-Based Battery View Project." *ACS Publications* 87 (19): 10,033-39. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02639>.
- Soo Choi, Hak, Wenhao Liu, Preeti Misra, Eiichi Tanaka, John P. Zimmer, Binil Itty Ipe, Mounji G. Bawendi, and John v. Frangioni. 2007. "Renal Clearance of Quantum Dots." *Nature Biotechnology* 25 (10): 1165-70. <https://doi.org/10.1038/nbt1340>.
- Sperduto, Paul W., Brian Berkey, Laurie E. Gaspar, Minesh Mehta, and Walter Curran. 2008. "A New Prognostic Index and Comparison to Three Other Indices for Patients With Brain Metastases: An Analysis of 1,960 Patients in the RTOG Database." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 70 (2): 510-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.06.074>.
- Sperduto, Paul W., T. Jonathan Yang, Kathryn Beal, Hubert Pan, Paul D. Brown, Ananta Bangdiwala, Ryan Shanley, et al. 2017. "Estimating Survival in Patients with Lung Cancer and Brain Metastases an Update of the Graded Prognostic Assessment for Lung Cancer Using Molecular Markers (Lung-MolGPA)." *JAMA Oncology* 3 (6): 827-31. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3834>.
- Spiga, Jenny, Paolo Pellicoli, Sam P. Manger, Jon A. Duffy, and Alberto Bravin. 2019. "Experimental Benchmarking of Monte Carlo Simulations for Radiotherapy Dosimetry Using Monochromatic X-Ray Beams in the Presence of Metal-Based Compounds." *Physica Medica* 66 (October): 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2019.09.075>.
- Steinmetz, A., and G. Schackert. 1996. "Malignant Gliomas of the Brain and Surgical Limitations." *Oncology Research and Treatment* 19 (1): 6-14. <https://doi.org/10.1159/000218752>.
- Stupp, R., M. Brada, M. J. van den Bent, J. C. Tonn, and G. Pentheroudakis. 2014a. "High-Grade Glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 25 (December 2004): 93-101. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu050>.
- Stupp, R., M. Brada, M. J. van den Bent, J.-C. Tonn, and G. Pentheroudakis. 2014b. "High-Grade Glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." *Annals of Oncology* 25 (suppl_3): iii93-101. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu050>.

- Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J. B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma." *New England Journal of Medicine* 352 (10): 987–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- Suortti, P., S. Fiedler, A. Bravin, T. Brochard, M. Mattenet, M. Renier, P. Spanne, et al. 2000. "Fixed-Exit Monochromator for Computed Tomography with Synchrotron Radiation at Energies 18–90 KeV." *Journal of Synchrotron Radiation* 7 (5): 340–47. <https://doi.org/10.1107/S0909049500008384>.
- Svaasand, Lars O., Charles J. Gomer, and Elisa Morinelli. 1990. "On the Physical Rationale of Laser Induced Hyperthermia." *Lasers in Medical Science* 5 (2): 121–28. <https://doi.org/10.1007/BF02031373>.
- Swenberg, J A, A Koestner, W Wechsler, and R H Denlinger. 1972. "Quantitative Aspects of Transplacental Tumor Induction with Ethylnitrosourea in Rats." *Cancer Research* 32 (12): 2656–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4345400>.
- Syková, Eva, and Charles Nicholson. 2008. "Diffusion in Brain Extracellular Space." *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2007>.
- Taillibert, S., and É. le Rhun. 2015. «Épidémiologie Des Lésions Métastatiques Cérébrales.» *Cancer/Radiothérapie* 19 (1): 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.CANRAD.2014.11.001>.
- Taupin, Florence. 2013. «Nanoparticules et Rayonnement Synchrotron Pour Le Traitement Des Tumeurs Cérébrales.» Theses, Université de Grenoble. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00949136>.
- Taupin, Florence, Mélanie Flaender, Rachel Delorme, Thierry Brochard, Jean François Mayol, Josiane Arnaud, Pascal Perriat, et al. 2015. «Gadolinium Nanoparticles and Contrast Agent as Radiation Sensitizers.» *Physics in Medicine and Biology* 60 (11) : 4449 – 64. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/60/11/4449>.
- Teja, Aryn S., and Pei Yoong Koh. 2009. "Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles." *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>.
- Thomlinson, W, P Berkvens, G Berruyer, B Bertrand, H Blattmann, E Brauer-Krisch, T Brochard, et al. 2000. "Research at the European Synchrotron Radiation Facility Medical Beamline." *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 46 (6): 1053–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976863>.
- TRS 430. 2004. "Commissioning and Quality Assurance of Computerized Planning Systems for Radiation Treatment of Cancer."
- Turner, Patricia v., Thea Brabb, Cynthia Pekow, and Mary Ann Vasbinder. 2011. "Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 50 (5): 600–613.
- Umut, E., F. Pineider, P. Arosio, C. Sangregorio, M. Corti, F. Tabak, A. Lascialfari, and P. Ghigna. 2012. "Magnetic, Optical and Relaxometric Properties of Organically Coated Gold-Magnetite (Au-Fe 30 4) Hybrid Nanoparticles for Potential Use in Biomedical Applications." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 324 (15): 2373–79. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2012.03.005>.

- Umut, Evrim. 2013. "Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications." In *Modern Surface Engineering Treatments*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55746>.
- Vautrin, Mathias. 2011a. "Development and Validation of Monte Carlo Dose Computations for Contrast-Enhanced Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy." Theses, Université de Grenoble. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00641325>.
- . 2011b. "Development and Validation of Monte Carlo Dose Computations for Contrast-Enhanced Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy." Theses, Université de Grenoble. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00641325>.
- Verry, C., E. Porcel, C. Chargari, C. Rodriguez-Lafrasse, and J. Balosso. 2019. "Use of Nanoparticles as Radiosensitizing Agents in Radiotherapy: State of Play." *Cancer/Radiotherapie*. Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2019.07.134>.
- Verry, Camille, Lucie Sancey, Sandrine Dufort, Geraldine le Duc, Christophe Mendoza, François Lux, Sylvie Grand, et al. 2019. « Treatment of Multiple Brain Metastases Using Gadolinium Nanoparticles and Radiotherapy: NANO-RAD, a Phase I Study Protocol. » *BMJ Open* 9 (2) : e023591. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023591>.
- Wang, Hao, Xiaoyu Mu, Hua He, and Xiao Dong Zhang. 2018. "Cancer Radiosensitizers." *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.003>.
- Wang, Y. X.J., H. H. Wang, D. W.T. Au, B. S. Zou, and L. S. Teng. 2008. "Pitfalls in Employing Superparamagnetic Iron Oxide Particles for Stem Cell Labelling and in Vivo MRI Tracking." *British Journal of Radiology*. <https://doi.org/10.1259/bjr/55991430>.
- Wang, Yi-Xiang J. 2011. "Superparamagnetic Iron Oxide Based MRI Contrast Agents: Current Status of Clinical Application." *Quant Imaging Med Surg* 1. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03>.
- Weissleder, Ralph, Matthias Nahrendorf, and Mikael J. Pittet. 2014. "Imaging Macrophages with Nanoparticles." *Nature Materials*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmat3780>.
- Wen, Patrick Y., and Santosh Kesari. 2008. "Malignant Gliomas in Adults." *New England Journal of Medicine* 359 (5): 492–507. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708126>.
- White, D. R., J. Booz, R. v. Griffith, J. J. Spokas, and I. J. Wilson. 1989. "Report 44." *Journal of the International Commission on Radiation Units and Measurements* os23 (1): NP-NP. <https://doi.org/10.1093/jicru/os23.1.report44>.
- Wick, Wolfgang, Christian Hartmann, Corinna Engel, Mandy Stoffels, Jörg Felsberg, Florian Stockhammer, Michael C. Sabel, et al. 2009. "NOA-04 Randomized Phase III Trial of Sequential Radiochemotherapy of Anaplastic Glioma with Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide." *Journal of Clinical Oncology* 27 (35): 5874–80. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.6497>.
- Wilhelm, S, AJ Tavares, Q Dai, S Ohta, J Audet, HF Dvorak, and Chan WC. 2016. "Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumours. Nature Reviews Materials." *Nature.Com* 1 (5): 1–12. www.nature.com/natrevmats.

- Withers, H R. 1992. "Biological Basis of Radiation Therapy for Cancer." *Lancet* 339 (8786): 156–59.
http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:23035004.
- Wu, Wei, Zhaohui Wu, Taekyung Yu, Changzhong Jiang, and Woo Sik Kim. 2015. "Recent Progress on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications." *Science and Technology of Advanced Materials*. Institute of Physics Publishing.
<https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>.
- Yan, Lesan, Lijun Luo, Ahmad Amirshaghghi, Joann Miller, Cathy Meng, Tianyan You, Theresa M. Busch, Andrew Tsourkas, and Zhiliang Cheng. 2019. "Dextran-Benzoporphyrin Derivative (BPD) Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) Micelles for T₂—Weighted Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy." *Bioconjugate Chemistry* 30 (11): 2974–81.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00676>.
- Yang, Runze, Susobhan Sarkar, V Wee Yong, and Jeff F Dunn. 2018. "In Vivo MR Imaging of Tumor-Associated Macrophages: The Next Frontier in Cancer Imaging." *Magnetic Resonance Insights* 11: 1178623X18771974.
<https://doi.org/10.1177/1178623X18771974>.
- Yang, Weilian, Tianyao Huo, Rolf F. Barth, Nilendu Gupta, Michael Weldon, John C. Grecula, Brian D. Ross, et al. 2011. "Convection Enhanced Delivery of Carboplatin in Combination with Radiotherapy for the Treatment of Brain Tumors." *Journal of Neuro-Oncology* 101 (3): 379–90.
<https://doi.org/10.1007/S11060-010-0272-Z>.
- Yoshioka, Yasuo, Kazuma Higashisaka, Shin-ichi Tsunoda, and Yasuo Tsutsumi. 2014. "The Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Profile of Nanoparticles." In, 259–71. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55139-3_15.
- Zhi, Defu, Ting Yang, Jian Yang, Shuang Fu, and Shubiao Zhang. 2020. "Targeting Strategies for Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy." *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.027>.
- Zhu, Mo Tao, Wei Yue Feng, Yun Wang, Bing Wang, Meng Wang, Hong Ouyang, Yu Liang Zhao, and Zhi Fang Chai. 2009. "Particokinetics and Extrapulmonary Translocation of Intratracheally Instilled Ferric Oxide Nanoparticles in Rats and the Potential Health Risk Assessment." *Toxicological Sciences* 107 (2): 342–51.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn245>.
- Zhu, Mo Tao, Guangjun Nie, Huan Meng, Tian Xia, Andre Nel, and Yuliang Zhao. 2013. "Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate." *Accounts of Chemical Research* 46 (3): 622–31.
<https://doi.org/10.1021/ar300031y>.
- Zhu, Mo Tao, Bing Wang, Yun Wang, Lan Yuan, Hua Jian Wang, Meng Wang, Hong Ouyang, Zhi Fang Chai, Wei Yue Feng, and Yu Liang Zhao. 2011. "Endothelial Dysfunction and Inflammation Induced by Iron Oxide Nanoparticle Exposure: Risk Factors for Early Atherosclerosis." *Toxicology Letters* 203 (2): 162–71.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.021>.

Liste des figures

Figure 1.1.1 : Classification des tumeurs astrocytaires selon l'ancienne classification de l'OMS (Louis et al. 2007). Les tumeurs les plus différenciées sont de plus bas grade et ont une meilleure probabilité de survie que les tumeurs de plus haut grade qui sont peu différenciées.....5

Figure 1.1.2 : Imagerie par résonance magnétique (IRM) pondérée en T1 après injection d'un agent de contraste au gadolinium. (A) Glioblastome IDH mutant et (B) glioblastome IDH sauvage. La partie nécrotique de la tumeur (*) est plus grande dans la forme sauvage que dans la forme mutée (Arevalo et al. 2017)7

Figure 1.1.3 : Métastases cérébrales vues en IRM pondérée en T1 (Camille Verry et al. 2019).8

Figure 1.1.4 : Étapes de la néoangiogénèse tumorale. a) La tumeur est isolée de la circulation sanguine par la barrière hématoencéphalique. b) certaines cellules tumorales subissent une mutation provoquant la sécrétion de facteur de croissance vasculaire. La barrière hématoencéphalique commence à se former (BBTB). c) La néoangiogénèse rapide empêche les cellules endothéliales de former des jonctions serrées ce qui permet aux molécules de s'extravaser dans les tissus tumoraux (Karim et al. 2016).....9

Figure 1.1.5 : Représentation schématique de l'effet EPR. Les molécules de bas poids moléculaire (Low Mw drug) et de haut poids moléculaire (High Mw drug) diffusent dans la tumeur grâce à la perméabilisation de la vascularisation due à la néoangiogénèse (0 h). Cependant les plus petites molécules diffusent librement et sont rapidement éliminées alors que les grosses molécules s'accumulent dans la tumeur (Iyer et al. 2006)..... 10

Figure 1.1.6 : Modèle de courbe de TCP (tumor control probability) et de NTCP (normal tissue complication probability) en fonction de la dose prescrite pour un traitement donné. 1. Exemples de modalités permettant de diminuer le NTCP en diminuant les dommages aux tissus sains. 2. Exemples de modalités permettant de d'augmenter le TCP et d'avoir une meilleure survie après traitement. Adapté de (Chargari et al. 2016). 13

Figure 1.1.7 : Comparaison des cartes de doses correspondants aux trois modalités de traitement en radiothérapie externe. Faisceaux de photons en arthrothérapie volumétrique (a), faisceau de protons (b), faisceau d'électron de très haute énergie de 100 MeV (c) et 200 MeV (d) (Schuler et al. 2017). 14

Figure 1.1.8 : Comparaison des balistiques de traitement en radiothérapie stéréotaxique. La figure de gauche représente les faisceaux d'un traitement avec un cyberknife tandis que la figure de droite représente les faisceaux d'un traitement par IMRT. (Schuler et al. 2017). 15

Figure 1.1.9 : Méthodes de contention utilisées en radiothérapie. A. Masque thermoplastique immobilisant le patient sur la table de radiothérapie. B. Masque thermoplastique fixé sur un cadre. C. Cadre stéréotaxique fixé au crâne du patient (Amelio et al. 2013). 16

Figure 1.1.10 : Algorithme de traitement pour les tumeurs gliales de haut grade. 1° : Primitif. 2° : Secondaire. GBM : Glioblastome. MGMT : méthylation du promoteur du gène de la methyl-guanine methyltransférase. IDH mutation dans le gène de l'isocitrate déshydrogénase. 1 p/19 q : codéletion des chromosomes 1p et 19q. RT : radiothérapie. Chemo: chimiothérapie au Témzolomide ou Procarabine/Lomustine/Vincristine. TMZ:

Témozolomide. † RT ou chemo en premier puis l'autre traitement si nécessaire. ¶ : pas de données randomisées pour l'oligodendriome. § : des essais randomisés ont démontré des effets prolongés sur la survie des patients traités avec Procarbazine/Iomustine/Vincristine après radiothérapie. (R. Stupp et al. 2014 b) 17

Figure 1.1.11 : Cartes de dose pour d'une irradiation panencéphalique pour le traitement de plusieurs métastases cérébrales (Grosu et al. 2020)..... 18

Figure 1.2.1 : Illustration représentant quelques formes de nano-objets (ISO/TS 80004-2:2015 [fr] 2015)..... 19

Figure 1.2.2 : Nanoparticules au sein de l'échelle du vivant (Goutayer 2008). 20

Figure 1.2.3 : Les différents types de nanoparticules étudiés en thérapie et diagnostic (Pisani 2017)..... 21

Figure 1.2.4 : Voies d'internalisation en fonction de la taille et de la composition des nanoparticules (Zhu et al. 2013). 22

Figure 1.2.5 : Agglomération et agrégation des nanoparticules (D'après <http://www.nanosafety-platform.com>)..... 23

Figure 1.2.6 : Utilisation des nanoparticules en radiothérapie : les nanoparticules peuvent être utilisées comme vecteurs de médicaments de chimiothérapie, pour la radiosensibilisation, jouer un rôle dans la radioprotection, ou être utilisées pour faire du renforcement de dose (Calugaru et al. 2015)..... 27

Figure 1.3.1 : Représentation des coefficients d'atténuation massique ($\mu\rho$) et coefficients d'absorption massique ($\mu_{en\rho}$) des tissus mous, de l'os et de l'iode en fonction de l'énergie des photons incidents. Les valeurs des coefficients d'atténuation et d'absorption diminuent avec l'énergie du rayonnement photonique, sauf au niveau des seuils d'absorption des éléments..... 30

Figure 1.3.2 : Rendement en profondeur dans un fantôme représentant une tête d'homme avec une tumeur contenant 4 mg/mL d'iode. Les courbes sont obtenues pour une irradiation avec un faisceau polychromatique d'énergie effective 60 keV (trait plein), en comparaison avec une irradiation avec une source de cobalt-60 à 1,25 MeV (trait pointillé). Avec le contraste de dose généré par l'iode, on peut obtenir la même dose à la tumeur qu'avec la source de cobalt-60, mais avec moins de dose délivrée aux tissus sains, à l'exception de l'os. D'après (Mello et al. 1983)..... 31

Figure 1.3.3 : Coefficients d'absorption massique de l'eau (bleu), de l'iode pur (orange), exprimés en $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$ et le DEF correspondant à une concentration de 10 mg/ml d'iode (courbe grise et axe de droite), en fonction de l'énergie d'irradiation (keV). On observe un maximum de renforcement de dose autour de 50 keV. Les courbes sont obtenues à partir de la base de données du NIST (Seltzer 2004)..... 33

Figure 1.3.4 : Facteurs d'augmentation de dose pour le fer, l'iode, le gadolinium et l'or par rapport à l'eau, en fonction de l'énergie des photons incidents. Les courbes sont obtenues à partir de la base de donnée du NIST en considérant des éléments purs (Seltzer 2004). 34

Figure 1.3.5 : Production du rayonnement synchrotron à l'ESRF. Les électrons sont d'abords accélérés dans le LINAC jusqu'à une énergie de 200 MeV. Ils sont ensuite injectés dans le booster Synchrotron où ils sont accélérés jusqu'à atteindre une énergie cinétique de 6 GeV. Ils sont alors injectés dans l'anneau de stockage, où ils émettent des rayons X

lorsqu'ils sont déviés de leurs trajectoires par des structures magnétiques le long de leurs parcours. Le rayonnement X émis est exploité dans les lignes de lumières. (Modifié d'après esrf.eu)..... 35

Figure 1.3.6 : Éléments composants chaque section de l'anneau de stockage. Les aimants de courbure ou Bending Magnets (BM) modifient la trajectoire des électrons, tandis que les éléments d'insertion ou « insertion device » (ID) permettent d'obtenir un faisceau de forte brillance (Modifié d'après esrf.eu)..... 36

Figure 1.3.7 : Spectre énergétique du rayonnement synchrotron sur la ligne ID17 comparé avec le spectre d'un tube à rayons X utilisé en imagerie. Le flux de photons sur la ligne id17 est 10^5 fois plus intense que sur un tube conventionnel et sur une plus grande bande d'énergie (H. Elleaume et al. 1999)..... 37

Figure 1.3.8 : Ligne de lumière ID17. La ligne est composée de 2 cabines expérimentales, la cabine MRT située à 40 m de la source et la cabine SSRT située à 150 m de la source. Cette distance permet d'avoir un faisceau large (15 cm) (d'après esrf.eu). 38

Figure 1.3.9 : Souris ayant subi une injection de nanoparticules d'or ayant coloré son pelage (Hainfeld et al. 2013)..... 41

Figure 1.4.1 : Structure cristallographique de la Magnétite (Friák, Schindlmayr, and Scheffler 2007) 45

Figure 1.4.2 : Application biomédicales des IONPs (Hoskins 2014)..... 48

Figure 1.4.3 : Nanoparticules théranostiques SDBM (SPION loaded Dextran-BPD Micelles) utilisées comme agent de contraste IRM et photosensibilisant pour la thérapie photodynamique (PDT). (A, B) IRM pondérée en T2 de souris ayant une tumeur mammaire 4T1 (cercle rouge pointillé) avant injection des SDBM (A) et 24 h après injection intraveineuse de 20 mg Fe/g p.c. (poids corporel) de SDBM (B). (C) Réponse tumorale in vivo après injection intraveineuse de PBS (contrôle), BPD (benzoporphyrine derivative) libre ou SDBM à la concentration de 2,5 mg BDP/g p.c. Les conditions de la PDT sont : $\lambda = 690$ nm, Débit de fluence : 75 mW/cm², Fluence : 135 J/cm². (D) Schéma des SDBM utilisés dans cette étude. Les micelles sont formé par l'assemblage de SPION (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle, billes noires) et de BPD (Benzoporphyrin derivative monoacid ring A, en jaune) conjugué au dextrane (vert). Les propriétés amphiphiles du Dextrane-BPD leur permettent de recouvrir le cœur métallique (Yan et al. 2019)..... 49

Figure 1.4.4 : Principe de la thérapie par agitation magnétique (Palanisamy and Wang 2019)..... 50

Figure 1.4.5 : Mesure des concentrations de nanoparticules de fer (et d'or) mesurées par ICP-MS dans le sang, la tumeur et le muscle en fonction du temps chez la souris porteuse d'une tumeur sous-cutanée CT26 après injection intraveineuse. Entre 15 minutes et 24 h après l'injection, les nanoparticules s'accumulent préférentiellement dans la tumeur, alors qu'il y a peu de nanoparticules mesurées dans le muscle. Au bout de 24 h le rapport de concentration tumeur sur muscle vaut 169 pour l'or et 88 pour le fer (J. K. Kim et al. 2012)..... 53

Figure 1.4.6 : Présence de fer et de soufre dans les cellules F98 (glioblastome de rat) pour deux conditions d'incubation. Les nanoparticules étaient présentes dans le milieu de culture des cellules à 0,02 mg Fe/mL et 0,06 mg Fe/mL pendant 24 h Le soufre permet de délimiter le contours des cellules et du noyau. Les nanoparticules sont internalisées par

les cellules dans des vacuoles cytoplasmiques. L'accumulation de nanoparticules de fer augmente avec la concentration. Images obtenues par SR-XRF (Reymond 2018)..... 54

Figure 1.4.7 : Distribution des IONPs. A. Distribution habituelle en fonction de la taille des nanoparticules. B. IONPs marqué avec ^{99}Tc chez l'homme et ^{89}Zr pour la un modèle tumoral de souris (modèle CT26 implanté en sous-cutané dans les deux flancs). Les nanoparticule s'accumulent fortement dans le foie et dans la tumeur (Cortajarena et al. 2014; Weissleder, Nahrendorf, and Pittet 2014)..... 55

Figure 1.4.8 : Protonthérapie combinée avec nanoparticules : Évolution de la taille d'une tumeur sous-cutanée (modèle CT26, souris) après injection de nanoparticules de fer (SNP) ou d'or (GNP) couplée à une irradiation par protons de 45 MeV. Les nanoparticules de fer et d'or associées à la protonthérapie réduisent significativement la taille de la tumeur (J. K. Kim et al. 2010)..... 56

Figure 1.4.9 : Résultats de mesure de la viabilité cellulaire par test MTT. Des cellules C6 (gliome de rat) ont été irradiées par un rayonnement synchrotron de 6,89 keV uniquement (No-SNP), ou réalisée après incubation avec 0,1 mg/mL de nanoparticules pendant 6 h (6h-SNP) ou pendant toute une nuit (ON-SNP) (H.-T. Kim et al. 2009)..... 57

Figure 1.4.10 : Résultats précliniques de radiothérapie synchrotron après injection par voie veineuse de IONPs pour le traitement d'une tumeur CD26 implantée en sous-cutanée. Le volume tumoral a été mesuré en fonction du temps après différents traitements : (a) sans traitement (n=3), (b) 100 mg/kg p.c. de FeONP(n=3), (c) radiothérapie synchrotron (7,1 keV) — 10 Gy (n=5), (d) radiothérapie synchrotron (7,1 keV) — 40 Gy (n=5), (e) traitement combiné de radiothérapie (7,1 keV) 40 Gy et 100 mg/kg p.c. de FeONP (n=5), (f) traitement combiné de radiothérapie (7,1 keV) — 10 Gy et 100 mg/kg p.c. de FeONP (n=5). (G.-H. Choi et al. 2012) 58

Figure 1.4.11 : $\text{SER}_{4\text{ Gy}}$ mesuré par test clonogénique (A) et par ATP-lite (B) pour une concentration de 0,06 mg/mL (bleu) et 0,3 mg/mL (rouge) de nanoparticules d'oxyde de fer, à 3 énergies. Les résultats obtenus par ATP-lite sont similaires aux résultats obtenus par clonogénicité (Gimenez 2015a)..... 59

Figure 1.4.12 : Résultats in vitro de radiothérapie synchrotron avec nanoparticules de fer. Les 2 premières concentrations (C1 vert et C2 bleu clair) proviennent d'un lot différent de nanoparticules que les 2 autres concentrations (C2 bleu foncé et C3 orange). (Reymond 2018)..... 60

Figure 1.5.1 : Protocole de traitement pour la radiothérapie synchrotron avec renforcement de dose avec le fer. 9 jours avant le traitement, 5000 cellules tumorales sont implantée stéréotaxiquement dans le cerveau des rat. 24 h avant irradiation, les rats reçoivent les nanoparticules soit en injection locale avec la méthode de distribution améliorée par convection, soit par injection intraveine via la veine caudale. Puis une tomographie de positionnement est faite, suivi du traitement radiothérapeutique. Enfin une injection d'iode est faite après le traitement pour localiser la tumeur grâce à l'effet EPR et la méthode de tomographie à 2 énergies..... 62

Figure 2.2.1 : Cadre stéréotaxique Kopf utilisé pour l'implantation tumorale ainsi que pour l'injection en CED des nanoparticules. 70

Figure 2.2.2 : À gauche : Position de l'implantation de la tumeur sur le crâne d'un rat. À l'aide d'un cadre stéréotaxique, une seringue est positionnée à 3,5 mm à droite du Bregma, (position où les os du crâne se rejoignent dans la partie supérieure du crâne). À

droite, schéma d'un cerveau de rat en coupe transversale. L'aiguille est représentée ici à 3,5 mm à droite du bregma, et à 5 mm de profondeur (ce qui correspond à 5,5 mm par rapport au-dessus de l'os du crâne)..... 70

Figure 2.2.3 : Évolution de la survie en fonction du nombre de cellules F98 injectées. Pour une injection de 5000 cellules on s'attend à une survie moyenne de 21 jours..... 71

Figure 2.2.4 : Cartographie d'injection CED utilisée pour placer les nanoparticules de fer dans la tumeur. Le volume interstitiel dans lequel diffusent les nanoparticules occupe 25 % du volume cérébral. Le volume de distribution sera alors d'environ 80 μ L. La lésion causée par l'implantation crée un chemin de moindre résistance qui peut provoquer un reflux. 73

Figure 2.3.1 : Décomposition de l'aimantation M créée par le champ B_0 suite à l'application d'une impulsion radiofréquence créant un champ B_1 perpendiculaire au champ B_0 (à gauche). Décroissance exponentielle de l'aimantation transverse M_{xy} en fonction du temps après l'impulsion radiofréquence. (D'après Taupin 2013). 75

Figure 2.3.2 : Diagramme représentant les temps d'acquisition des images en IRM selon chaque groupe à partir du temps d'injection..... 77

Figure 2.3.3 : Acquisitions IRM pondérées en T2 (T2 wi) et en T2* (T2* wi) avant et après injection de 1 mL de FeONP à la concentration de 54 mg (Fe)/mL par voie intraveineuse au temps. Les images ont été acquises avant injection, juste après (T=0), puis 2 h et 24 h après l'injection. La tumeur, est encadrée en vert sur les images en pondération T2..... 78

Figure 2.3.4 : Acquisition IRM pondérée en T2 (T2 wi) et en T2* (T2* wi) après injection de 1 mL de FeONP à la concentration de 54 mg (Fe)/mL en intraveineuse au temps T=0. Les images ont été acquises juste après injection, puis 2 h après..... 78

Figure 2.3.5 : Acquisition IRM pondérée en T2 des trois rats (A, B, C) ayant reçu 20 μ L de FeONP à la concentration de 32 mg (Fe)/mL par CED à T=0. Les images ont été acquises juste après injection, puis 24 h après l'injection, sauf pour le rat A qui est décédé après la première imagerie..... 79

Figure 2.4.1 : Acquisition des projections d'un objet et construction du sinogramme correspondant. Plus on acquiert des projections à des angles différents, meilleure sera l'image reconstruite (Taupin 2013). 81

Figure 2.4.2 : Exemple de sinogramme obtenu à l'aide d'un détecteur germanium de 432 pixels. (A) Sinogramme représentant les projections mesurées par le détecteur Germanium. (B) Sinogramme corrigé avec l'équation correspondant au signal d'atténuation (C) Projection correspondant à la ligne bleue sur le sinogramme (A) ainsi que le signal de référence (sans objet entre la source et le détecteur) et le courant résiduel (sans signal). (D) Projection du sinogramme corrigé correspondant à la ligne bleue sur le sinogramme (B). 82

Figure 2.4.3 : Diagramme représentant les temps d'acquisition des volumes en TQRS selon chaque groupe à partir du temps d'injection. Une injection d'iode a été faite au temps intermédiaire (t = 3 h ou 12 h) pour localiser la tumeur dans le cerveau. 84

Figure 2.4.4 : Schéma représentant un profil des concentrations théoriques dans un volume de distribution de nanoparticules de fer. Les concentrations inférieures au seuil ne sont pas prise en compte dans le volume calculé. 86

Figure 2.4.5 : Image prise en tomographie synchrotron en projection de maximum d'intensité. Ce rat a reçu 20 μ L de nanoparticules en CED à la concentration de 32 mg Fe/mL. Cette image représente la projection en maximum d'intensité, soit pour chaque pixel la coupe ayant le signal le plus fort. L'encart représente la région encadrée en jaune avec un contraste rehaussé. 87

Figure 2.4.6 : Image en tomographie synchrotron en projection de maximum d'intensité. Ce rat a reçu 20 μ L de nanoparticules en CED à la concentration de 18 mg Fe/mL. Cette image représente la projection en maximum d'intensité, soit pour chaque pixel la coupe ayant le signal le plus fort. L'encart représente la région encadrée en jaune avec un contraste rehaussé. 87

Figure 2.4.7 : Évolution de la concentration moyenne dans le volume de distribution en fonction du temps pour les rats ayant reçu 20 μ L de nanoparticules en CED à la concentration de 18 mg Fe/mL (n=3) ou 32 mg Fe/mL (n=3). La concentration reste stable dans le temps et correspond approximativement à 30 % de la concentration injectée. Moyenne sur les 3 animaux et écart-type correspondant. 89

Figure 2.4.8 : Modèle théorique de l'espace extracellulaire. Ce modèles a été construit comme un maillage asymétrique en 2 dimensions pour la méthode des éléments finis d'une solution informatique pour la diffusion. (K. C. Chen and Nicholson 2000)..... 89

Figure 2.4.9 : Évolution du volume de distribution des nanoparticules en fonction du temps pour les rats ayant reçu 20 μ L de nanoparticules en CED. les moyennes pour chaque groupe et écarts types correspondants sont représentés pour une solution injectée concentrée à 18 mg Fe/mL (courbe orange, n=3) et 32 mg Fe/mL (courbe bleue, n=3). Le volume de distribution diminue avec le temps avec une constante de temps de 47 h et 64 h, pour les concentrations injectées de 18 et 32 mg/mL, respectivement. 90

Figure 2.4.10 : Évolution de la masse totale de fer mesurée en fonction du temps pour les rats ayant reçu 20 μ L de nanoparticules en CED. Les moyennes et écarts types calculés pour chaque groupe sont représentés pour une solution injectée concentrée à de 18 mg Fe/mL (courbe orange, n=3) (correspondant à 360 μ g de fer) ou de 32 mg Fe/mL (courbe bleue, n=3) (correspondant à 640 μ g de fer). La masse totale des nanoparticules du groupe 1 est 10 fois plus faible que le volume de distribution du groupe 2. 91

Figure 2.4.11 : Figure représentant le volume, la concentration moyenne et la masse totale d'iode déterminés par TQRS pour chaque rat. Le groupe 1 a reçu une injection de 20 μ L de nanoparticules d'oxyde de fer à la concentration ($C_{Fe, i}$) de 18 mg/mL. Le groupe 2 a reçu le même volume de nanoparticules, mais à la concentration de 32 mg/mL. Chaque groupe a reçu 1 mL de Ioméron à la concentration de 400 mg/mL par voie intraveineuse 15 minutes avant l'acquisition. La concentration seuil pour la détermination des volumes d'iode est de 0,45 mg/mL. 92

Figure 2.5.1 : Diagramme des séquences d'imagerie et des différents groupes d'animaux. Dans l'expérience 1 les coupes ont été colorées en coloration HE et bleu de Prusse sur la même coupe. Dans l'expérience 2, les coloration HE et bleu de prusse ont été réalisées sur 2 coupes conjointes. Dans l'expérience 3, la coupe a été imagée par la technique LIBS décrite dans la section suivante. 93

Figure 2.5.2 : Coupes histologiques des cerveaux de deux rats (A, B) ayant reçu 1 mL de FeONP à la concentration de 32 mg Fe/mL par voie intraveineuse. Les animaux ont été sacrifiés approximativement 24 h après injection. Les coupes ont été marquées par colorations HE et bleu de Prusse pour observer les nanoparticules d'oxyde de fer. Sur le

rat de droite on observe une coloration bleue dans les vaisseaux, absente sur l'individu de gauche et une prise de contraste intense dans la tumeur. 95

Figure 2.5.3 : Coupes histologiques des cerveaux des 3 rats ayant reçu 20 μ L de FeONP à la concentration de 32 mg Fe/mL en CED. Les animaux ont été sacrifiés approximativement 24 h après injection. Les coupes ont été marquées par coloration HE et avec du bleu de prusse simultanément pour marquer la tumeur et observer les nanoparticules d'oxyde de fer. 95

Figure 2.5.4 : Coupes histologiques de cerveaux d'un rat ayant reçu 20 μ L de nanoparticules par CED à la concentration de 32 mg Fe/mL observées au microscope. HE: Coloration à l'hématoxyline-éosine. BP : Coloration au bleu de prusse seul. La tumeur est encadrée en vert, et les nanoparticules en rouge. 96

Figure 2.5.5 : Coupes histologiques de cerveau du second rat ayant reçu 20 μ L de nanoparticules par CED à la concentration de 32 mg Fe/mL observées au microscope. HE: Coloration à l'hématoxyline-éosine. BP : Coloration au bleu de prusse seulement. La tumeur est encadrée en vert et les nanoparticules en rouge. 97

Figure 2.5.6 : Vue schématique du principe du LIBS. Un faisceau laser émettant à 1064 nm, est focalisé sur une petite portion de l'échantillon (sample), qui est posé sur un support qui se déplace de pixel en pixel (xyz stage). Pour chaque pixel, le spectre d'émission est analysé par un spectromètre Czerny-Turner. (Motto-Ros et al. 2013) 98

Figure 2.5.7 : Coupes de cerveaux de rats imagés par la méthode LIBS, ayant reçu une injection de nanoparticules en CED à la concentration de 32 mg/mL, puis suivi pendant 24 h par IRM. Carte des éléments phosphore (P) et fer (Fe) et image combinée des deux éléments. 99

Figure 2.5.8 : Distribution du fer mesurée par LIBS d'un rat ayant reçu 1 mL de nanoparticules d'oxyde de fer par voie IV à la concentration de 32 mg Fe/mL, comparée avec l'IRM T2* du même individu acquise 24 h post injection. On observe la présence de fer dans le liquide cérébro-spinal et dans certaines zones périphériques. 100

Figure 2.5.9 : Distribution du fer mesurée par LIBS de deux rats (A et B) ayant reçu 20 μ L de nanoparticules d'oxyde de fer par CED à la concentration de 32 mg Fe/mL comparée avec l'IRM T2* du même individu acquise 24 h après injection des nanoparticules. 101

Figure 2.5.10 : Distribution du fer mesurée par LIBS de deux rats (A, B) ayant reçu 20 μ L de nanoparticules d'oxyde de fer par CED à la concentration de 18 mg Fe/mL, comparée avec la coupe centrale acquise par TQRS du même individu acquise 24 h après injection des nanoparticules. 102

Figure 2.6.1 : Comparaison de l'injection de nanoparticules d'oxyde de fer par voie IV, sans (A, B) ou avec (C, D) un champ magnétique de 0,4 T. (A, C) image IRM pondéré en T2 des cerveaux de rats (B, C) mesure de la différence d'intensité du signal (dR2) créé par les nanoparticules (Chertok et al. 2008) 105

Figure 2.6.2 : Observation d'un cerveau de rat sain par IRM après injection de microbulles et envoi d'une salve d'ultrasons, puis injection de 200 μ L de solution de nanoparticules d'oxyde de fer concentrées à 18 mg Fe/mL. 100 μ L d'agent de contraste Gd sont ensuite injectés pour attester de l'ouverture de la BHE. Le pattern observé en T2* provient des nanoparticules (S. Reymond thèse 2018). 105

Figure 2.6.3 : Injection de nanoparticules d'or par injection CED (A, B) et par injection IV (C,D) dans le cerveau de rat possédant une tumeur F98 marquée au mCherry Red. (A, C) immunofluorescence marquant mCherry red (tumeur, rouge), anti-albumine (œdème, vert), DAPI (noyaux, bleu) et anti-CD31 (vaisseaux sanguins, blanc). (B,D) coloration des nanoparticules d'or. En CED on observe que les nanoparticules d'or ne se déposent pas dans la tumeur (Smilowitz et al. 2018)..... 108

Figure 3.1.1 : Les différents modules de l'outil de planification de traitement Isogray pour le traitement d'une tumeur cérébrale chez le rat. (a) Le module d'Imagerie permet le chargement et la visualisation des volumes du patient. (b) Le module de Recalage permet de recalculer automatiquement et manuellement les différents volumes chargés. (c) Le module de Segmentation permet de créer les régions d'intérêt à partir de l'étude des différents volumes. Un contournage manuel ou par seuil d'unités Hounsfield est possible. (d) Le module de Simulation permet de créer et de positionner les faisceaux et permet de faire des calculs dosimétriques..... 113

Figure 3.1.2 : Échelle de conversion des unités Hounsfield en masse volumique pour les différents matériaux biologiques calibrées à partir d'un fantôme de calibration CIRS 62 (Vautrin 2011a)..... 114

Figure 3.1.3 : Histogramme dose-volume d'une radiothérapie par modulation d'intensité pour le traitement d'un adénocarcinome endométrial avec une dose prescrite de 45 Gy. 100 % du PTV reçoit au moins 45 Gy. Les HDV de la vessie, du rectum, des intestins et des reins sont représentés. Un des reins est localisé dans la région pelvienne et est particulièrement à risque (Castilho et al. 2006). 116

Figure 3.1.4 : Module de dosimétrie du logiciel ISOgray. Un modèle voxelisé du patient représentant les différents matériaux et représenté selon les 3 plans de l'espace. L'eau est représentée en bleu, l'os en noir et les différentes concentrations d'iode sont représentées par un dégradé de jaune (Vautrin 2011a). 117

Figure 3.1.5 : (A) Évolution du DEF simulé en fonction de l'énergie d'irradiation pour diverses concentrations de Fe, Au, I ou Gd. Les atomes lourds sont répartis de façon homogène dans le volume considéré. (B) Évolution 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 (Reymond 2018)..... 118

Figure 3.1.6 : La dose D est le dépôt local d'énergie (dE) dans un élément de masse (dm) par les rayonnements ionisants (électrons e^- , photon $h\nu$) interagissant avec la matière. Ce dépôt local d'énergie correspond à la différence entre l'énergie du rayonnement entrant dans l'élément (R_{in}) et l'énergie du rayonnement sortant (R_{out})..... 119

Figure 3.1.7 : Carte de la dose déposée dans le cerveau d'un rat lors d'une acquisition en tomographie synchrotron ; d'après (Rosuel et al. 2018). La coupe axiale représentée est celle du centre du volume exploré dans la direction « museau-queue ». Simulation réalisée avec le code de calcul GATE..... 121

Figure 3.2.1 : Fantôme d'eau et de nanoparticules d'oxyde de fer à différentes concentrations. Le fantôme est rempli d'eau et chaque tube contient un mélange différent. Les concentrations en nanoparticules d'oxyde de fer sont indiquées dans le tableau de droite ainsi que la concentration équivalente en élément fer. Les tubes Air et H₂O contiennent respectivement de l'air et de l'eau..... 122

Figure 3.2.2 : Fantôme contenant des tubes contenant une solution aqueuse d'iode et de fer de concentrations connues. La couleur jaune indique des concentrations croissantes d'iode et le gris indique des concentrations croissantes de fer. Les concentrations d'iode et de fer sont indiquées dans le tableau. 123

Figure 3.2.3 : Fantôme composé d'un mélange de nanoparticules d'oxyde de fer et d'eau. A. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 32,0 keV. B. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 33,5 keV. C. Image de la concentration du fer. D. Schéma du fantôme. Les concentrations nominales sont détaillées dans le Tableau 3.2.2. 124

Figure 3.2.4 : Mesure du coefficient d'atténuation en fonction de la concentration de fer théorique pour les énergies en dessous (32 keV, bleue) et au-dessus (33,5 keV, rouge) du K-edge de l'iode. Les barres d'erreur verticales représentent l'écart-type des mesures sur la région d'intérêt. Les barres horizontales représentent l'incertitude sur la concentration et a été estimée à 5 %..... 125

Figure 3.2.5 : Évaluation de la sédimentation des nanoparticules dans le tube à 18 mg/mL de fer par la mesure des coefficients d'atténuation à 32 keV en fonction de la profondeur. La première coupe a un coefficient d'atténuation très élevé par rapport aux autres coupes. L'encart montre un agrandissement du graphique entre les valeurs de coefficients d'atténuation de 0,45 et 0,47. 126

Figure 3.2.6 : Fantôme composé d'un mélange de nanoparticules d'oxyde de fer, d'iode et d'eau. A. Schéma du fantôme avec l'iode représenté en jaune et le fer en gris. B. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 31 keV. C. Coupe du fantôme, acquise avec une énergie de 35 keV. D. Image de la décomposition en iode. E. Image de la décomposition en fer. Les concentrations nominales sont détaillées dans le Tableau 3.2.3. 127

Figure 3.2.7 : Graphiques des concentrations de fer et d'iode mesurées par tomographie quantitative pour chaque échantillon du fantôme 2. Les concentrations nominales des échantillons sont indiqués en mg/mL. 128

Figure 3.2.8 : Images tomographiques d'un cerveau de rat porteur d'une tumeur F98. Les images ont été acquises à 32,0 keV (a) et à 33,5 keV (b) de part et d'autre du K-edge de l'iode. Les fractions volumiques des différents composants ont été extraites avec l'algorithme de soustraction à deux énergies : la concentration du cerveau (c), des nanoparticules d'oxyde de fer (d) et de l'agent de contraste (e). 129

Figure 3.2.9 : Histogrammes de concentration en fer dans le volume de distribution chez 4 animaux traités par injection en CED de 18 mg/mL de nanoparticules. 131

Figure 3.3.1 : Architecture de GATE en trois couches (Perrot 2011) 132

Figure 3.3.2 : Carte des matériaux..... 135

Figure 3.3.3 : Schéma du plan d'irradiation. En faisceaux croisés, un faisceau vient du dessus du crâne (faisceau rouge) et l'autre provient de la droite du rat (faisceau bleu). Schéma du rat en vue de dessus (Gauche) et vue du plan transverse (Droite). Schéma adapté de (J.-F. Adam 2003) 136

Figure 3.3.4 : Calcul par simulations Monte-Carlo du DEF à différentes concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer dans un fantôme cylindrique d'eau de 20 mm de diamètre avec une tumeur sphérique de 3 mm de diamètre contenant un mélange d'eau et de nanoparticule d'oxyde de fer. La courbe rouge représente le DEF estimée par le rapport des μ_{en}/ρ 139

Figure 3.3.5 : Exemple de carte de dose du traitement synchrotron avec renforcement de nanoparticules d'oxyde de fer avec un faisceau d'énergie 35 keV..... 140

Figure 3.3.6 : Facteur de renforcement de dose en fonction de la concentration dans le rat..... 141

Figure 3.3.7 : Histogrammes dose volume dans la tumeur chez un rat porteur de glioblastome F98 selon 4 conditions d'irradiation : faisceaux croisés avec une énergie monochromatique de 35 keV (Bleu) ou 100 keV (Orange) ou avec un spectre polychromatique d'énergie équivalente à 100 keV (Vert), tomothérapie avec une énergie monochromatique de 35 keV (Rouge). A. Tumeur sans nanoparticules. B. Tumeur avec injection de 20 µL de nanoparticules de fer à 32 mg/mL. C. DEF calculé dans le volume tumoral avec injection de 20 µL de nanoparticules de fer à 32 mg/mL. 142

Figure 3.3.8 : Modèles virtuels en 3 dimensions des 4 rats réalisés avec Isogray. Le volume des nanoparticules de fer est représenté par le volume orange, le volume de la tumeur par le volume bleu clair. Le cerveau a été délimité par le volume bleu foncé transparent. Les deux faisceaux d'irradiation se croisent au niveau de la tumeur et sont représentés en bleu et en rouge. 143

Figure 3.3.9 : Histogrammes dose volumes chez 4 rats ayant reçu 20 µl de nanoparticules à 44 mg/mL. À gauche, représentation de la répartition du DEF dans les volumes de fer et tumoral. Au centre, répartition de la dose dans les volumes de fer et tumoral ainsi que la dose déposée dans la tumeur sans nanoparticules. À droite, vue 3D représentant le volume visible de nanoparticules de fer (orange) ainsi que le volume tumoral (bleu)..... 145

Figure 3.4.1 : Évolution du volume de distribution par rapport au volume d'injection des agents de contrastes. A. Gadolinium (Gd-DOTA) à une concentration de 1 mmol/L¹ (Besse 2011). La courbe rouge correspond à une vitesse d'injection de 3 µl/min et la courbe bleue correspond à une vitesse d'injection de 0,5 µl/min. La concentration du volume injecté est de 1 mmol/L. B. Iode (Iopamidol) à une concentration de 100 mg/ml avec une vitesse d'injection de 0,5 µl/min dans un cerveau de rat normal (bleu) et dans un cerveau de rat porteur d'une tumeur F98 (Rousseau et al. 2007)..... 147

Figure 3.4.2 : Mesure du diamètre hydrodynamique par DLS (Dynamic Light Scattering) des FeONP après une ou plusieurs sonications (600 W, 20 kHz) de 15 minutes. Même après sonication, les agglomérats de FeONP ont toujours un diamètre supérieur à 100 nm (Reymond 2018)..... 148

Figure 3.4.3 : Parcours des électrons dans l'eau selon l'approximation du ralentissement continu (CSDA). En rouge les photons de 35 keV ont un parcours de $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^2$, soit 23 µm pour une masse volumique de 1 g/cm³. (Berger 1992) 151

Figure 3.4.4 : Modèle linéaire quadratique : La survie des cellules tumorale diminue avec la dose selon la formule $S/S_0 = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$. (Reymond 2018) 152

Figure 4.2.1 : Frise chronologique représentant les différentes étapes de l'expérience. 156

Figure 4.3.1 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une injection de nanoparticules d'oxyde de fer par convection-enhanced delivery (CED) ou par voie intraveineuse (IV)..... 161

Figure 4.3.2 : Courbes de survie de rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une irradiation de 20 Gy prescrit à la tumeur à 35 keV en tomothérapie ou en faisceaux croisés, sans injection de nanoparticules..... 162

Figure 4.3.3 : Courbes de survie de rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une irradiation en faisceaux croisés de 20 Gy réalisée à 35 keV ou à 100 keV, en rayonnement monochromatique, sans injection de nanoparticules. 164

Figure 4.3.4 : Courbes de survie de rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu une irradiation en faisceaux croisés de 20 Gy à 100 keV avec un rayonnement monochromatique (débit de dose 0,4 Gy/s) ou polychromatique (débit de dose 5000 Gy/s)..... 164

Figure 4.3.5 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy à 35 keV monochromatique en mode tomothérapie avec les nanoparticules d'oxyde de fer injectées par CED à une concentration de 1,8 mg/mL (expérience 1), en faisceaux croisés avec les nanoparticules d'oxyde de fer injectées par CED à une concentration de 18 mg/mL (expérience 2) et 32 mg/mL (expérience 3)..... 166

Figure 4.3.6 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy à 100 keV rayonnement monochromatique en faisceaux croisés avec (vert) ou sans (orange) nanoparticules d'oxyde de fer injectées en CED à la concentration de 1,8 mg/mL..... 167

Figure 4.3.7 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy avec un faisceau polychromatique d'énergie équivalente à 100 keV (FLASH) en faisceaux croisés avec (vert) ou sans (orange) nanoparticules d'oxyde de fer injectées en CED à la concentration de 1,8 mg/mL..... 168

Figure 4.3.8 : Courbes de survie des rats porteurs d'une tumeur F98 après une thérapie combinant une irradiation de 20 Gy à 35 keV monochromatiques et des concentrations croissantes de nanoparticules d'oxyde de fer injectées en IV. (Irradiation en mode tomothérapie à gauche et faisceaux croisés à droite)..... 169

Figure 4.4.1 : Temps de survie théorique (D'après Adam 2003) 170

Liste des tableaux

Tableau 1.4.1 : Formes de principaux cristaux formés d'oxydes de fer. Le fer métallique est aussi appelé fer zero-valent (Greenwood and Earnshaw 1997).....	44
Tableau 1.4.2 : Comparaison des principales techniques de synthèse des IONP (Ali et al. 2016)	46
Tableau 1.4.3 : Propriétés des différents polymères d'enrobage (Evrin Umut 2013).	47
Tableau 1.4.4 : Médicaments à base d'IONPs approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et/ou la Commission européenne (CE) (Cortajarena et al. 2014).	51
Tableau 1.4.5 : Concentrations de nanoparticules de fer dans une tumeur cérébrale (glioblastome de rat C6) ou dans le cerveau sain, mesurées par ICP-MS (S.-J. Seo et al. 2013).	53
Tableau 2.1.1 : Comparaison des modes d'administration CED et injection intraveineuse.....	68
Tableau 2.3.1 : Paramètres d'acquisition IRM.....	76
Tableau 2.3.2 : Résumés des résultats d'IRM en fonction des conditions d'injection..	80
Tableau 2.4.1 : Résultats des mesures de volume, concentration moyenne et masse totale de fer pour chaque rat et moyenne par groupe aux différents temps de mesure. Le groupe 1 a reçu un volume de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer avec une concentration de fer de 18 mg/mL soit 360 µg de fer injecté. Le groupe 2 a reçu un volume de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer avec une concentration de fer de 32 mg/mL soit 640 µg de fer injecté.....	88
Tableau 2.4.2 : Paramètres d'ajustement pour la courbe de tendance $V(t) = V_0 \cdot \exp(-t/\tau)$. V_0 est le volume initial, τ la constante de temps exponentielle et R^2 le coefficient de détermination de la courbe. Volume injecté : 20 µL	90
Tableau 2.5.1 : Étapes de la coloration HE couplée au marquage au bleu de Prusse pour révéler le fer.	94
Tableau 2.5.2 : Étapes de coloration sur deux coupes consécutives. Coloration HE sur la première coupe, et marquage au bleu de Prusse sur la coupe adjacente. L'étape de fixation est identique après les deux colorations.	96
Tableau 2.6.1 : Avantages et inconvénients des différentes techniques d'imagerie utilisées dans ce chapitre.	103
Tableau 2.6.2 : Synthèse des résultats acquis au cours de ce chapitre.	107
Tableau 3.2.1 : Paramètres d'acquisition des fantômes 1 et 2 pour la tomographie à 2 énergies.	123
Tableau 3.2.2 : Concentrations de nanoparticules d'oxyde de fer mesurées dans le fantôme 1 par tomographie à deux énergies. L'écart-type (sigma) est mesuré dans la région d'intérêt. La différence relative correspond à la différence entre la valeur mesurée et la valeur nominale de la concentration, divisée par la valeur nominale. L'écart-type relatif est défini comme étant l'écart-type de la mesure divisé par la valeur moyenne.	125

Tableau 3.2.3 : Concentrations de fer et d'iode mesurées par la méthode de tomographie à deux énergies réalisées à 31 et 35 keV. La mesure représente la moyenne dans chaque tube (N=80 pixels)..... 127

Tableau 3.2.4 : Conditions de l'expérience préclinique de mesure de concentrations d'iode et de fer..... 129

Tableau 3.2.5 : Tableau récapitulatif avec les répartitions de fer dans les cerveaux de rats porteurs de tumeur F98 (n=8), ayant reçu une injection de nanoparticules par CED. Les moyennes (moy.) du groupe sont également déterminées ainsi que les écarts-types. 130

Tableau 3.3.1 : Fraction massique des éléments atomiques présents dans la composition des différents matériaux utilisés et leur densité, d'après ICRU-44 (White et al. 1989). 134

Tableau 3.3.2 : Table d'équivalence des matériaux..... 134

Tableau 3.3.3 : Coefficients d'absorption massique de l'eau, fer et de l'os à 35 et à 100 keV. D'après les données du NIST (Seltzer 2004)..... 140

Tableau 3.3.4 : Dose et DEF moyen mesurés dans le volume tumoral d'un rat ayant reçu une dose prescrite de 20 Gy avec ou sans nanoparticules d'oxyde de fer pour les quatre conditions d'irradiation étudiées..... 142

Tableau 3.3.5 : Résultats des mesures de dose et de DEF dans le volume de fer et le volume tumoral..... 143

Tableau 4.2.1 : Tableau récapitulatif des différents modes d'injection des nanoparticules et conditions d'irradiation. Le nombre de rats dans chaque groupe est précisé. La radiothérapie est réalisée avec un rayonnement monochromatique avec d'énergie 35 keV ou 100 keV, ou polychromatique avec une énergie équivalente de 100 keV. Les nanoparticules ont été injectées soit en injection intraveineuse (IV) soit par Convection-Enhanced Delivery (CED). 160

Tableau 4.3.1 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 n'ayant pas reçu de radiothérapie. Les rats ont reçu une injection par CED de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer ou par IV de 1 mL aux concentrations indiquées dans le tableau. N : nombre d'animaux par groupe..... 161

Tableau 4.3.2 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu la radiothérapie sans nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en tomothérapie (tomo) de 35 keV ou en faisceaux croisés (croisés) aux énergies de 35 keV et de 100 keV avec un faisceau monochromatique (mono) ou polychromatique (poly). N : nombre d'animaux par groupe..... 163

Tableau 4.3.3 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu le traitement combiné de radiothérapie avec injection de nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en tomothérapie (tomo) de 35 keV ou en faisceaux croisés (croisés) aux énergies de 35 keV monochromatiques. Les rats ont reçu une injection par CED de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer aux concentrations notées dans le tableau. Les comparaisons et calculs d'augmentation de survie ont été réalisées par rapport au groupe contrôle « non traités » de chaque expérience. N : nombre d'animaux par groupe. 166

Tableau 4.3.4 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu le traitement combiné de radiothérapie avec injection de nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en faisceaux croisés (croisés) aux énergies de 35 keV et de 100 keV avec un faisceau monochromatique (mono) ou polychromatique (poly). Les rats ont reçu une injection par CED de 20 µL de nanoparticules d'oxyde de fer, aux concentrations notées dans le tableau. N : nombre d'animaux par groupe..... 168

Tableau 4.3.5 : Résultats de survie chez les rats porteurs d'une tumeur F98 ayant reçu le traitement combiné de radiothérapie avec injection de nanoparticules. Les rats ont reçu une irradiation de 20 Gy en tomothérapie (tomo) ou en faisceaux croisés (croisés) à 35 keV avec un faisceau monochromatique. Les rats ont reçu une injection de nanoparticules d'oxyde de fer ou par IV de 1 mL à la concentration de 54 mg/mL. 169

Tableau 5.2.1 : Synthèse des études mesurant la concentration tumorale de nanoparticules d'oxyde de fer chez le rat porteur d'une tumeur cérébrale, après injection des nanoparticules en IV. 174

Tableau 5.2.2 : Synthèse des études mesurant la concentration tumorale de nanoparticules d'oxyde de fer chez le rat porteur d'une tumeur cérébrale, après injection des nanoparticules en CED. 175

Tableau 5.3.1 : Synthèse des calculs de DEF pour différentes nanoparticules réalisées avec des concentrations réalisables biologiquement..... 177

Résumé de la thèse

La radiothérapie occupe une place de premier plan dans le traitement du cancer. Pour les tumeurs agressives et radiorésistantes, comme les tumeurs cérébrales, l'optimisation du rapport entre la dose à la tumeur et la dose aux tissus sains est particulièrement difficile. Plusieurs modalités de thérapies combinées sont à l'étude pour augmenter le différentiel thérapeutique de la radiothérapie externe par injections d'éléments radiosensibilisants, s'accumulant préférentiellement dans le volume tumoral cible. Certaines de ses modalités thérapeutiques recherchent une augmentation physique de l'absorption du rayonnement ionisant (et donc de la dose) localisée et restreinte à la tumeur. Plusieurs essais ont été réalisés pour des irradiations utilisant les rayons x de basse et moyenne énergie (50-100 keV) monochromatiques, produits par un établissement de rayonnement synchrotron combinées à l'injection de produit de contrastes iodés, de drogues de chimiothérapie au platine ou à l'iode et enfin plus récemment avec des nanoparticules métalliques. Ces dernières permettent d'administrer une plus grande quantité d'éléments lourds dans la tumeur, et ainsi améliorer l'efficacité du renforcement de dose. Les nanoparticules d'oxyde de fer ont récemment montré un fort potentiel pour une utilisation en radiothérapie combinée, car elles sont peu toxiques, faciles à synthétiser, peu chères, et ont des propriétés magnétiques intéressantes. De plus elles s'accumulent en grande quantité dans le volume cible par un phénomène d'accumulation intracellulaire. Cette thèse présente les études ayant mené au transfert pré-clinique de cette technique de radiothérapie, afin d'en évaluer le potentiel sur un modèle de gliome intracrânien.

Au cours de cette thèse, différents travaux préliminaires en imagerie quantitative, puis en planification de traitement, ont été effectués afin de vérifier la faisabilité d'un traitement concomitant de radiothérapie externe en présence de nanoparticules d'oxyde de fer, chez le rat porteur d'un glioblastome F98.

Après un chapitre d'état de l'art, un premier chapitre de résultats présente l'étude de la biodistribution des nanoparticules dans le cerveau en fonction du mode d'injection (intraveineux et intracérébral). Le second chapitre présente les simulations dosimétriques qui ont été réalisées afin de calculer le renforcement de dose dû aux nanoparticules d'oxyde de fer dans le cerveau des rats traités. Ainsi que les indices de couverture du volume cible. Les valeurs de concentration d'oxyde de fer obtenues par injection intracrânienne laissent espérer une augmentation de dose physique significative. Cette augmentation de dose devrait conduire à une augmentation significative de la survie des rats.

Le dernier chapitre présente la première étude de survie chez les rats porteurs de gliome malin. De manière surprenante la réponse préclinique n'a pas été à la hauteur du potentiel pressenti lors des études de planification. Pour les injections intracrâniennes, il semblerait que le taux de recouvrement reste en deçà de ce qui est nécessaire pour une couverture thérapeutique. Seul un groupe de rat ayant reçu les nanoparticules de fer en intraveineux a montré une augmentation qui s'approche du seuil de significativité sans pour autant l'atteindre. ($p=0,07$).

En conclusion nous avons réalisé dans le cadre de cette thèse, le premier essai préclinique d'irradiations de gliomes intracrâniens par rayonnement synchrotron en présence de nanoparticules de Fer. Malgré une étude de bio distribution et une planification prometteuse, les résultats des essais précliniques en termes d'augmentation de survie pure restent modérés. Plusieurs pistes d'optimisation et d'amélioration du type de traitement sont également présentées et discutées. Ce travail est pour autant ce qu'il y a de plus aboutie en termes d'évaluation in vivo d'un traitement combiné utilisant les nanoparticules d'oxyde de Fer.