



**HAL**  
open science

# Nanoparticules de numéro atomique élevé en onco-radiothérapie : état des lieux, et évaluation de leur potentiel radio-potentialisant

Florent Vilotte

► **To cite this version:**

Florent Vilotte. Nanoparticules de numéro atomique élevé en onco-radiothérapie : état des lieux, et évaluation de leur potentiel radio-potentialisant. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02414343

**HAL Id: dumas-02414343**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02414343>**

Submitted on 16 Dec 2019

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

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

THÈSE n° 3002, année 2019

pour l'obtention du

**DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

SPÉCIALITÉ ONCOLOGIE OPTION RADIOTHÉRAPIE

**UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

UFR DES SCIENCES MÉDICALES

Présentée et soutenue publiquement le 11 janvier 2019, par

**Florent Vilotte**

Né le 20/01/1988 à Paris 14<sup>ème</sup>

**Nanoparticules de numéro atomique élevé en  
onco-radiothérapie**

**Etat des lieux, et évaluation de leur potentiel radiopotentialisant**

Sous la direction de Monsieur le Docteur en Génétique Humaine Hervé Seznec

Membres du jury :

M. le Professeur Guy KANTOR, Institut Bergonié, Bordeaux

M. le Professeur Antoine ITALIANO, Institut Bergonié, Bordeaux

M. le Professeur Jean BOURHIS, CHUV, Lausanne

Mme le Docteur Véronique VENDRELY, CHU Haut-Lévêque, Bordeaux

Mme le Docteur Amandine CROMBE, Institut Bergonié, Bordeaux

Président du jury

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Examinateur



THÈSE n° 3002, année 2019

pour l'obtention du

**DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

SPÉCIALITÉ ONCOLOGIE OPTION RADIOTHÉRAPIE

**UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

UFR DES SCIENCES MÉDICALES

Présentée et soutenue publiquement le 11 janvier 2019, par

**Florent Vilotte**

Né le 20/01/1988 à Paris 14<sup>ème</sup>

**Nanoparticules de numéro atomique élevé en  
onco-radiothérapie**

**Etat des lieux, et évaluation de leur potentiel radiopotentialisant**

Sous la direction de Monsieur le Docteur en Génétique Humaine Hervé Seznec

Membres du jury :

M. le Professeur Guy KANTOR, Institut Bergonié, Bordeaux	Président du jury
M. le Professeur Antoine ITALIANO, Institut Bergonié, Bordeaux	Rapporteur
M. le Professeur Jean BOURHIS, CHUV, Lausanne	Examineur
Mme le Docteur Véronique VENDRELY, CHU Haut-Lévêque, Bordeaux	Examineur
Mme le Docteur Amandine CROMBE, Institut Bergonié, Bordeaux	Examineur



# Remerciements

## **A NOTRE DIRECTEUR DE THESE**

### **Monsieur le Docteur en Génétique Humaine Hervé SEZNEC**

Responsable du Groupe *iRiBio* « Interactions Rayonnements ionisants et Biologie »

Chargé de Recherche CNRS CR1 section 21, UMR 8797 CENBG, IN2P3/CNRS (Section 1-13, CNU29)

Centre d'Etudes nucléaires de Bordeaux-Gradignan

Cher Hervé, je te remercie de m'avoir accompagné durant tout ce travail, d'avoir fait preuve d'autant de patience et de pédagogie. Ces quelques mois passés à tes côtés au CENBG ont été particulièrement enrichissants et d'un point de vue personnel, une très belle expérience. Je te remercie pour tout le temps que tu as passé à m'initier à ton univers de la recherche et de la biologie que je ne connaissais pas, et à me l'avoir fait aimer. Merci pour ton aide précieuse, tant durant ce master que pour la rédaction de cette thèse, et d'y avoir consacré autant de temps et d'énergie... Merci enfin pour ta gentillesse et ton entrain constant. Merci de faire passer l'humain avant les résultats, et pour tous ces moments d'échange. Travailler et partager ce temps à tes côtés fut un plaisir ! Je te prie de trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon amitié.

## **A NOTRE PRESIDENT DE JURY**

### **Monsieur le Professeur Guy KANTOR**

Professeur des Universités

Département de Radiothérapie

Institut Bergonié, Bordeaux

Cher Maître, vous me faites l'honneur de présider ce jour mon jury pour ma soutenance de thèse. Votre enseignement, tout au long de ces années d'internat, m'a permis de m'épanouir dans cette spécialité. Je vous remercie pour votre écoute attentive, et votre aide continue dans la conduite de mes études. Vous m'avez accompagné dans ces projets de master 2 et de stage au CHUV, et les avez rendus possibles. Merci pour votre bienveillance constante et la précieuse attention que vous portez à vos internes.

Veillez trouver dans ces lignes l'expression de ma profonde gratitude et mon sincère respect.

## **A NOTRE RAPPORTEUR DE THESE**

**Monsieur le Professeur Antoine ITALIANO**

Professeur des Universités

Service d'Oncologie Médicale – Groupe Sarcome

Institut Bergonié, Bordeaux

Cher Maitre, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Votre implication dans la recherche médicale au sein de l'Institut Bergonié est un des moteurs fondamentaux permettant de mener à bien des projets de travail comme celui-ci. Votre jugement et votre expérience ne peuvent que l'enrichir.

Veillez trouver ici les marques de mon profond respect.

## **A NOTRE JUGE**

**Monsieur le Professeur Jean BOURHIS**

Professeur des Universités

Chef de Service de Radio-Oncologie

Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Université de Lausanne, Lausanne

Cher Maitre, vous me faites ce jour l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Vous m'avez offert la possibilité de bénéficier de votre enseignement en me permettant de rejoindre votre service, je vous en remercie. Vos qualités pédagogiques, votre expérience et votre vision de la radiothérapie, que vous nous communiquez chaque jour, sont une vraie source d'inspiration. Ce semestre passé à vos côtés à apprendre la radiothérapie ORL a été le plus enrichissant de mon internat. Votre présence à cette thèse est un honneur et un plaisir.

Veillez trouver dans ces lignes, les marques de mon profond respect et de ma reconnaissance.

## **A NOTRE JUGE**

**Madame le Docteur Véronique VENDRELY**

Praticien Hospitalier

Service de Radiothérapie, Hôpital du Haut-Lévêque

Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux

Je vous remercie de bien vouloir me faire l'honneur de juger mon travail. Le semestre que j'ai pu passer dans votre service a été particulièrement enrichissant, et restera un excellent souvenir. Vos qualités scientifiques et votre volonté de développement de la recherche clinique sont une chance. Votre présence à cette thèse est de ce fait un honneur et un plaisir.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

## **A NOTRE JUGE**

**Madame le Docteur Amandine CROMBE**

Docteur en médecine

Service de Radiologie

Institut Bergonié, Bordeaux

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail. Votre implication dans la recherche à l'Institut Bergonié apportera une grande valeur à cette soutenance.

Je vous prie d'accepter mes sincères remerciements et l'expression de mon respect.

## **A Monsieur le Docteur Camille VERRY**

Praticien Hospitalier

Service de Radiothérapie

Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Grenoble

Je vous remercie de votre précieuse aide dans la relecture de ce manuscrit, de vos conseils, et de la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de m'apporter votre expérience dans le domaine des nanoparticules.

Veillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon respect.



### **A ma famille,**

A mes parents, ma sœur Alice et mon frère Antoine, qui ont toujours été présent tout au long de ces longues années d'études, y compris les moments plus difficiles. Merci pour votre soutien, je vous aime, et ce travail est pour vous.

### **A mes amis,**

Pour lesquels la plus grande difficulté va être de n'oublier personne !

Aux « Parisiens » des débuts, avec qui j'ai partagé tant de bons moments, et avec qui tant d'autres vont suivre (à commencer par un certain 22 juin) : Jenna et Yann (de la Grèce à cet été on aura pas vu le temps passer), Marine et Chris les « parigo-niço-lyonno-zurichois bourlingueurs », Marion et Greg, Lucie et Benoit, Deborah, Maud, Kevin, Marie, Damien... que de bons moments passés avec vous ! Il va être temps de remettre les casseroles à jours... et de repartir pour de nouvelles aventures ! ☺

A mon espagnol préféré, Kevinob Kenobi (on va éviter de compter les années, je commence à m'y perdre !) et à Sonia : je compte bien venir goûter quelques tapas par chez vous ! ☺

A Matt pour tous ces bons moments !

A Antoine W et toute sa famille : ça commence à durer cette affaire là aussi !

Aux « Bordelais », avec qui on a construit tant de souvenirs, qu'on va s'attacher à multiplier :

Nicolas et Laure-Emmanuelle : merci pour votre gentillesse constante, votre soutien de tous les instants, tous ces bons moments passés ensemble, ces soirées nanards, ces welshs partagés et tout ce qui va avec. C'est plus qu'un honneur d'être ton témoin pour ce qui sera une journée mémorable ☺ Grosses bises à vous deux (et aller, la bise à Mimine aussi, je ne recule devant rien !)

A Vincent, Lisa, Clélia et Raphaël : merci pour tous ces bons moments passés avec vous, vous formez une petite famille en or ! Avoir été ton témoin de mariage était une véritable preuve d'amitié et je suis particulièrement fier de cette amitié-là. Je vous embrasse !

A Nicolas et Solène : merci pour tous ces moments de partage, toutes ces soirées biarrottes, ces rires et ces moments de joie. Savoir que vous êtes là a toujours quelque chose de rassurant, c'est à ça aussi qu'on mesure l'amitié ☺ A nos prochains moments communs (dont un voyage en Islande ?? J'en profite pour lancer l'idée hein... ;)

A tous mes pharmas préférés (qui ont eu la gentillesse de m'adopter, bien que n'étant qu'un vilain médecin) ! A Cécile (la Bretagne n'est pas assez loin pour que tu nous échappes !), MC et Adrien (bientôt le marathon en moins de 3h, mais seulement après une poutine maison !), Thibault et Marine, Simon, Margaux et Louis (autre infiltré de la bande ! N'oubliez pas les ballons « spéciaux » pour le jour J... ;) )

Au « Capitaine Auriac » et à « Sophie-Cha » : merci pour tous ces bons moments passés avec vous, toujours partant pour embarquer sous votre commandement vers de nouveaux horizons !  
Le vôtre s'annonce radieux ☺

A Julia et Julien, mes « Ju » préférés ! Merci pour votre présence depuis ce fameux stage à Pellegrin, et votre gentillesse ! A Agathe et Severin, à nos papotes de colloques, à tes talents de conducteur (et ton amour des rétroviseurs ;) ) et à ce super voyage à Rome !

A la team Saint André : Marion la baronne, popa Baptiste Sionneau – avec Cécile, Louise et Constance ! n'oubliez pas qu'une enquête est en cours... et que « 96 – 93 » ! – Nico (encore) et Fanny !

A Marion et Antoine qui nous ont offert un superbe mariage, Léa sur son île avec Margaux, Annabelle et Guillaume, Manon, Mélanie et Shamshad

A Pauline et Vincent, à ce voyage en Espagne, vous allez être si bien à Nice !

A Mario et Philippe, merci pour cette super année de collocation dans l'antre de la rue de Doumerc !

A la Talençaise du groupe : et oui Laurène, à une rue près tu aurais été bordelaise (mais bon, ça te fait un petit paragraphe personnalisé ici, donc ça compense ! ;) )

A Didier Deschamps et à son animal fétiche, qu'ils me portent chance pour « ma » finale !

Aux Lausannois qui m'ont accueilli il y a un peu plus d'un an maintenant :

A Alice et Victor : merci pour votre accueil, votre aide et votre amitié ! Il est rare de rencontrer des gens comme vous, et je sais que cette amitié restera ! Merci de m'avoir fait découvrir cette belle ville et partager votre univers : vous êtes au top ☺

A Mailys (a nos courses dans le froid et ces moments de soutien ! Profites bien du Canada !), à Galaad et nos parties de rigolade ( I say « Captain ! », you say ??), Johan et les expéditions dans lesquelles il nous emmène, Julian, Raphaël et Margaux (merci pour votre aide !), Minh Anh, Gaël, Guillaume, Ange et Samirah.

A mes cointernes de toutes ces années, et à tous ceux qui ont rythmé cet internat : Shakeel, François, Mathieu, François-Xavier, Hugues, Vardouhie, Sophie, Adeline, Felix et Marie-Annaig, Julie « la Dr du deuxième », Thomas, Frédéric, Eivind, Edona, Céline, Claudia, Clémence, Julie R, Emilie, Charlotte, Coriolan, Florie, Gaëlle, Gülen, Clément et tous les autres !

### **Au service de Radiothérapie de l'Institut Bergonié :**

Merci à vous de m'avoir accueilli à deux reprises dans votre équipe, et de m'avoir accompagné durant ma formation.

Monsieur le Professeur Guy KANTOR, merci pour votre aide et votre pédagogie.

Mme le Docteur Christelle BRETON-CALLU

Monsieur le Docteur Paul SARGOS, merci pour ta pédagogie, ta bonne humeur et ces discussions « hors radiothérapie » qui font tant de bien !

Madame le Docteur Adeline PETIT

Madame le Docteur Laurence THOMAS

Monsieur le Docteur Philippe LAGARDE

Madame le Docteur Bénédicte HENRIQUES DE FIGUEIREDO, merci pour ton aide et ta bienveillance

Monsieur le Docteur Maxime BOBIN, merci pour ces bons moments passés ensemble !

A toute l'équipe des manipulatrices et manipulateurs : merci pour votre bonne humeur et votre aide lors mon apprentissage !

A toute l'équipe des secrétaires, notamment à Céline et Kathia pour votre gentillesse.

A toute l'équipe de dosimétrie : Sophie et son rire, Marc, Corinne et tous les autres

A l'équipe de physique : merci à Mikael Antoine pour son aide lors de ces séances d'irradiation nocturne, sans toi rien n'aurait été possible ! A Sarah, Audrey, Jérôme, Anthony, Charles, Christina et Emilie.

A Olivier, pour ta présence quotidienne et ta bonne humeur !

**Au service de radiothérapie du CHU Haut-Lévêque :**

Merci pour votre accueil et votre bienveillance durant ces 6 mois passés avec vous !

A monsieur le Docteur Renaud TROUETTE

A madame le Docteur Véronique VENDRELY, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury

A monsieur le Docteur Charles DUPIN, merci de ta très grande pédagogie et de ta patience

A monsieur le Docteur Thibaud HAASER

A monsieur le Docteur Aymeri HUCHET, merci pour votre formation

A madame la Docteur Nora OUHABRACHE-BOUZID

A toute l'équipe des manipulatrices et manipulateurs.

A toute l'équipe du secrétariat.

A toute l'équipe de dosimétrie, notamment Florence pour sa gentillesse quotidienne

A toute l'équipe de physique : Sarah, Julie, Laura, Soulé, Catherine...

**Au service d'oncologie médicale du CHU Saint-André :**

Merci de m'avoir accueilli chez vous pour ce qui restera un des semestres les plus marquants de mon internat ! Votre humanité et votre bonne humeur sont un vrai bonheur quotidien.

A Monsieur le Professeur Alain RAVAUD

A Madame le Docteur Marine GROSS-GOUPIL

A Madame le Docteur Fanny LAFAYE, merci pour ta gentillesse de tous les jours !

A Monsieur le Docteur Amaury DASTE, merci pour ton aide durant ce semestre

A Madame le Docteur Amandine QUIVY

A Madame le Docteur Laurence DIGUE

A Madame le Docteur Nathalie TRUFFLANDIER

A Madame le Docteur Isabelle CATRY-THOMAS

A Monsieur le Docteur Denis SMITH

A toute l'équipe infirmière, avec qui on a passé tant de moments de partages, pas toujours faciles, mais toujours vrais. A Laurence, à Lisa encore, et à tout le reste de l'équipe qui a fait de ce semestre un moment inoubliable.

**Au service d'onco-radiothérapie de l'Hopital Robert Boulin de Libourne :**

Merci pour ces bons moments passés avec vous et votre formation.

A Madame le Docteur Maylis CARRICABURU

A Madame le Docteur Muriel GARCIA-RAMIREZ

A Monsieur le Docteur Samir ABDICHE MENOVAR

A Madame le Docteur Anna MIHONIDOU

A Madame le Docteur Marie SIRE

A toute l'équipe du secrétariat pour votre gentillesse ! A toute l'équipe soignante, notamment Rachel pour ces moments de rigolade !

**Au service d'Hépto-Gastro-Entérologie du CHU Haut-Lévêque :**

Merci pour ce premier semestre et votre formation.

A Monsieur le Professeur Victor DE-LEDINGHEN

A Monsieur le Professeur David LAHARIE

A Madame le Docteur Faiza CHERMAK

A Monsieur le Docteur Jean-Baptiste HIRIART, merci pour ton aide lors de ces premiers pas en tant qu'interne

A Monsieur le Docteur Éric TERREBONNE

A Madame le Docteur Iris DEVAURE

A Monsieur le Docteur Julien VERGNIOL

A toute l'équipe médicale, paramédicale et du secrétariat.

**Au service de Radiologie du CHU Pellegrin :**

Merci pour votre accueil et votre formation, ce semestre était particulièrement agréable et a donné naissance à de belles amitiés !

A Monsieur le Professeur Nicolas GRENIER

A Madame le Docteur Claude FOURNIER

A Monsieur le Docteur Yann LE BRAS

A Madame le Docteur Elise TRICAUD

A Madame le Docteur Anne-Sophie LASSERRE

A toute l'équipe médicale, paramédicale et du secrétariat.

**Au service de Réanimation Médicale du CHU Saint André :**

A Monsieur le Docteur Olivier GUISSSET

A Madame le Docteur Gaëlle MOURISSOUX

A Monsieur le Docteur Fabrice CAMOU

A Madame le Docteur Suzanne CHAMPION

A toute l'équipe médicale, paramédicale et du secrétariat.

## **Au service de Radio-Oncologie du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois :**

Merci à tous pour votre accueil dans ce beau pays, votre bonne humeur quotidienne et votre dévouement. Travailler avec vous est un vrai plaisir !

A Monsieur le Professeur Jean BOURHIS, merci de votre enseignement, de votre confiance, et de l'honneur que vous me faites d'être présent en ce jour important

A Monsieur le Professeur Esat Mahmut ÖZSAHIN, merci pour votre enseignement

A Monsieur le Professeur Oscar MATZINGER

A Madame la Doctoresse Wendy JEANNERET SOZZI, merci pour votre présence et votre aide

A Madame la Doctoresse Fernanda HERRERA, merci pour votre apport scientifique quotidien

A madame la Doctoresse Pelagia TSOUTSOU

A Monsieur le Docteur Luis SCHIAPPACASSE, merci pour ta pédagogie, ton aide – tant sur le plan professionnel qu'humain – et ta bonne humeur quotidienne ! Travailler dans ton équipe est une chance et un plaisir !

A Monsieur le Docteur André DURHAM, merci pour ton aide et ton accueil lors de mon arrivée dans le service !

A Monsieur le Docteur Raphaël JUMEAU, merci pour tous ces bons moments, cette année sera chargée de plein d'autres ! Merci pour ton soutien et ton aide en ce début de clinicat.

A Monsieur le Docteur Julian BIAU, merci pour ce semestre passé avec toi, ce fut un vrai plaisir. Merci pour ton enseignement, et surtout pour ta sincérité et ta bienveillance ! Ce semestre avec toi était le plus enrichissant de mon internat, mais comme tu l'aurais dit, c'était « écrit sur la peau du lapin » !

A Madame la Doctoresse Marie-Catherine VOZENIN, pour l'intérêt qu'elle porte aux nanoparticules, et à toute son équipe pour leur superbe travail sur la FLASH radiotherapy !

A toute l'équipe des TRM (et ils sont nombreux !) : Coralie (j'attends mon « Robin-Signal » !!), Fred, Isabelle, Léonie, Susana, Joao, Romain, Danielle, Irène, Yoann, Laura, Macarena, Patricia, Amandine, Cédric, Agnès, Leire, Helen, Sedanur et Nicole !

Merci à toute l'équipe infirmière qui fait un super travail : Rodrigo, Odile, Florence, Neima et Rina !

A toute l'équipe de physique (qui me supporte encore !) : Véronique, Maude et Maud, David, Natacha, Michele et Rapahael Moeckli. Merci pour votre aide et vos réponses patientes à toutes mes questions.

A mes deux (premières) médecin assistantes qui sont d'une efficacité et d'une gentillesse rare : Shaima et Sarah. Ce semestre sera spécial grâce à vous !

A la super équipe du secrétariat : énormes remerciements à Sarah pour tout ce que tu as fait depuis le début, toute l'aide et l'écoute que tu m'as apporté. Merci à Virginie et Sandrine, pour votre efficacité et les bons moments passés avec vous, vous êtes des perles. Merci à Laurent et Valérie pour votre accueil et votre sympathie, à Coralie, Delphine, Nikita, Loïc, Laura et Lionel.

**A toute l'équipe du CENBG, et tout particulièrement l'équipe iRiBio :**

Notamment à Hervé, Giovanna, Marina, Eva, Nathalie, Claire, Guillaume, Philippe et Sébastien : merci pour ces 6 mois passés avec vous, qui furent d'excellents moments dont je garde de supers souvenirs ! Merci pour votre patience, et pour votre sympathie quotidienne. Grace à vous j'ai pu non seulement découvrir un nouveau monde, mais aussi apprécier la bonne humeur et la gentillesse qui règnent dans votre équipe ! Mettre en avant les personnes avant le résultat semble être la marque de fabrique iRiBio, il va falloir la breveter ! ;)

En espérant vous revoir bientôt !

Enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas cité et qui m'en excuseront !

Ce furent de belles années, rendons les prochaines encore meilleures ! Et que cela ne reste pas que des mots, car pour paraphraser un bordelais célèbre, « c'est une belle harmonie quand le dire et le faire vont ensemble ».

A la mémoire de mes grands-parents.

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>15</b>
<b>Liste des figures et tableaux</b> .....	<b>16</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>18</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>21</b>
<b>Partie I : Développements actuels en radiothérapie</b> .....	<b>25</b>
<b>1. Rappels de radiobiologie</b> .....	<b>27</b>
1.1 Phase physique .....	27
1.2 Phase chimique .....	36
1.3 Phase biologique .....	37
<b>2. Voies de développement en radiothérapie</b> .....	<b>38</b>
2.1 Développements technologiques des appareils de traitement.....	39
2.2 Modification des schémas thérapeutiques : approche radiobiologique.....	40
2.4 Modification des type de rayonnements : .....	42
2.5 Les associations thérapeutiques.....	42
2.6 Imagerie fonctionnelle et métabolique .....	45
2.7 Biomarqueurs et médecine personnalisée.....	46
<b>Partie II : Nanotechnologies et onco-radiothérapie</b> .....	<b>49</b>
<b>1. Nanotechnologies et Nanomédecine</b> .....	<b>51</b>
1.1 Nanotechnologies : définition et historique.....	51
1.2 Nano-objets : définition et propriétés .....	52
1.3 Nanotechnologies : Domaines d'application.....	54
1.4 Introduction à la Nanomédecine .....	55
<b>2. Nanoparticules</b> .....	<b>56</b>
2.1 Nanoparticules : définitions.....	56
2.2 Comportement des nanoparticules en milieu biologique .....	60
2.3 Applications médicales des nanoparticules.....	71
<b>3. Nanoparticules à numéro atomique élevé en radiothérapie</b> .....	<b>85</b>
3.1 Nanoparticules à numéro atomique élevé : introduction.....	85
3.2 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Physique.....	109
3.3 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Chimie .....	120
3.4 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Biologie.....	122
3.5 Mode d'action des Nanoparticules de numéro atomique élevé : conclusion .....	129
3.6 Notions de nanotoxicologie .....	131
3.7 Challenges en vue d'une translation clinique.....	135
<b>Partie III : Partie expérimentale</b> .....	<b>147</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>149</b>
1.1 Nanoparticules de TiO <sub>2</sub> .....	150
1.2 Lignée cellulaire IB115 .....	150
1.3 Analyse par microfaisceaux d'ions (ou « <i>ion beam analysis</i> » - IBA).....	151
1.4 Questions et objectifs du travail .....	152
2. Résultats expérimentaux.....	153
<b>3. Discussion et Perspectives</b> .....	<b>161</b>
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>162</b>
<b>5. Manuscrit</b> .....	<b>163</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>184</b>
<b>Serment d'Hippocrate</b> .....	<b>195</b>



# Liste des figures et tableaux

## FIGURES

<b>Figure 1</b> : Les trois phases de l'interaction RI- matière	27
<b>Figure 2</b> : Principe de l'effet photo-électrique	30
<b>Figure 3</b> : Ratio d'émission de photon de fluorescence et d'électron Auger	31
<b>Figure 4</b> : Effet Compton	32
<b>Figure 5</b> : Parcours des électrons dans l'eau	33
<b>Figure 6</b> : Production de paires	34
<b>Figure 7</b> : influence du numéro atomique et de l'énergie des photons sur le type d'interaction	36
<b>Figure 8</b> : Courbes TCP et NTCP en fonction de la dose	38
<b>Figure 9</b> : Courbe de survie cellulaire en fonction de la dose	41
<b>Figure 10</b> : Développements actuels de la radiothérapie	47
<b>Figure 11</b> : Définition ISO des nanomatériaux	52
<b>Figure 12</b> : Ratio surface/volume des nanoparticules	53
<b>Figure 13</b> : Propriétés optiques des Nanoparticules	54
<b>Figure 14</b> : Hôtel de Police de Bordeaux	55
<b>Figure 15</b> : A l'échelle du Nanomonde	59
<b>Figure 16</b> : Comportement des NPs <i>in vivo</i>	70
<b>Figure 17</b> : Radio-chimiothérapie pour cancer de la tête et du cou	73
<b>Figure 18</b> : Principe du MDT	73
<b>Figure 19</b> : Développements actuels en radiothérapie et apport des Nanoparticules	84
<b>Figure 20</b> : Coefficient d'absorption massique de l'énergie	88
<b>Figure 21</b> : Principe de l'interaction de photons incidents avec des NPs de Z élevé	89
<b>Figure 22</b> : Détermination de la DMF	91
<b>Figure 23</b> : Hainfeld <i>et al.</i> 2004 : volume tumoral et survie des souris	93
<b>Figure 24</b> : Mirjole C. <i>et al.</i> 2011 : courbes de survies cellulaires et rapport $\alpha/\beta$	94
<b>Figure 25</b> : Maggiorella C <i>et al.</i> 2012 : NBTXR3	96
<b>Figure 26</b> : Discordances entre prévisions physiques et observations expérimentales	103
<b>Figure 27</b> : Mécanismes d'action des NPs en présence de rayonnements ionisants	108
<b>Figure 28</b> : Comparaison des sections efficaces sans et avec NPs d'or	111
<b>Figure 29</b> : Spectre de production d'électrons Auger	115
<b>Figure 30</b> : Modélisation des électrons secondaires issus d'une interaction RI –NP	116
<b>Figure 31</b> : Courbes de survie cellulaires, comparaison LEM et résultats expérimentaux	118
<b>Figure 32</b> : Comparaison approche macroscopique et approche microscopique	120
<b>Figure 33</b> : Augmentation dynamique de la phase chimique en présence de NPs	121
<b>Figure 34</b> : Mirjole C. <i>et al.</i> 2011 : accumulation des dommages ADN à 24h	123
<b>Figure 35</b> : Chimiosensibilisation à la Bléomycine par des NPs d'or	124
<b>Figure 36</b> : TiO <sub>2</sub> NPs et dysfonction mitochondriale	125
<b>Figure 37</b> : TiO <sub>2</sub> NPs, calcium intracellulaire et stress du RE	127
<b>Figure 38</b> : NPs d'or et dérégulation du cycle cellulaire	128
<b>Figure 39</b> : Mécanismes et paramètres clés de la radiosensibilisation par NPs de Z élevé	130
<b>Figure 40</b> : Injection de NBTXR3® et coupes scannographiques	141
<b>Figure 41</b> : Principes de l'analyse par faisceaux d'ions	152
<b>Figure 42</b> : NPs de TiO <sub>2</sub> et libération cytosolique du cytochrome <i>c</i>	154
<b>Figure 43</b> : Cartographie multi-élémentaire et concentration calcique intracellulaire	155
<b>Figure 44</b> : Les NPs potentialisent la réponse des voies du stress du RE à l'irradiation	157
<b>Figure 45</b> : Voies ERSE, ATF6 et ATF4 sous irradiation	159

## **TABLEAUX**

<b>Tableau 1 :</b> Nanomédecines en onco-radiothérapie au stade clinique	75
<b>Tableau 2 :</b> Liste non exhaustive des études de radiopotentialisation par NPs de Z élevé (or principalement) et faisceaux de photons	98
<b>Tableau 3 :</b> Comparaison des résultats expérimentaux et des augmentations de doses prédites par les coefficients d'atténuation énergétiques, les concentrations de NPs d'or et l'énergie de la source de photons, pour une sélection d'études In Vitro	105
<b>Tableau 4 :</b> EBR adaptées des résultats expérimentaux de Chithani et al. et de Jain S <i>et al.</i> , et paramètres des courbes de survie en fonction de l'énergie de la source et de la présence ou non de NPs	107
<b>Tableau 5 :</b> MDEF selon concentration de NPs et énergie du faisceau d'irradiation	112

## Liste des abréviations

**AIFIRA** : Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine  
**Au** : Or (AuNPs : NanoParticules d'or)  
**AUC** : *Area Under Curve*, Aire Sous la Courbe  
**CENBG** : Centre Études Nucléaires de Bordeaux Gradignan  
**CML** : Collimateur Multi-Lames  
**DBE** : Dose Biologique Efficace  
**DEF** : *Dose Enhancement Factor*, Facteur d'Augmentation de la Dose  
**DMF** : *Dose Modifying Factor*, Facteur de Modification de la Dose  
**EGFR** : *Epidermal Growth Factor Receptor*, Récepteur du Facteur de Croissance Epidermique  
**EPR** : *Enhanced Permeability and Retention effect*, Effet de Perméabilité et de Rétention Augmentées  
**eV** : électron-Volt (KeV : kilo électron-Volt ; MeV : Méga électron-Volt)  
**FDA** : *Food And Drug Administration*, Agence Américaine des produits Alimentaires et Médicamenteux  
**Gy** : Gray  
**Hf** : Hafnium  
**IBA** : *Ion Beam Analysis*, Analyse par Faisceaux d'Ions  
**ICRU** : *International Commission on Radiation Units ad Measurements*, Commission Internationale des Unités et Mesures Radiologiques  
**IGRT** : *Image-Guided Radiation Therapy*, Radiothérapie Guidée par l'Image  
**IONPs** : *Iron Oxyde NanoParticles*, Nanoparticules d'Oxyde de Fer  
**iRiBio** : Interactions Rayonnements Ionisants et Biologie  
**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique  
**ISO** : *International Organization for Standardization*, Organisation Internationale de Normalisation  
**LEM** : *Local Effect Model*, Modèle de l'Effet Local  
**LT** : Lymphocytes T  
**mDEF** : *Microscopic Dose Enhancement Factor*, Facteur d'Augmentation de la Dose Microscopique  
**MDEF** : *Macroscopic Dose Enhancement Factor*, Facteur d'Augmentation de la Dose Macroscopique  
**MEC** : Matrice Extra-Cellulaire  
**MLQ** : Modèle Linéaire-Quadratique  
**NER** : *Nanoparticles mediated Enhancement Ratio*, Ratio d'Augmentation médié par les Nanoparticules  
**NPs** : NanoParticules  
**NTCP** : *Normal Tissues Complication Probability*, Probabilité de Complication des Tissus Normaux  
**OAR** : Organes A Risque  
**PEG** : Polyéthylène Glycol  
**PGLA** : Poly(lactic-co-glycolic acid)  
**PIXE** : *Particle-Induced X-Ray Emission*, Emission de Photons X Induite par Particules  
**PSA** : *Prostate-Specific Antigen*, Antigène Spécifique de la Prostate  
**RBS** : *Rutherford Backscattering Spectrometry*, Spectrométrie de Rétrodiffusion de Rutherford  
**RCMI** : Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité  
**RE** : Réticulum Endoplasmique  
**RI** : Rayonnement Ionisant  
**ROS** : *Reactive Oxygen Species*, Espèces Réactives de l'Oxygène  
**RTC-3D** : Radiothérapie Conformationnelle Tridimensionnelle

**RTCT** : Radio-Chimiothérapie  
**RTqPCR** : *Retro-Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*, Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative par Rétro-Transcription  
**SER** : *Sensitization Enhancement Ratio*, Ratio d'Augmentation de la Sensibilité  
**SPIONPs** : *Super Paramagnetic Iron Oxyde Nanoparticles*, Nanoparticules d'Oxyde de Fer Super-Paramagétiques  
**SRE** : Système Réticulo-Endothélial  
**TCP** : *Tumor Control Probability*, Probabilité de Contrôle Tumoral  
**TDM** : Tomodensitométrie  
**TEP** : Tomographie par Émission de Positons  
**TiO<sub>2</sub>** : Dioxyde de Titane (TiO<sub>2</sub> NPs : NanoParticules de Dioxyde de Titane)  
**TLE** : Transfert Linéique d'Énergie (*LET : Linear Energy Transfer*)  
**TLR** : *Toll-Like Receptors*, Récepteurs de type Toll  
**TPS** : *Treatment Planning System*, Système de Planification de Traitement  
**UPR** : *Unfolded Protein Response*, Réponse au Protéines Dépliées (réponse du réticulum endoplasmique à un défaut de conformation protéique)  
**USPIONPs** : *Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxyde Nanoparticles*, Nanoparticules d'Oxyde de Fer Super-Paramagétiques « super petites »  
**VMAT** : *Volumetric Arc Therapy*, Irradiation avec Modulation d'Intensité Volumétrique par Arc Thérapie  
**Z** : Numéro atomique d'un atome



# Introduction

La radiothérapie se définit par l'utilisation de radiations ionisantes dans un but thérapeutique. Apparue à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, suite à la découverte par Wilhelm Conrad Röntgen des rayons X en décembre 1895, la radiothérapie s'est progressivement imposée dans l'arsenal des thérapies anti-cancéreuses<sup>1</sup>.

Sa première utilisation documentée fut l'œuvre de Victor Despeignes qui, dès le 4 juillet 1896 (soit quelques mois à peine après la découverte de Röntgen), appliqua un premier traitement à l'un de ses patients atteint d'un probable lymphome gastrique. Si l'efficacité fut de courte durée, Despeignes nota néanmoins que ce traitement avait permis de prolonger la survie de son patient de quelques semaines, d'améliorer significativement son état général, de contrôler localement les douleurs et de faire diminuer la masse tumorale. Il postula ainsi qu'une prise en charge plus précoce aurait pu amener à une guérison : les bases de la radiothérapie comme traitement loco-régional du cancer étaient posées<sup>2</sup>.

Depuis lors, les découvertes combinées en physiques, chimie et biologie, amenant à la création d'une nouvelle branche de recherche (la radiobiologie), puis les développements technologiques principalement à partir des années 1970, ont permis de consolider cette nouvelle spécialité tant du point de vue des connaissances fondamentales que de ses applications cliniques<sup>1</sup>.

De nos jours, la radiothérapie est un des principaux traitements à visée anti-tumorale, tant pour les affections malignes que bénignes. Ses indications sont à visée soit (i) curative lors d'un traitement radical, (ii) néo-adjuvante ou adjuvante (pour faire diminuer la masse tumorale et/ou éradiquer la maladie résiduelle en combinaison à une chirurgie), ou (iii) palliative afin d'améliorer les symptômes du patient<sup>3</sup>.

Son implication dans la prise en charge du cancer est majeure, puisqu'il est estimé qu'environ 50% des patients atteints de cancer auront, à un moment de leur parcours, recouru à la radiothérapie<sup>4</sup>, et que celle-ci est responsable d'au moins 16% des guérisons<sup>5</sup>.

Néanmoins, la radiothérapie peut également s'accompagner d'effets secondaires, qu'ils soient aigus ou tardifs. Si les effets secondaires aigus survenant en cours de traitement sont pour la plupart réversibles et contrôlables afin de mener le traitement à son terme, les effets secondaires tardifs sont souvent plus difficiles à prédire et à traiter, pouvant handicaper sérieusement les patients. Ce traitement peut également être responsable de l'induction de seconds cancers dans les champs d'irradiation, dont l'incidence globale est estimée de 1% à 10 ans<sup>6</sup>.

Ainsi, la recherche en radiothérapie s'est principalement focalisée sur deux objectifs : maximiser le taux de guérison en délivrant une dose suffisante à la tumeur, tout en limitant les effets secondaires aigus ou tardifs dus à l'irradiation des tissus sains. C'est le concept du « ratio

thérapeutique » : une balance entre les bénéfices et les risques, entre le contrôle tumoral et les toxicités potentielles.

Les voies de recherche et de développement ont été et sont toujours variées<sup>7</sup> et il est possible de les classer selon leurs objectifs qui visent à améliorer : (i) l'effet anti-tumoral ; (ii) la protection des tissus sains (réduction des effets secondaires) ; (iii) la personnalisation des traitements ; (iv) les développements technologiques (accélérateur, imagerie, plan de traitements). Ainsi, l'obtention d'un meilleur effet « anti-tumoral » est recherché soit par une augmentation de la dose totale délivrée à la tumeur (escalade de dose, stéréotaxie...)<sup>8</sup>, soit par une augmentation de l'efficacité biologique de la dose délivrée à la tumeur (modifications du fractionnement et de l'étalement, utilisation de rayonnements ionisants de nature différentes, sensibilisation des cellules aux rayonnements par l'utilisation de drogues...)<sup>9</sup>. Afin de réduire les effets secondaires aux tissus sains<sup>10</sup>, il est possible de proposer soit une diminution du volume irradié de tissus sains avec une meilleure définition des volumes ou l'utilisation de rayonnements aux propriétés physiques différentes, soit l'utilisation de drogues dites « radio-protectrices », ou bien l'établissement de contraintes dans les dépôts de dose et un suivi clinique régulier. Les récents développements en biologie et plus particulièrement la plus grande accessibilité des données issues des analyses génomiques offrent l'opportunité de redéfinir les approches thérapeutiques en fonction des caractéristiques intrinsèques de chaque patient<sup>11</sup>. Enfin, de nouveaux et récents développements technologiques proposés sur les appareils de traitement<sup>12</sup>, en terme d'imagerie, de délivrance du traitement et de planification, rendent toutes les voies précédentes possibles.

Depuis quelques années, un nouveau domaine de recherche tente de trouver sa place parmi l'ensemble des voies évoquées ci-dessus : la nanomédecine. La nanomédecine intègre les dernières avancées en Nanosciences et Nanotechnologies et exploite à des fins médicales les propriétés et caractéristiques physiques et chimiques particulières des nanomatériaux<sup>13</sup>. Les Nanosciences et Nanotechnologies se définissant, quant à elles, comme les domaines technologiques qui permettent « la conception, la caractérisation, la production et l'application intentionnelle de matériaux, structures, dispositifs et systèmes en contrôlant leur taille et forme dans la gamme du nanomètre ».

Si les derniers développements issus de la nanomédecine trouvent déjà des applications dans les domaines de l'imagerie et de l'oncologie médicale, ces applications n'ont pas encore définitivement trouvé leurs places dans le domaine de la radiothérapie. Cependant, les nombreux travaux de recherche engagés dans ce domaine précis proposent des concepts théoriques originaux et présentent des résultats préliminaires encourageants et prometteurs, laissant ainsi entrevoir dans un futur proche une possible « révolution » médicale. Les apports de la nanomédecine en radiothérapie pourraient ainsi s'appliquer à plusieurs niveaux en offrant

des opportunités d'amélioration au niveau : **(i)** du « contrôle tumoral », **(ii)** de l'optimisation de l'imagerie moléculaire, **(iii)** d'une meilleure définition des volumes cibles ou **(iv)** de la délivrance de thérapies combinées. L'ensemble de ces progrès devraient ainsi contribuer significativement à l'amélioration du « ratio thérapeutique »<sup>14</sup>.

Parmi les voies de combinaison possibles entre radiothérapie et nanomédecine, l'une mènerait à l'utilisation de nanoparticules (NPs) de numéro atomique (Z) élevé, avec pour objectif d'augmenter le dépôt local de la dose et donc le contrôle tumoral. Cette augmentation localisée du dépôt de dose serait la conséquence de phénomènes d'interactions physiques se produisant entre les rayonnements ionisants (RI) et ces NPs<sup>15</sup>. Bien que de nombreuses questions restent encore posées concernant les modes exacts d'interaction entre les RI et ces NPs, le type de NPs (taille, nature chimique), leur mode de délivrance (intra-tumorale, systémique), leur bio-distribution ou encore leur éventuelle toxicité, des essais cliniques en combinaison avec de la radiothérapie sont d'ores et déjà en cours<sup>16</sup>.

L'objectif de ce travail de thèse est ainsi de réaliser une revue de la littérature sur les utilisations actuelles et futures de la nanomédecine en combinaison avec la radiothérapie, en se concentrant principalement sur la combinaison radiothérapie et NPs de Z élevé. Comme évoqué précédemment, les développements de la nanomédecine pourraient s'intégrer à bien des niveaux dans le processus de radiothérapie. Conscient de cette multiplicité d'interactions possibles, j'ai décidé de diviser ce travail en trois parties, comme suit :

1) **une première partie** permettra d'exposer les différentes phases de la radiobiologie : **(i)** physique, **(ii)** chimique et **(iii)** biologique. L'objectif sera de permettre une meilleure compréhension du fonctionnement et de la place des NPs de Z élevé. Un bref résumé des voies de développement actuelles en radiothérapie sera également effectué.

2) **une seconde partie** sera axée sur les développements actuels de la nanomédecine en onco-radiothérapie : l'objectif sera ici de définir les concepts et mécanismes clés de la nanomédecine, ainsi que ses utilisations actuelles et futures en oncologie et en radiothérapie. Cette partie se focalisera également sur l'utilisation de NPs à Z élevé en radiothérapie : seront analysés les concepts mécanistiques de leur association, tant physiques que biologiques, ainsi que les questions en suspens, en se positionnant du point de vue du clinicien afin de tenter de définir un champ potentiel d'utilisation de cette nouvelle association thérapeutique.

3) **une troisième et dernière partie**, expérimentale, reprendra les travaux effectués durant mon master 2 de recherche, axé sur la « pré-évaluation *in-cellulo* du potentiel radiosensibilisant de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sur des lignées cellulaires de sarcome », afin de compléter le point de vue du clinicien de la précédente partie par un point de vue plus biologique et fondamental.



« Tous les dragons de notre vie sont peut-être des princesses qui attendent de nous voir beaux et courageux. »

*Lettres à un jeune poète*, Rainer Maria Rilke

# Partie I

## Développements actuels en radiothérapie

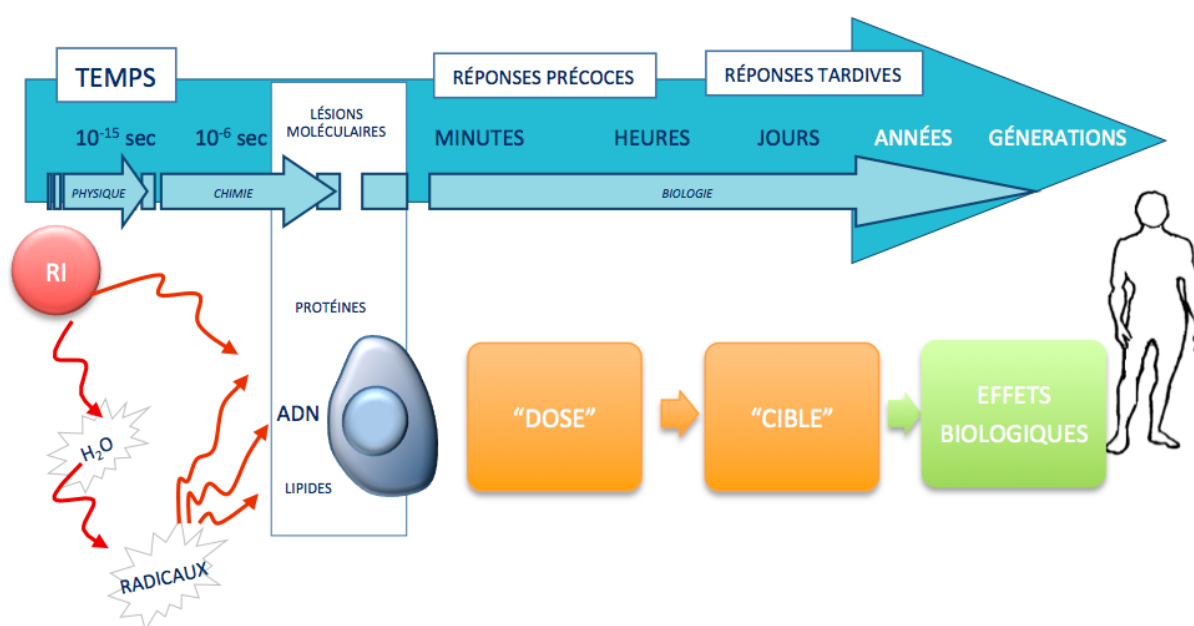
<b>Partie I</b> .....	<b>25</b>
<b>Développements actuels en radiothérapie</b> .....	<b>25</b>
<b>1. Rappels de radiobiologie</b> .....	<b>27</b>
1.1 Phase physique .....	27
1.1.1 L'effet photo-électrique.....	30
1.1.2 L'effet Compton.....	32
1.1.3 Production de paires .....	34
1.1.4 interactions électroniques .....	34
1.1.5 Résumé des interactions physiques .....	35
1.2 Phase chimique .....	36
1.3 Phase biologique .....	37
<b>2. Voies de développement en radiothérapie</b> .....	<b>38</b>
2.1 Développements technologiques des appareils de traitement.....	39
2.2 Modification des schémas thérapeutiques : approche radiobiologique.....	40
2.4 Modification des type de rayonnements :.....	42
2.5 Les associations thérapeutiques.....	42
2.5.1 Principe de la radiosensibilisation .....	43
2.5.2 Associations thérapeutiques en clinique.....	43
2.6 Imagerie fonctionnelle et métabolique .....	45
2.7 Biomarqueurs et médecine personnalisée.....	46



# 1. Rappels de radiobiologie

La radiobiologie se définit comme l'étude de l'action des rayonnements ionisants sur les organismes vivants. Elle permet donc de comprendre l'interaction entre les rayonnements délivrés pendant un traitement de radiothérapie et les tissus irradiés, tumoraux ou sains. L'objectif de cette partie est de présenter les grands principes de ces processus.

Les processus d'interaction d'un rayonnement ionisant avec un organisme vivant se décomposent dans le temps selon 3 phases : (i) une phase physique, (ii) une phase chimique et enfin, (iii) une phase biologique<sup>17</sup> (figure 1).



**Figure 1 :** Les trois phases de l'interaction entre un rayonnement ionisant et la matière vivante. La phase physique prend place durant les premières 10<sup>-15</sup> sec et correspond aux interactions entre le rayonnement ionisant (RI) et les atomes du milieu. La phase chimique dure de l'ordre de 10<sup>-6</sup> sec et correspond aux réactions secondaires à la création d'espèces radicalaires dans le milieu. Enfin, quelques secondes après l'irradiation, la phase dite « biologique » s'enclenche et correspond à l'induction de l'ensemble des processus biologiques en réponses aux altérations radio-induites des macromolécules biologiques. Les conséquences radio-induites peuvent s'exprimer au niveau biologique sur plusieurs années et parfois au cours des générations suivantes.

## 1.1 Phase physique

Un rayonnement se définit par un phénomène d'émission et de propagation d'énergie dans l'espace, associé à une quantité de mouvement. L'interaction de ce rayonnement avec la matière résulte en un dépôt d'énergie au sein de la matière traversée. Ce dépôt d'énergie peut alors mener à une excitation électronique (un électron d'un atome est porté par ce dépôt d'énergie, à

un niveau d'énergie plus élevé sans être éjecté de son atome), voir à une ionisation (le dépôt d'énergie résulte en l'éjection d'un ou plusieurs électrons de l'atome) : le rayonnement est alors dit « *ionisant* ». Une ionisation se caractérise ainsi par un dépôt très localisé d'une quantité d'énergie suffisante pour induire des dégâts localement (notamment, des ruptures de liaisons chimiques).

Selon le type de rayonnement utilisé, cette ionisation peut être « *directe* » ou « *indirecte* ». Deux grandes familles de rayonnements ionisants sont principalement considérées : les rayonnements électromagnétiques (les rayons X et  $\gamma$  notamment, composés de « paquets » d'énergie appelés photons, ne possédant ni masse, ni charge), et les rayonnements dits « *particulaires* », qui se définissent par une masse, une vitesse et souvent une charge (protons, neutrons, électrons, ions carbone...). Les particules chargées sont des rayonnements « *directement ionisants* » : elles ont suffisamment d'énergie pour produire des ions (atomes porteurs d'une charge électrique) lors de leur interaction avec la matière. Les rayonnements électromagnétiques comme les rayons X et  $\gamma$  sont dits « *indirectement ionisants* » : si leur énergie est suffisante, ils peuvent produire, selon différents types d'interaction amenant à leur absorption, une ionisation de la matière traversée. Cette absorption résulte en une libération d'espèces secondaires, notamment des électrons, particules chargées et donc directement ionisantes.

La dose absorbée est une mesure de la « quantité » de rayonnements ionisants interagissant dans un tissu : elle se définit par l'énergie absorbée par le tissu traversé par le rayonnement ionisant par unité de masse de ce tissu, exprimée en Joules par kilogramme de masse ( $\text{Joule.Kg}^{-1}$ ). Cette unité est appelée le Gray ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule.Kg}^{-1}$ ). Le principe même de la radiothérapie est donc de déposer *via* des rayonnements ionisants, une quantité suffisante d'énergie au sein d'un volume tumoral afin d'induire des dommages et une mortalité cellulaire. Les rayonnements ionisants utilisés en pratique clinique sont principalement les photons (rayons X plus que  $\gamma$ ) et les électrons. Les protons tendent à se développer, tandis que d'autres particules comme les ions carbone restent encore l'exception.

Les rayons X et  $\gamma$  peuvent se définir à la fois comme une onde électromagnétique (dont ils partagent les propriétés d'interférence et de diffraction) et comme une particule (de par leurs interactions avec la matière). Du fait de leurs propriétés ondulatoires, ils se caractérisent par une longueur d'onde ( $\lambda$ ), une fréquence ( $\nu$ ) et une vitesse ( $c$ , celle de la lumière) reliées par l'équation  $\lambda\nu = c$ . Ils possèdent également des propriétés particulières, et peuvent ainsi être vues comme un flux de photons, véritables « paquets d'énergie » dont l'énergie  $E$  peut se quantifier par l'équation  $E = h\nu$ , où  $h$  est la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence.

Le photon en tant que tel ne possède pas de masse (bien qu'il subisse la gravité), pas de taille physique, ni de charge, et est indivisible. Ainsi, l'énergie déposée dans un tissu ne doit pas être considérée uniquement comme une dose globale déposée par le faisceau, mais bien comme une dose totale, somme des doses déposées par l'ensemble des photons composants le faisceau. La différence entre un rayonnement X ou  $\gamma$  ne tient quant à elle que par l'origine du rayonnement : le rayon  $\gamma$  a une origine « intra-nucléaire », émis par des isotopes radioactifs instables ; le rayon X est produit « en dehors » du noyau, généralement par un dispositif accélérant des électrons à une haute énergie et les arrêtant brutalement en les faisant rencontrer une cible (or, tungstène) amenant à la production de rayons X (principe de fonctionnement d'un accélérateur linéaire utilisé en clinique, appelé « LINAC »).

Parmi les rayonnements particuliers, les électrons ont une place à part en radiothérapie. Ils peuvent d'un côté être utilisés comme rayonnement thérapeutique (rayonnement primaire), au même titre que les photons, mais sont également présents dans les étapes successives du dépôt de dose par les rayons X et  $\gamma$  (ils sont alors appelés électrons secondaires). Les électrons sont des petites particules chargées négativement. Ils peuvent être accélérés à des vitesses proches de celle de la lumière et être ainsi utilisés comme faisceau thérapeutique. Leur énergie s'exprime alors en électron-Volts : 1 keV correspond ainsi à l'énergie d'un électron accéléré par un champ électrique de 1000 Volts. De par leur nature corpusculaire, les électrons possèdent donc une énergie cinétique qui, alliée à leur charge, est à la base de leurs interactions avec la matière<sup>17,18</sup>.

Nous allons décrire ici les interactions d'un faisceau de rayon X (rayonnement primaire) avec la matière aboutissant au dépôt de dose, puis les interactions des électrons secondaires. Les rayons X ne déposent pas directement leur énergie au sein de la matière : ils doivent pour cela passer par plusieurs mécanismes d'interactions physiques, dont la résultante est la mise en mouvement d'électrons. Ce sont ces électrons (appelés « photoélectron » de par l'origine de leur mise en mouvement), qui sont responsables du dépôt de dose final dans la matière du fait de leur charge.

Les mécanismes d'interaction physique des rayons X avec la matière dépendent de l'énergie du rayon X et du type d'atome rencontré dans le milieu : la probabilité qu'un type d'interaction se produise, est appelé la *section efficace d'interaction* ou « *cross section* ». En radiothérapie, les mécanismes principaux impliqués dans le dépôt de dose sont l'effet photo-électrique, l'interaction Compton et la production de « paires ».

### 1.1.1 L'effet photo-électrique

L'effet photo-électrique correspond à l'absorption complète du photon incident par un électron d'un atome, menant à l'éjection de cet électron (désormais photoélectron) de son orbitale atomique. La vacance électronique ainsi créée est comblée par un électron d'une couche plus externe de l'atome, qui « tombe » à cette place libre et plus stable car plus proche du noyau. Ce changement d'orbital atomique entraîne une libération d'énergie lors d'un processus de désexcitation atomique (l'orbitale la plus interne étant plus stable, elle nécessite moins d'énergie de liaison) qui peut se faire de deux façons : soit sous la forme d'un photon X de fluorescence, soit sous la forme de l'éjection d'un électron d'une orbitale plus externe appelé alors électron Auger. Selon la configuration électronique de l'atome, cette émission Auger peut se répéter, amenant à l'éjection de plusieurs électrons : ce phénomène est appelé « cascade Auger » (figure 2)

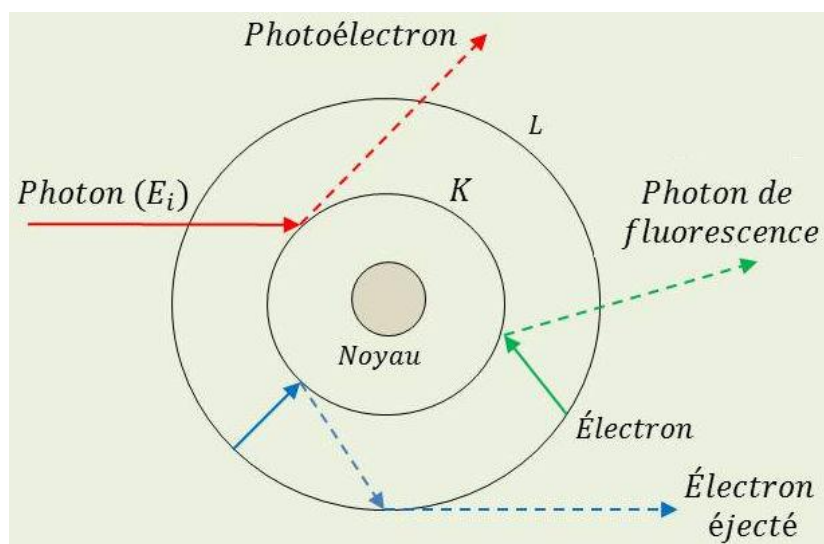


Figure 2 : Principe de l'effet photo-électrique. Le photon incident ( $E_i$ ) interagit avec un électron d'une couche interne d'un atome (ici la couche K) : le photon incident est complètement absorbé dans l'interaction et éjecte l'électron de son orbital atomique (photoélectron) avec une énergie définie. Cette vacance électronique est comblée par un électron d'une couche plus externe (flèche pleine bleue ou verte). La différence d'énergie de liaison entre les deux orbitales est alors émise soit sous la forme d'un photon de fluorescence (flèche en tirets verts), soit est transmise à un électron d'une couche plus externe qui est à son tour éjecté (électron Auger, flèche en tirets bleus). Figure issue de <sup>19</sup>.

L'absorption complète de l'énergie du photon incident par un électron de l'atome rencontré et son émission secondaire est intimement liée à la relation entre l'énergie du photon et l'énergie de liaison de l'électron : la probabilité d'un tel effet est maximale si l'énergie du photon est juste suffisante pour éjecter l'électron de son orbitale. A hautes énergies, le photon interagit donc préférentiellement avec des électrons des couches internes, présentant une énergie de liaison plus importante. La section efficace d'un tel effet est proportionnelle à  $Z^3/E^3$ , ou Z est

le numéro atomique de l'atome rencontré (définissant le nombre d'électrons en cas d'atome électriquement neutre) et  $E$ , l'énergie du photon incident. Cet effet prédomine en utilisation clinique pour des  $E$  de 10-500 keV.

La résultante de l'effet photo-électrique est donc :

- un photon incident complètement absorbé
- un photoélectron éjecté de son orbite, dont l'énergie est  $E_e = E_i - E_l$ , où  $E_e$  est l'énergie du photo-électron éjecté,  $E_i$  l'énergie du photon incident et  $E_l$  l'énergie de liaison de l'électron à son orbitale atomique
- et soit un photon de fluorescence X dont l'énergie correspond à la différence d'énergie de liaison entre l'orbitale atomique externe d'où est issu l'électron venant combler la vacance électronique et l'orbitale atomique à combler, soit un (ou plusieurs) électron(s) Auger dont l'énergie dépend des couches électroniques impliquées : si le photoélectron éjecté provient de la couche K (d'énergie de liaison  $E_K$ ), qu'un électron de la couche L (d'énergie de liaison  $E_L$ ) a comblé la vacance laissée par ce photoélectron et que l'électron Auger provient de la couche M (d'énergie de liaison  $E_M$ ), alors l'énergie de l'électron Auger ( $E_A$ ) est :  $E_A = E_L + E_M - E_K$ .

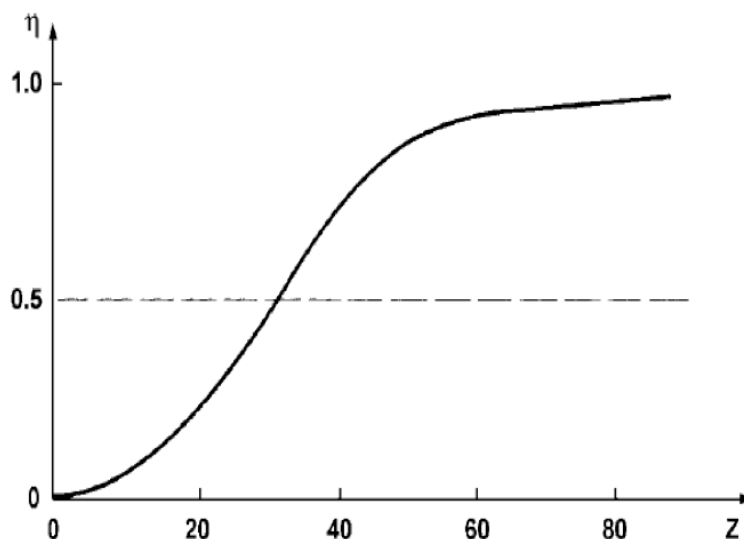


Figure 3 : Ratio  $\eta$  d'émission d'un photon X de fluorescence sur l'émission d'un électron Auger par effet photo-électrique selon le numéro atomique  $Z$  de l'atome rencontré. Figure issue de <sup>20</sup>.

Le rapport  $\eta$  de probabilité d'émission d'un photon de fluorescence X *versus* l'émission d'un électron Auger lors d'un effet photo-électrique varie selon le numéro atomique  $Z$  de l'atome



rencontré, ce rapport étant plus en faveur du photon de fluorescence lorsque  $Z$  augmente, comme cela est montré sur la figure 3.

### 1.1.2 L'effet Compton

L'effet Compton peut se produire lors de l'interaction d'un photon incident avec un électron soit libre, soit faiblement lié à un atome (donc principalement au niveau des couches externes). L'interaction conduit à la transmission d'une partie de l'énergie du photon incident à l'électron rencontré, qui est alors éjecté de son orbitale atomique, et en la diffusion du photon incident avec une énergie réduite. A la différence de l'effet photo-électrique, le photon n'est donc pas complètement absorbé par l'atome. La section efficace de l'effet Compton est proportionnelle à  $Z/E$ . En clinique, il domine pour les énergies de 0,5 – 1 MeV.

La résultante finale de l'effet Compton est donc :

- un photon diffusé, dont l'énergie est celle du photon incident réduite de l'énergie transmise à l'électron
- un photoélectron arraché à son orbitale atomique dont l'énergie varie selon l'énergie transmise par le photon incident

La quantité d'énergie transmise par le photon incident va dépendre, entre autres, de l'angle de diffusion du photon après l'interaction et de l'angle d'éjection de l'électron. Le principe de cette interaction est résumé sur la figure 4.

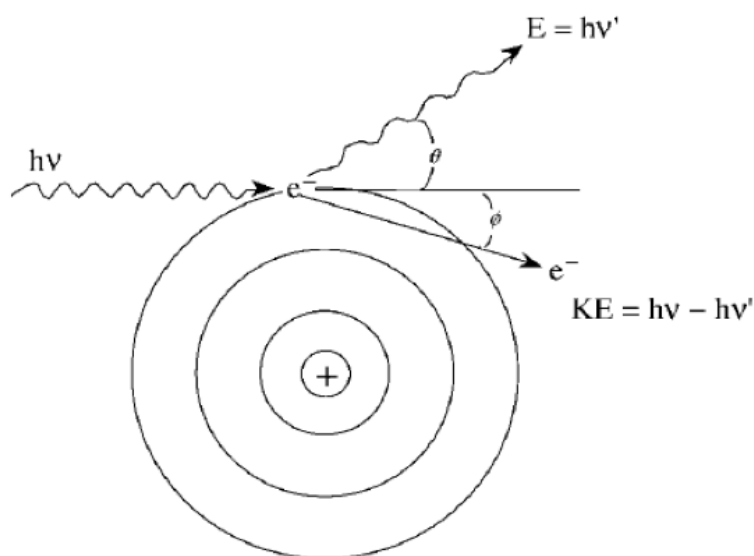
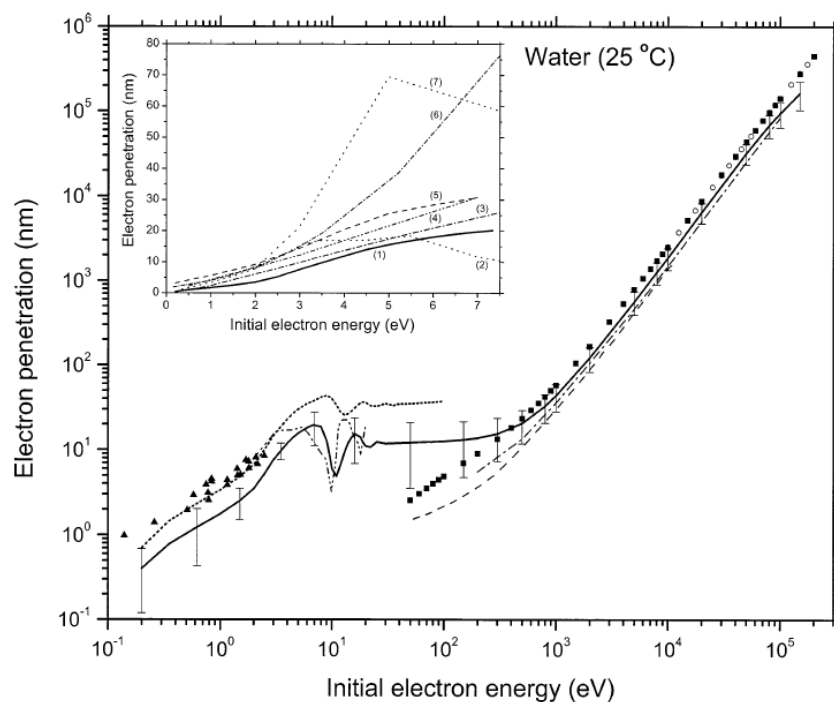


Figure 4 : L'effet Compton. Le photon incident d'énergie  $E = h\nu$  interagit avec un électron  $e^-$  d'une orbitale externe, aboutissant à l'éjection de ce photoélectron selon un angle  $\phi$ , et à la diffusion du photon incident selon un angle  $\theta$ . L'énergie du photon diffusé devient  $h\nu'$ , et l'énergie cinétique transmise au photoélectron est :  $KE = h\nu - h\nu'$ . Figure issue de <sup>20</sup>.

Il est important de remarquer la différence entre les photoélectrons issus des interactions Compton et photoélectriques, et les électrons Auger. L'énergie des photoélectrons dépend directement de l'énergie du photon incident, celui-ci leur transmettant tout ou une partie de son énergie sous forme d'énergie cinétique. Ils peuvent ainsi avoir une énergie importante et un long trajet dans la matière. L'énergie des électrons Auger est dépendante, quant à elle de l'énergie des couches électroniques impliquées dans leur libération. Elle est donc indépendante de l'énergie du photon incident. Elle est souvent bien plus faible que celle des photoélectrons (quelques dizaines d'eV, définissant des électrons de faible énergie). Le parcours dans la matière de ces électrons Auger est donc bien plus court et leur dépôt de dose se réalise dans la proximité immédiate de leur atome d'origine. Ainsi, un dépôt de dose dominé par des électrons Auger présente une dépendance à l'énergie du photon incident très différente à celle d'un dépôt de dose dominé par des photoélectrons. L'énergie du photon incident influencera dans les deux cas la probabilité de survenue de l'interaction, mais n'aura pas d'influence sur l'énergie finale de chaque électron Auger pris indépendamment, alors qu'elle a une influence directe sur l'énergie des photoélectrons. L'énergie des électrons secondaires étant directement reliée à leur distance de parcours dans le milieu, comme montré sur la figure 5, la distance parcourue – et donc la structure du dépôt de dose dans la matière – de ces différents types d'électrons est fondamentalement différente.



**Figure 5 :** Parcours des électrons dans l'eau. En abscisse, l'énergie de l'électron en eV (« *initial electron energy* »), en ordonnée, la pénétration de l'électron (« *electron penetration* ») dans de l'eau à 25°C, en nm. Notons que pour quelques dizaines d'eV, les électrons parcourent quelques nanomètres, alors qu'à partir de  $10^3$  eV, la distance parcourue croît rapidement, influençant directement la trace du dépôt de dose. Figure issue de

### 1.1.3 Production de paires

Si le photon incident possède une énergie supérieure à 1.022 MeV, son interaction avec le champ électromagnétique de l'atome peut amener à la conversion de l'énergie du photon en une paire de corps électroniques : un négatif (électron) et un positif (positron), chacun d'énergie équivalente (0.511 MeV). En cas d'énergie du photon incident supérieure à 1.022 MeV, le surplus est communiqué aux deux particules créées sous forme d'énergie cinétique. Le positron réagit par la suite avec un électron du milieu, amenant à la création d'une particule intermédiaire (le positronium), qui finit par disparaître en formant deux photons d'annihilation de 0.511 MeV chacun. La section efficace de cette réaction augmente avec l'énergie du photon incident et le numéro atomique de l'atome. On remarque qu'elle n'implique pas d'ionisation de l'atome rencontré, mais amène à la production de deux photons et d'un électron qui pourront à leur tour réagir et amener à des ionisations selon d'autres mécanismes. La figure 6 résume cette réaction.

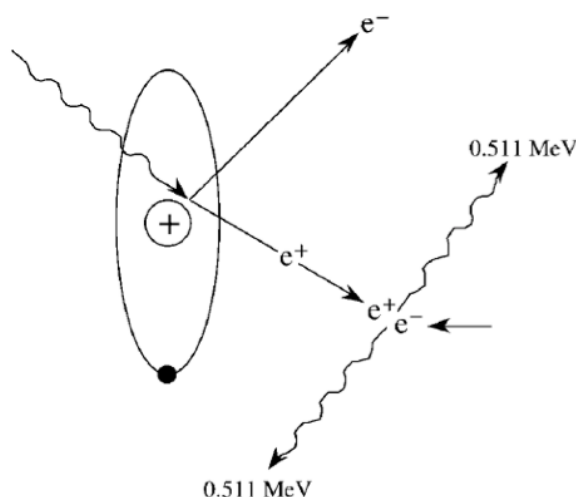


Figure 6 : Production de « paire ». L'interaction d'un photon avec le champ magnétique d'un atome du milieu mène à la création d'une paire électron-positron. Le positron réagit avec un électron du milieu, créant deux photons d'annihilation de 0.511 MeV chacun. Figure issue de <sup>20</sup>.

### 1.1.4 interactions électroniques

Il est ici important de souligner que le dépôt de dose des rayons X n'est pas lié aux photons eux-mêmes, mais aux électrons secondaires que ces différentes réactions produisent. Ces électrons possèdent une énergie cinétique, qu'ils perdent au fur et à mesure en interagissant dans le milieu *via* des interactions coulombiennes avec les électrons et les noyaux du milieu traversé. Les interactions aboutissant à un dépôt de dose (et donc à une perte énergétique de l'électron incident) sont :

- la collision inélastique avec des électrons du cortège atomique :

En rencontrant des électrons liés à un atome, l'électron incident peut conduire à des excitations et à des ionisations de cet atome. Il perd alors de l'énergie en la transmettant à ces électrons qui, en cas d'ionisation, iront également réagir avec d'autres atome du milieu. Cette interaction dépend de la densité électronique de la matière traversée et est plus importante pour les hauts Z. Pour des électrons d'énergie supérieure à 1 MeV, la perte d'énergie dans l'eau ou les tissus mous *via* ce mode d'interaction est de l'ordre de  $2 \text{ MeV.cm}^{-1}$ .

- la collision inélastique avec le noyau d'un atome :

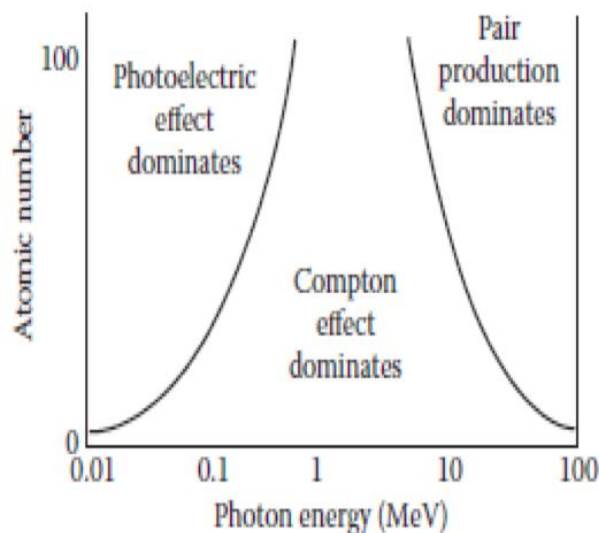
Si l'électron passe à proximité d'un noyau, l'interaction des deux champs magnétiques (de l'électron et du noyau) aboutit à une perte d'énergie de l'électron par émission de photons X dits de « *Bremsstrahlung* ». La probabilité de cet effet augmente avec l'énergie cinétique de l'électron et avec le Z de l'atome rencontré selon un rapport  $Z^2/E$ . C'est notamment ce type d'interaction qui est recherché pour créer des faisceaux de rayons X dans les accélérateurs LINACs, en provoquant une collision entre des électrons de haute énergie cinétique (accélérés) sur une cible de Z élevé (Tungstène notamment).

### **1.1.5 Résumé des interactions physiques**

Comme vu précédemment, la section efficace de ces différentes interactions dépend directement de l'énergie du photon incident et du numéro atomique des atomes rencontrés dans le milieu. Pour un traitement de radiothérapie, où l'énergie des faisceaux de traitement varie généralement de 6 à 18 MeV et pour un Z moyen du corps humain estimé à 7.4, l'effet Compton prédomine. La figure 7 illustre la dominance des différents effets selon l'énergie du photon incident et le Z des atomes rencontrés.

Pour résumer, nous pouvons dire que les différentes interactions d'un faisceau de rayon X avec la matière<sup>19-29</sup> :

- dépendent de l'énergie du photon incident ainsi que du Z des atomes rencontrés
- aboutissent au transfert de l'énergie du photon à des électrons : photoélectrons et électrons Auger (environ  $5 \times 10^4$  électrons secondaires créés par MeV)
- que l'énergie transférée à ces électrons peut être directement dépendante de l'énergie du photon incident (photoélectrons) ou indépendante (électrons Auger)
- que les électrons, de par leur charge, sont directement ionisant et ainsi responsables du dépôt de dose final du faisceau de rayon X
- que le profil de ce dépôt de dose dépend de l'énergie des électrons, qui conditionne leur parcours dans la matière.



**Figure 7 :** Influence du numéro atomique et de l'énergie des photons sur le type d'interaction. Figure issue de 22.

## 1.2 Phase chimique

La cible biologique principale considérée en radiothérapie est l'ADN cellulaire : l'objectif du traitement est de l'endommager suffisamment pour conduire à une mort cellulaire. D'autres cibles existent néanmoins, comme les protéines ou les lipides. L'action d'un rayonnement sur l'ADN peut également être qualifié de **direct** ou **indirect**, et ce indépendamment de son mode d'ionisation.

Au cours de son parcours dans la matière, le rayonnement incident peut interagir avec différentes espèces moléculaires. La principale est l'eau, qui constitue la majeure partie de la cellule : l'ionisation d'une molécule d'eau entraîne la formation d'espèces radicalaires, hautement réactives. La réaction de ces espèces radicalaires avec des molécules d'intérêt, principalement l'ADN, conduit à des dommages moléculaires (notamment des ruptures de liaisons chimiques) : on appelle ce type d'interaction des dégâts **indirects**. Au contraire, si le rayonnement incident réagit directement avec une molécule d'intérêt comme l'ADN, l'ionisation induite et les ruptures de liaison chimiques consécutives sont appelés dégâts **directs**. Il est estimé pour un faisceau de rayons X d'énergie thérapeutique que les dommages indirects comptent pour près de 2/3 <sup>17</sup>.

La création de ces espèces radicalaires et leurs effets prennent place durant la phase chimique du temps radiobiologique, à la suite de la phase physique. Après réaction du rayonnement ionisant avec le milieu, l'ionisation des molécules d'eau (appelée radiolyse de l'eau,  $10^{-16}$  –  $10^{-12}$  secondes après l'irradiation) produit des radicaux libres. Ces espèces chimiques possèdent un électron célibataire (non apparié) et sont particulièrement instables et très réactives (durées de vie de  $10^{-9}$  à  $10^{-3}$  secondes). Les radicaux libres initiaux sont **•OH**, **•H** et **e<sup>-</sup>aq**. Présents en

grandes quantités au sein de « grappes d'ionisations », ils réagissent entre eux par réactions d'oxydo-réduction pour créer des espèces moléculaires plus stables comme  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{H}_2$ , ou bien s'échappent de ces grappes pour réagir dans le milieu avec d'autres molécules. En condition aérobie, la réaction de ces radicaux libres avec du dioxygène mène à la création du radical superoxyde  $\text{O}_2^\bullet$  et du radical superoxyde protoné  $\text{HO}_2^\bullet$ . On obtient donc au final la création des principales espèces réactives de l'oxygène (« *reactive oxygen species* » ou ROS) :  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui sont des espèces réduites de l'oxygène issues des interactions entre les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau et le dioxygène présent dans le milieu.

Parmi ces différentes molécules, le radical  $\bullet\text{OH}$  est un puissant oxydant, dont la durée de vie ne dépasse pas 10-100 nsecondes pour une diffusion maximale de l'ordre de 4 nm. Il réagit fortement avec les molécules présentes dans son voisinage, qu'il s'agisse de protéines (74% de ses interactions), de lipides (21%) ou de l'ADN (4%). Les réactions impliquées sont soit une réaction d'oxydation, soit l'arrachement d'un atome hydrogène d'une molécule (formant une espèce moléculaire radicalaire), soit une réaction d'addition du radical  $\bullet\text{OH}$  sur une double liaison (avec la formation d'une espèce moléculaire radicalaire). Au niveau de l'ADN, environ 90% des réactions sont de type addition sur une double liaison d'une base et 10% d'arrachement d'un atome hydrogène d'un sucre. Ces réactions induisent donc la création d'espèces radicalaires de l'ADN, hautement réactives, évoluant notamment *via* des réactions d'oxydation avec le dioxygène du milieu vers des lésions plus stables comme des bases oxydées ou des cassures simples ou doubles brins.

### **1.3 Phase biologique**

La phase biologique prend place dans les suites de la phase chimique. Les dommages ADN produits par les réactions précédentes sont de diverses natures. On estime que pour un Gray d'énergie absorbé, plus de 1000 dommages de base sont produits, ainsi que 1000 lésions simples brins et 40 lésions doubles brins<sup>17</sup>.

La machinerie de réparation de l'ADN tente alors de détecter, reconnaître et de prendre en charge ces lésions jusqu'à leur réparation. De la qualité de cette réparation dépendra la survie cellulaire. Les cassures doubles brins sont considérées comme étant les plus létales, mais l'association de plusieurs dommages sur une courte distance d'environ 20 paires de base, appelée « *clusters de lésions* », peuvent être bien plus difficilement réparables<sup>17</sup>.

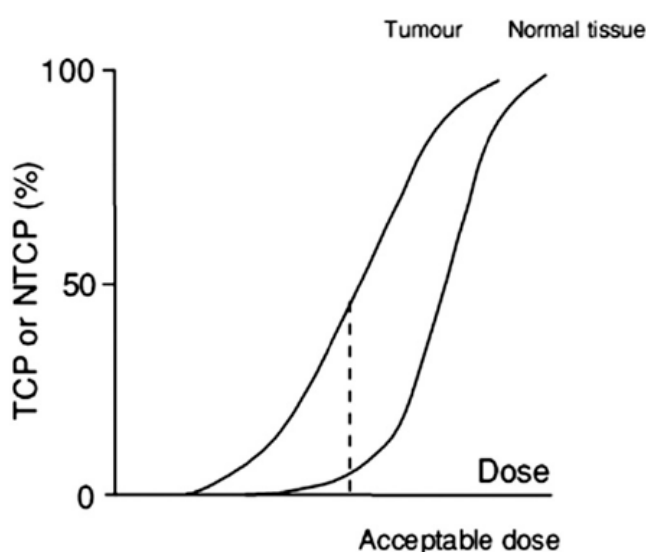
Les effets cellulaires et tissulaires survenant dans les suites dépendront de la survie ou non des cellules, du type de dommages et du type de tissus. Une mortalité importante et rapide entrainera des effets tissulaires précoces : c'est notamment l'objectif pour le traitement d'une tumeur, mais également le cas pour les effets secondaires aigus. Une mortalité cellulaire retardée peut être à l'origine d'effets secondaires tardifs et chroniques. Une accumulation de

lésions peut entraîner l'apparition de cancers radio-induits des années après le traitement, et la transmission de ces lésions en cas d'irradiation gonadique peut avoir des conséquences sur les générations futures.

Ainsi, dans l'objectif d'obtenir une mortalité tumorale plus importante que la mortalité cellulaire des tissus sains adjacents, la radiothérapie se base sur le postulat de systèmes de réparation de l'ADN moins performants dans les tissus tumoraux.

## **2. Voies de développement en radiothérapie**

Les objectifs des développements actuels en radiothérapie tendent à améliorer le ratio thérapeutique et visent à améliorer le contrôle tumoral et/ou à diminuer les risques de toxicité. Le ratio thérapeutique en radiothérapie définit l'équilibre à trouver entre le contrôle tumoral et les toxicités potentielles engendrées par le traitement, qu'elles soient aiguës, ou (surtout) tardives. Cette balance bénéfices/risques est schématisée par les courbes de probabilité de contrôle tumoral (ou TCP, pour « *Tumor Control Probability* ») et de probabilité de complication du tissu sain (ou NTCP, pour « *Normal Tissue Complication Probability* ») en fonction de la dose délivrée<sup>5</sup> (figure 8).



**Figure 8 :** Courbes TCP et NTCP en fonction de la dose. En ordonnées les probabilités de contrôle tumoral et de complication du tissu sain, en abscisse la dose délivrée. Dans cet exemple, la dose définie comme « *acceptable* » permettrait d'obtenir une probabilité de contrôle tumoral de 50% pour une probabilité de complication des tissus normaux de 5%. Figure issue de <sup>5</sup>.

Améliorer le ratio thérapeutique revient donc à augmenter l'espace/la distance séparant les deux courbes. Pour cela, il faut soit : (i) augmenter la probabilité de contrôle tumoral sans trop augmenter le risque de toxicités, ce qui revient à déplacer la courbe de TCP vers la gauche sans bouger la courbe de NTCP ; (ii) diminuer la probabilité de complications aux tissus sains sans

diminuer le contrôle tumoral, ce qui revient à déplacer la courbe de NTCP vers la droite sans bouger la courbe de TCP ; **(iii)** dans un cas idéal, une combinaison des deux possibilités précédentes.

Les voies de recherches engagées sont multiples et concernent principalement des approches où les développements visent à : **(i) utiliser de nouvelles modalités technologiques de délivrance de la radiothérapie** (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI), radiothérapie guidée par l'image (IGRT), stéréotaxie, radiothérapie FLASH...) ; **(ii) augmenter le contrôle tumoral en augmentant la dose totale délivrée à la tumeur** (escalade de dose, « *boost* », « *dose painting* ») ; **(iii) augmenter la réponse tumorale** en utilisant des modifications du schéma thérapeutique basées sur les connaissances en radiobiologie (modifications du fractionnement et de l'étalement, radiothérapie stéréotaxique fractionnée à fortes doses) ; **(iv) utiliser des rayonnements ionisants différents** des photons et électrons « classiques » ; **(v) associer différentes approches thérapeutiques** afin d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie en modifiant la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants (associations de la radiothérapie aux chimiothérapies, aux thérapies ciblées, et/ou à l'immunothérapie) ; **(vi) utiliser de nouvelles approches « bio-technologiques »** en passe de changer les modalités de prescription de la radiothérapie (imagerie métabolique et médecine personnalisée). Nous allons brièvement les résumer.

## **2.1 Développements technologiques des appareils de traitement**

Depuis les années 1970, d'importants développements technologiques au nombre desquels la démocratisation du scanner et le développement de nouveaux systèmes informatisés de planification de traitement (TPS), ont permis la mise en place de nouvelles techniques de délivrance des traitements de radiothérapie<sup>1</sup>. D'une radiothérapie bidimensionnelle, l'évolution de ces techniques a permis l'apparition de la radiothérapie tridimensionnelle « conformationnelle » (RTC-3D)<sup>6,30</sup>, puis de la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI)<sup>12</sup>, de la stéréotaxie et de la radiothérapie guidée par l'image. L'évolution de ces techniques permet ainsi au fur et à mesure, d'optimiser l'irradiation en réalisant une distribution de dose de plus en plus conforme au volume cible<sup>11,31</sup>. La réduction des volumes de tissus sains irradiés, et la meilleure épargne des *organes à risque* (OAR) en découlant, peuvent ainsi se traduire cliniquement par une diminution des toxicités<sup>32,33</sup>. Une meilleure conformation au volume cible permet également de réaliser une escalade de dose ou un « *boost* » au niveau tumoral tout en gardant un taux de toxicité raisonnable, donnant ainsi de meilleurs résultats oncologiques dans certaines localisations comme les carcinomes bronchiques non à petites cellules ou les adénocarcinomes prostatiques<sup>8,34</sup>.



La radiothérapie guidée par l'image (IGRT), qui permet de s'assurer via diverses modalités d'imagerie ou de suivi des mouvements tumoraux, et avec une précision toujours meilleure, que le volume cible est bien situé dans le champ de traitement, est un corollaire nécessaire à l'amélioration des techniques de délivrance de dose. Elle assure ainsi qu'une plus grande épargne dans les volumes irradiés ne se traduise pas par une dégradation du contrôle tumoral, mais bien par une amélioration du ratio thérapeutique<sup>31,35,36</sup>.

Enfin, la radiothérapie stéréotaxique, profitant à la fois de l'amélioration de la conformation de la délivrance de dose et du développement de l'IGRT, se propose de délivrer de très fortes doses de façon très conformationnelle à de petits volumes tumoraux<sup>37</sup>. Développée initialement pour des lésions intracrâniennes, elle permet actuellement de traiter des cibles mouvantes grâce au développement de certaines techniques d'IGRT, comme le « *tracking* ».

## **2.2 Modification des schémas thérapeutiques : approche radiobiologique**

Les connaissances en radiobiologie ont permis de modifier les schémas thérapeutiques habituels (1.8 à 2.2 Gy par fraction, 5 jours sur 7) en les adaptant aux spécificités tumorales, afin d'en accroître l'efficacité. L'analyse des courbes de survie cellulaire sous irradiation et l'étude des spécificités biologiques tumorales sont les deux principaux axes permettant ces évolutions

Les Courbes de survie cellulaire sous irradiation, obtenus lors de tests de survie clonogénique, permettent la mesure du maintien ou de la perte de la capacité répliquative d'une cellule à des doses croissantes de RI<sup>17</sup>. L'analyse de ces courbes permet de définir des modèles mathématiques, dont le but est de rendre compte et de prédire la réponse d'une lignée cellulaire à l'irradiation. Le modèle actuel permettant la meilleure analyse de ces courbes, utilisé en clinique, est le modèle linéaire quadratique (MLQ)<sup>38</sup>. Il permet d'exprimer la survie cellulaire selon la formule :  $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$ .

Où **S** est la survie cellulaire et **D** la dose par fraction. La composante  **$\alpha D$**  représente la partie initiale de la courbe, linéaire de pente  **$\alpha$** , correspondant aux dommages directement létaux de l'irradiation. La composante  **$\beta D^2$**  représente la seconde partie de la courbe, dite quadratique, correspondant à l'accumulation d'évènements sub-létaux ou à l'épuisement des capacités de réparation cellulaire. Ce modèle permet ainsi de définir pour chaque lignée cellulaire un rapport  $\alpha/\beta$ , définissant la sensibilité d'une lignée à la dose par fraction : un **rapport  $\alpha/\beta$  élevé** correspond une faible sensibilité à la dose par fraction, alors qu'un **rapport  $\alpha/\beta$  bas** indique une forte sensibilité à la dose par fraction<sup>39</sup>. Il permet également de comparer deux schémas de fractionnement différents, en calculant leur *Dose Biologique Efficace* (DBE) respective. La figure 9 représente une courbe de survie cellulaire.

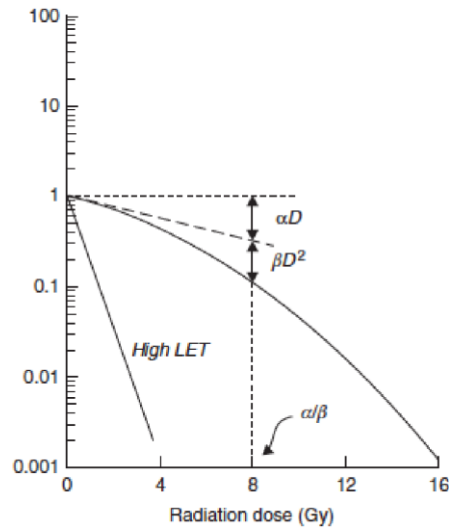


Figure 9 : Illustration d'une courbe de survie cellulaire semi-logarithmique pour une irradiation en photons. En ordonnée, la survie cellulaire en échelle logarithmique ; en abscisse, la dose en Gy en échelle linéaire. La courbe « High LET » correspond à la courbe de survie cellulaire qui serait obtenue pour une irradiation par un rayonnement de fort *Transfert Linéique d'Énergie* (TLE), comme des neutrons (développé dans un chapitre à suivre). Figure extrait de *Basic Clinical Radiobiology*, M. Joiner et A. van der Kogel, 2009<sup>40</sup>.

La connaissance de la réponse biologique tumorale à l'irradiation permet également de modifier l'approche thérapeutique. Elle est symbolisée par **la règle des « 5R » de la radiobiologie** : (i) **la réparation des lésions sub-létales** ; (ii) **la ré-oxygénation** ; (iii) **la repopulation** ; (iv) **la re-synchronisation** ; (v) **la radiosensibilité intrinsèque**. A partir de ces « 5R » ont été élaborés certains schémas de traitement en utilisant l'action de l'un ou l'autre de ces facteurs afin d'améliorer le ratio thérapeutique<sup>17,41</sup>.

Ces connaissances radiobiologiques ont permis de modifier les schémas thérapeutiques habituels, en modifiant les doses par fraction ou encore le temps total de traitement. On définit ainsi l'hyper-fractionnement (diminution de la dose par fraction et augmentation du nombre de fractions), l'hypo-fractionnement (augmentation de la dose par fraction et diminution du nombre de fraction) et l'accélération du traitement (diminution de l'étalement : le temps total du traitement). Ces approches sont, ou ont été, utilisées dans certaines localisation tumorales avec une bonne efficacité, comme dans les tumeurs du sein pour l'hypofractionnement<sup>42</sup>, ou encore les cancers ORL pour la radiothérapie hyper-fractionnée et accélérée<sup>43-45</sup>.

## **2.4 Modification des types de rayonnements :**

D'autres types de rayonnements ionisants, autres que les photons et électrons, sont utilisés en radiothérapie. Les deux principaux représentants en sont les protons et les ions carbonés. La rareté des centres disposant d'installations capables de délivrer ces rayonnements, du fait de leur coût, limite néanmoins les possibilités de traitement. Les avantages que présentent ces particules chargées sont principalement de deux ordres : radiobiologique et dosimétrique.

D'un point de vue radiobiologique, l'avantage de ces particules chargées s'explique par un *Transfert Linéique d'Énergie* (TLE, ou *LET* en anglais) plus important que les photons. Le TLE représente l'énergie transférée par la particule au milieu traversé par unité de longueur, soit la « trace » de la particule dans le milieu, représentant la distribution spatiale des ionisations le long de son parcours. Un TLE plus élevé laissera une trace plus compacte, responsable de dommages complexes : l'Efficacité Relative Biologique (EBR) d'une particule de haut TLE, définissant la capacité d'un rayonnement ionisants à produire un effet biologique donné comme la létalité cellulaire, sera ainsi plus élevée que celle d'un photon<sup>17</sup>.

D'un point de vue dosimétrique, le dépôt de dose particulier de ces particules, symbolisé par le pic de Bragg, permet selon les indications d'améliorer la couverture tumorale, l'homogénéité de répartition de la dose, d'obtenir de forts gradients de dose, de protéger les OAR proches et de diminuer la dose intégrale délivrée au patient<sup>6,31,36,46</sup>. Les indications actuelles de ces traitements concernent principalement certaines tumeurs pédiatriques, oculaires, de la base du crâne ou du rachis<sup>47</sup>.

Une autre voie de développement actuelle consiste non pas à modifier le rayonnement primaire, mais à modifier le débit de ce rayonnement : c'est notamment le cas de la radiothérapie FLASH, actuellement en cours de développement au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (Lausanne, Pr Bourhis). Cette nouvelle modalité d'irradiation, alliant un temps d'irradiation en électrons très court (moins de 500 ms) et un débit de dose très élevé (de 40 à 300 Gy.s<sup>-1</sup>), permettrait une nette diminution des effets secondaires sur les tissus sains sans diminution du contrôle tumoral. La translation clinique de ce nouveau type de radiothérapie très prometteuse, est actuellement en cours<sup>48-52</sup>.

## **2.5 Les associations thérapeutiques**

L'association de la radiothérapie avec des drogues de différentes natures a pour objectif, comme tous les développements précédents, l'amélioration du ratio thérapeutique. Ceci peut être obtenu en combinant les effets cytotoxiques de la radiothérapie et d'une drogue, en utilisant un produit non cytotoxique mais capable par son action biologique de modifier l'action des rayonnements, ou encore en utilisant une molécule protégeant sélectivement les tissus sains. Le

principal objectif tend à obtenir une différence de réponse entre tissus tumoraux (*à traiter*) et tissus normaux (*à protéger*). Parmi les développements actuels de la radiothérapie, ces combinaisons thérapeutiques possèdent l'impact le plus fort pour le traitement des tumeurs solides<sup>10,53</sup>.

### **2.5.1 Principe de la radiosensibilisation**

Le type d'interaction entre les rayonnements ionisants et les drogues utilisées en association ont été analysés dès 1979 par Steele et Peckham et divisés en quatre grandes catégories selon les mécanismes engendrés, tels que<sup>54-57</sup>: **(i) la coopération spatiale**, qui repose sur la complémentarité géographique de l'action des deux agents utilisée en association ; **(ii) l'indépendance de toxicité**, si l'utilisation des deux traitements ne potentialise pas leurs toxicités respectives ; **(iii) la protection des tissus sains**, si la combinaison permet une protection des tissus non tumoraux ; **(iv) l'augmentation de la réponse tumorale ou « coopération dans le champ »**, se traduisant par une augmentation de l'effet cytotoxique (si possible anti-tumoral<sup>58</sup>) dans le champs d'irradiation.

La terminologie utilisée pour exprimer l'effet de l'association de deux traitements est variée, mais répond à des définitions précises. Le terme de « **radiosensibilisation** » peut en effet être utilisé pour rendre compte de réponses tumorales bien différentes, entraînant une certaine confusion. En 1979, Gordon Steel a développé une terminologie se référant aux effets observés d'une combinaison de traitements dans un tissu ou au sein une cellule, terminologie se basant plus sur la mécanique d'action de l'association que sur le résultat thérapeutique global : les termes sensibilisation, coopération, amélioration, effet additif, effet supra-additif font état de ces différents mode d'action, souvent rassemblés sous le terme générique de « **radiosensibilisation** »<sup>57</sup>.

Nous proposons donc ici, pour plus de clarté, une définition de ce terme de « **radiosensibilisation** », qui sera utilisée dans la suite de ce travail. Sera donc désigné par le terme de « **radiosensibilisation** », **toute amélioration de l'effet des rayonnements ionisants sur un processus défini (cytotoxicité, contrôle tumoral, etc.) à l'échelle moléculaire, cellulaire, tissulaire ou tumorale, induite par l'utilisation d'une drogue via des processus biologiques et/ou chimiques modifiant la réponse radio-induite à l'échelle moléculaire, cellulaire, tissulaire ou tumorale.**

### **2.5.2 Associations thérapeutiques en clinique**

Trois grands types d'associations sont actuellement utilisés en pratique clinique d'onco-radiothérapie : la radio-chimiothérapie, la combinaison radiothérapie et thérapie ciblée, et la combinaison radiothérapie et immunothérapie.

La radio-chimiothérapie (RTCT), majoritairement utilisée, combine une chimiothérapie à une irradiation. Elle peut être utilisée de façon séquentielle (chimiothérapie néo-adjuvante ou adjuvante), ou concomitante (les deux modalités dans le même temps). Elle présente 3 raisons cliniques principales : **(i) la préservation d'organe ; (ii) l'éradication des micro-métastases ;** et **(iii) la radiosensibilisation**<sup>58</sup>. En clinique, la RTCT a prouvé son efficacité et sa supériorité dans le traitement de plusieurs types de cancers. On peut ainsi citer par exemple l'application de la RTCT dans le traitement des cancers de la tête et du cou ou du poumon<sup>59</sup>, du rectum, du canal anal, du pancréas, de l'œsophage, des glioblastomes, des sarcomes des extrémités, ou encore de l'utérus<sup>60</sup>.

Une thérapie ciblée est un traitement qui vise sélectivement un processus impliqué dans l'oncogénèse à des fins thérapeutiques. La principale différence avec les agents chimiothérapeutiques usuels vient de cette spécificité du ciblage. Alors que les drogues précédentes présentent pour la plupart une cytotoxicité tant au niveau de la tumeur que des tissus sains, les thérapies ciblées tirent parti de leur sélectivité d'action pour cibler prioritairement les cellules cancéreuses, en agissant contre des mécanismes qui leur sont spécifiques. Elles présentent néanmoins également des toxicités systémiques. De ce postulat peut être espérée une meilleure efficacité en combinaison avec la radiothérapie<sup>3</sup>. Actuellement, seule une thérapie ciblée en combinaison avec la radiothérapie a été validé en essai clinique de phase 3 : il s'agit du *Cetuximab*<sup>®</sup>, un anticorps monoclonal IgG1 ciblant spécifiquement le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et qui est utilisé dans le traitement des cancers de la tête et du cou<sup>61</sup>.

La combinaison entre radiothérapie et immunothérapie repose quant à elle sur l'action pro-immunogénique de la radiothérapie : la mort cellulaire radio-induite, *via* la libération de grande quantité d'antigènes tumoraux et de médiateurs pro-inflammatoires fait office de vaccination anti-tumorale *in-situ*. Un des objectifs est de permettre l'apparition d'une immunité anti-tumorale systémique avec une réponse tumorale immuno-médiée non seulement au niveau du site irradié, mais également des localisations à distance. Ce phénomène est décrit comme « **l'effet abscopal** ». Si les premières observations cliniques d'un tel effet ont été réalisées chez des patients atteints de mélanome<sup>62,63</sup>, plus de 20 cas ont actuellement été recensés en pratique clinique<sup>64</sup>. L'association entre immunothérapie et radiothérapie est donc en pleine évolution et pourrait devenir une des prochaines révolutions de l'onco-radiothérapie. Néanmoins, les questions demeurent encore nombreuses : la dose totale, le fractionnement (utilisation de doses ablatives notamment), ou encore le *moment optimal* d'administration de la radiothérapie et de l'immunothérapie en sont quelques-unes<sup>64</sup>.

Enfin, d'autres modalités thérapeutiques, comme le ciblage de l'hypoxie tumorale<sup>10</sup>, ou l'utilisation de drogues radio-protectrices afin de diminuer sélectivement la toxicité aux tissus sains<sup>54,58</sup>, sont également des voies de recherche.

## **2.6 Imagerie fonctionnelle et métabolique**

L'imagerie médicale est un des piliers de la radiothérapie et de l'oncologie en général. Elle a sa place dans le diagnostic initial, la classification du stade de la maladie, la définition des volumes en radiothérapie, ainsi que dans le suivi pendant et après le traitement. Ses évolutions mènent à des changements de pratiques parfois conséquents et ouvrent de nouvelles perspectives. En radiothérapie, le développement de l'imagerie pourrait permettre d'améliorer le contrôle tumoral en réduisant l'impact de trois des principales causes d'échec : une classification initiale inadéquate, un mauvais ciblage du traitement et une radiorésistance intrinsèque de certaines zones tumorales<sup>65</sup>.

L'imagerie fonctionnelle et métabolique permet la détection, la localisation et la quantification d'évènements moléculaires et physiologiques pour compléter l'imagerie anatomique<sup>66</sup>. Son développement permettrait donc d'améliorer la classification initiale en repérant d'éventuelles zones métaboliquement actives non visibles sur des imageries anatomiques, d'améliorer ou de redéfinir les contours des zones cibles en définissant un « *Volume Cible Biologique* », et de visualiser des zones de radiorésistances qui pourront être ciblées plus spécifiquement en escalade de dose (« *dose painting* »)<sup>11,31,36,65</sup>.

Parmi les évolutions actuelles, nous pouvons mentionner les développements concernant : **(i) la Tomodensitométrie (TDM/Scanner) ; (ii) l'IRM ; (iii) la Tomographie par Émission de Positons (TEP)**<sup>67</sup>. Le TEP notamment, *via* le développement de nouveaux radio-traceurs, permet de développer des applications plus spécifiques de certaines néoplasies (<sup>68</sup>Ga-PSMA notamment pour les cancers de la prostate), ou de certains facteurs de radiorésistance<sup>65,67</sup> comme l'hypoxie ou la prolifération cellulaire.

Ces différentes évolutions tant de la biologie que de l'imagerie, avec l'augmentation des données disponibles et leurs combinaisons, ouvrent les portes à des techniques d'extraction et d'analyse à haut débit de tous ces paramètres. C'est le début de la « *radiomic* » qui se propose d'analyser toutes les données issues des différentes modalités d'imagerie (intensité, forme, volume, texture, *etc.*) et de la « *panomic* » qui inclut les données issues de toutes les techniques de biologie moléculaire. L'analyse combinée de toutes ces données, véritable intrusion de la médecine dans le monde du « *Big Data* » devrait permettre une meilleure analyse individuelle et l'identification d'informations pronostiques afin d'optimiser la prise en charge<sup>67</sup>.

## **2.7 Biomarqueurs et médecine personnalisée**

L'émergence de la « *panomic* » et de la « *radiomic* » font entrer la médecine dans une nouvelle ère : celle de la médecine personnalisée. Celle-ci peut se définir comme une approche médicale basée sur une intégration de toutes les données personnelles de chaque patient, qu'elles soient cliniques, génétiques, biologiques, radiologiques, ou environnementales. La médecine personnalisée utilise les connaissances fondamentales actuelles sur l'évolution des pathologies afin d'intégrer cet ensemble de données à la décision médicale, dans le but d'améliorer la prise en charge et le devenir de chaque patient<sup>68</sup>. Citons notamment la recherche et l'utilisation de biomarqueurs, pronostiques ou prédictifs, qui font dans certaines indication partie de la décision thérapeutique<sup>66</sup> : le statut MGMT méthylé ou non pour les patients atteints de glioblastome (prédictif de la réponse au traitement)<sup>11</sup>, ou encore les recherches actuelles de tests de radiosensibilité, qui pourraient permettre pour chaque patient de prédire les effets secondaires escomptés et d'adapter le traitement en fonction<sup>69,70</sup>. Ainsi, la médecine personnalisée en radiothérapie, se basant sur les données cliniques, biologiques ou encore radiologiques du patient, permet d'individualiser les traitements, avec pour objectif une amélioration de la prise en charge<sup>67</sup>.

La figure 10 résume les développements de la radiothérapie comme décrit ci-dessus.

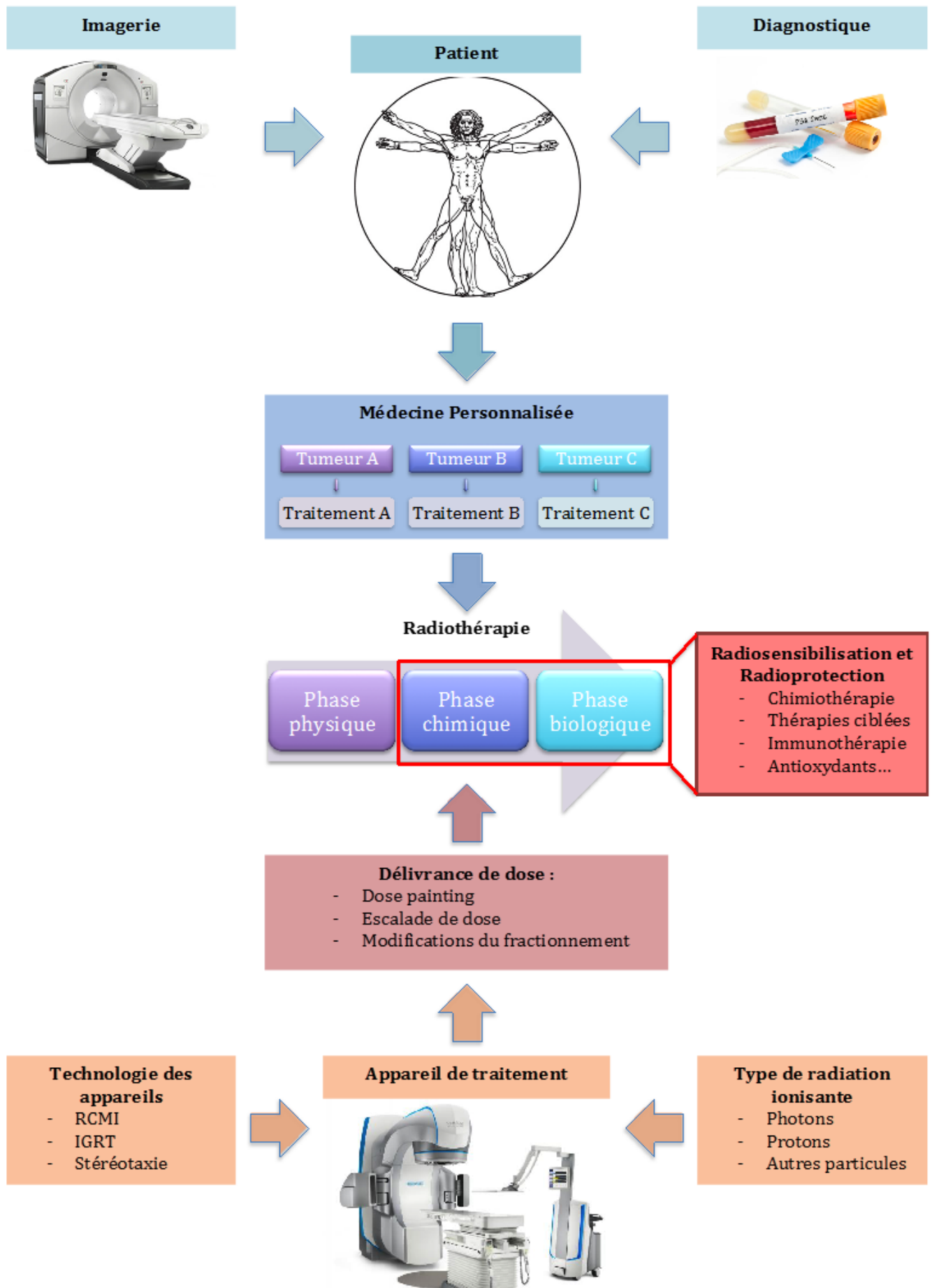


Figure 10 : Développements actuels de la radiothérapie.



« Parce que j'ai la dimension de ce que je vois,

Et non pas celle de ma taille »

*Le livre de l'intranquillité*, Fernando Pessoa

## **Partie II**

### **Nanotechnologies et onco-radiothérapie : plongée dans la révolution de la nanomédecine**

Au cours de cette partie, nous définirons les rapports émergents entre les nanotechnologies et la médecine, en nous concentrant sur leurs apports en onco-radiothérapie. Une fois la place de cette nouvelle révolution qu'est la nanomédecine bien définie, nous aborderons plus en profondeur le sujet même de cette thèse : « *les nanoparticules de numéro atomique (Z) élevé en radiothérapie* ». Nous développerons les concepts et les raisons pour lesquelles il est envisagé de les utiliser en radiothérapie et nous explorerons leur mode d'action au travers du débat actuel sur la nature de leur action dite « radiopotentialisante », leur possible toxicité et leur place potentielle dans la stratégie thérapeutique.

<b>Partie II.....</b>	<b>48</b>
<b>Nanotechnologies et onco-radiothérapie : plongée dans la révolution de la nanomédecine .....</b>	<b>49</b>
<b>1.Nanotechnologies et Nanomédecine .....</b>	<b>51</b>
1.1 Nanotechnologies : définition et historique.....	51
1.2 Nano-objets : définition et propriétés .....	52
1.3 Nanotechnologies : Domaines d'application.....	54
1.4 Introduction à la Nanomédecine .....	55
<b>2. Nanoparticules .....</b>	<b>56</b>
2.1 Nanoparticules : définitions.....	56
2.1.1 Différents types de nanoparticules .....	56
2.2.2 Propriétés des Nanoparticules .....	59
2.2.3 Voies de synthèse et mode de mesure.....	60
2.2 Comportement des nanoparticules en milieu biologique .....	60
2.2.1 Biodistribution : principes et place des nanoparticules .....	60
2.2.2 Biodistribution : Apport des nanoparticules .....	63
2.2.3 Résumé du comportement biologique des nanoparticules.....	69
2.3 Applications médicales des nanoparticules.....	71
2.3.1 Impact potentiel des nanoparticules en médecine .....	71
2.3.2 Applications thérapeutiques des nanoparticules .....	71
2.3.3 Apport des nanoparticules à l'imagerie .....	80
2.3.4 Nanoparticules : diagnostic, biomarqueurs et médecine personnalisée .....	81
2.3.5 Nanoparticules de numéro atomique élevé en radiothérapie : naissance d'un nouveau concept.....	83
2.3.6 Nanoparticules en onco-radiothérapie : résumé des apports potentiels .....	83
<b>3. Nanoparticules à numéro atomique élevé en radiothérapie.....</b>	<b>85</b>
3.1 Nanoparticules à numéro atomique élevé : introduction.....	85
3.1.1 Numéro atomiques élevés et augmentation de dose : historique .....	85
3.1.2 Principes de base et positionnement dans la stratégie thérapeutique.....	86
3.1.3 Postulat physique sous-jacent.....	87
3.1.4 Etudes de la « radiopotentialisation » : validation du concept.....	90
3.1.5 Débat actuel.....	101
3.2 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Physique.....	109
3.2.1 Débat autour des interactions RI-NPs .....	109
3.2.2 Quantification de l'augmentation de dose .....	110
3.3 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Chimie .....	120
3.4 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Biologie.....	122
3.4.1 Effets sur la réparation de l'ADN.....	122
3.4.2 Nanoparticules de numéro atomique élevé et stress cellulaire .....	123
3.4.3 Effets sur le cycle cellulaire .....	127
3.4.4 Modulation de l'expression génique .....	129
3.5 Mode d'action des Nanoparticules de numéro atomique élevé : conclusion .....	129
3.6 Notions de nanotoxicologie .....	131
3.6.1 Introduction à la nanotoxicologie.....	131
3.6.2 Études de la nanotoxicité .....	132
3.6.3 Nanotoxicité des nanoparticules de numéro atomique élevé : état des lieux.....	133
3.6.4 Nanotoxicologie : conclusion .....	134
3.7 Challenges en vue d'une translation clinique.....	135
3.7.1 Phase Pré-clinique : étapes clés.....	135
3.7.2 Mise en essais clinique : étapes clés .....	137
3.7.3 Essais cliniques : état des lieux.....	139

# 1.Nanotechnologies et Nanomédecine

## 1.1 Nanotechnologies : définition et historique

Les Nanotechnologies peuvent se définir comme « *la conception, la caractérisation, la production et l'application intentionnelle de matériaux, structures, dispositifs et systèmes en contrôlant leur taille et forme dans la gamme du nanomètre ( $10^{-9}$  m)* »<sup>13,14</sup>.

La première évocation de la possibilité de contrôler la matière à l'échelle nanométrique revient au prix Nobel de physique Richard Feynman. Le 29 décembre 1959, au cours d'un discours intitulé « *There's Plenty of Room at the Bottom* » à l'*American Physical Society*, Feynman pose la question de ce qui se passerait si nous pouvions assembler les atomes un par un de la façon dont nous le souhaitons<sup>71</sup>.

Techniquement réalisable à partir des années 1970, la paternité du terme « *Nanotechnologie* » revient quant à elle au Pr. Norio Taniguchi en 1974. C'est à partir des années 1980, lorsque le développement de nouveaux moyens d'imagerie permet la visualisation de la matière à l'échelle atomique, que les Nanotechnologies prennent véritablement leur envol. La découverte du Fullerène  $C^{60}$  en 1985 par Sir Harold Walter Kroto (prix Nobel 1996) donne le véritable coup d'envoi<sup>72</sup>.

A partir des années 2000, les Nanotechnologies font leur apparition dans les produits commerciaux : automobiles, téléphones portables, crèmes solaires ou encore balles de golf sont désormais « nano-équipés ». Mais notre époque n'a pas le monopole des nanomatériaux. Ainsi, les premiers matériaux nano-manufacturés sont retrouvés dès l'antiquité, obtenus par chauffage à haute température, ils permettent l'obtention de couleurs à base d'or colloïdal ou d'oxydes métalliques<sup>73</sup>.

Actuellement, le marché des Nanotechnologies est en pleine expansion, avec un chiffre d'affaire estimé en 2015 à un trillions de Dollars US<sup>74</sup>, et une production de plus de 10 tonnes de Nanomatériaux en 2007<sup>72</sup>. Néanmoins, l'origine humaine des nanomatériaux ne compte « que » pour 10% de l'ensemble des nanomatériaux, les 90% restant étant d'origine naturelle à travers l'érosion, les feux, ou encore les éruptions volcanique<sup>71</sup>.

Le développement des Nanotechnologies est considéré comme pouvant avoir un impact sur notre société aussi important que la révolution industrielle. Si l'ère actuelle, la première, est celle des nanostructures passives, désignées pour remplir une tâche précise, 4 ères de développement supplémentaires ont été théorisées : la seconde ère dite « nanotechnologique » sera celle des nanostructures actives, multitâches avec la genèse de **nanoplateformes primaires** ; la troisième ère verra la naissance de véritables « **nanosystèmes** » résultant de l'assemblage de milliers de « nano-composants » interagissant entre eux ; la quatrième ère

prévoit quant à elle l'apparition de « **nanosystèmes intégrés** », fonctionnant comme une cellule, avec des systèmes hiérarchiques et une forme d'autonomie<sup>75</sup>.

## **1.2 Nano-objets : définition et propriétés**

La fabrication de nanomatériaux constitue une branche des nanotechnologies. Selon l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), ces nanomatériaux peuvent être divisés en **nano-objets**, qui possèdent au moins une dimension dans l'échelle nanométrique, et en **matériaux nanostructurés**, possédant au moins une structure interne ou une structure de surface dans l'échelle nanométrique<sup>76</sup> (figure 11).

Sont définis ainsi parmi les nano-objets : **(i)** les **nanoparticules** (NPs), possédant leurs 3 dimensions dans l'échelle nanométrique ; **(ii)** les **nanofibres**, possédant 2 dimensions dans l'échelle nanométrique ; **(iii)** les **nanofeuillets**, possédant une dimension dans l'échelle nanométrique.

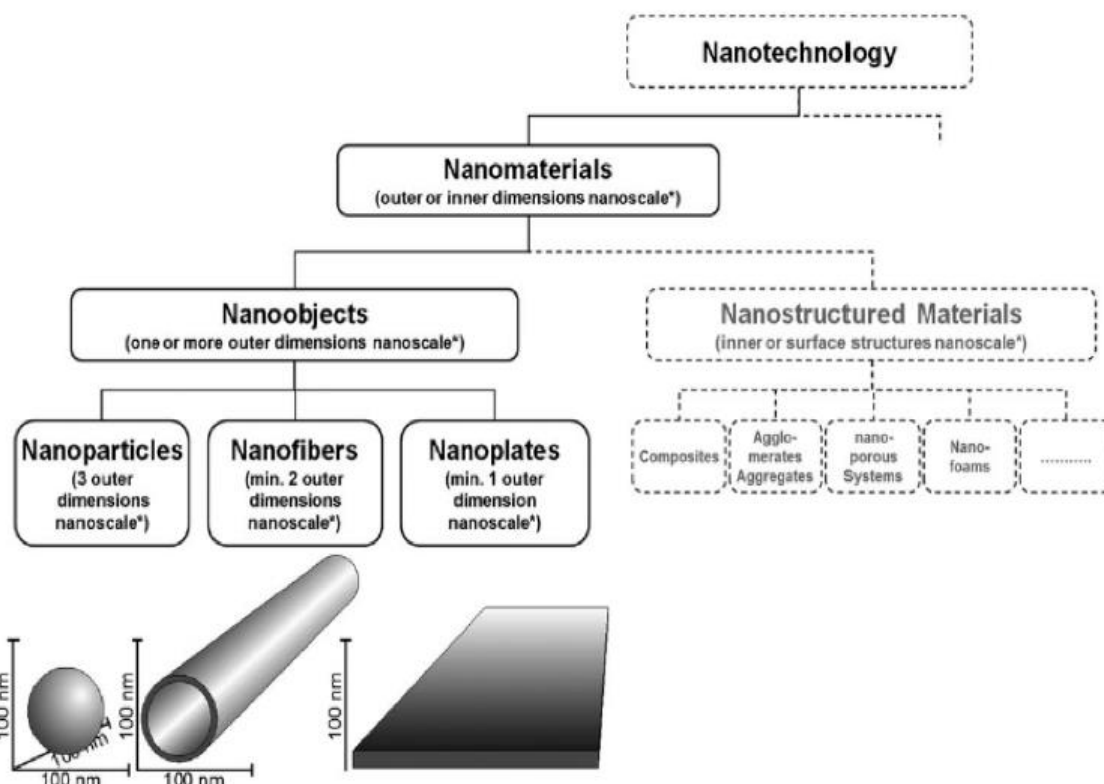


Figure 11 : Définition ISO des nanomatériaux. Parmi les nano-objets se retrouvent les nanoparticules (NPs), les nanofibres et les nanofeuillets. Figure issue de la référence <sup>76</sup>.

Cette définition ne fait néanmoins pas consensus. En effet, cette « échelle nanométrique », définie entre 1 et 100 nm, ne prend pas en compte tous les nanomatériaux<sup>77</sup>. Certains auteurs préfèrent, plutôt qu'une simple définition de taille, une définition fonctionnelle. Ainsi, pour la « *Food and Drug Administration* » (FDA, USA), est considéré comme appartenant aux nanomatériaux « *tout produit ou matériel fabriqué montrant des propriétés physiques ou*

chimiques, ou des effets biologiques, attribuables à ses dimensions », même si celle-ci sortent de l'échelle traditionnelle des 100 nm (et ce jusqu'à 1000 nm)<sup>22</sup>.

En effet, à l'échelle nanométrique, les nanomatériaux possèdent des propriétés uniques, très différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle microscopique ou macroscopique<sup>72</sup>.

Les différences principales entre matériaux nanométriques et non nanométriques tiennent en des effets dits « de surface » et des effets « quantiques », modifiant leurs réactivités chimiques, leurs propriétés mécaniques, optiques, électriques, magnétiques, et leurs comportements biologiques, qui diffèrent ainsi drastiquement de celles de même matériaux à une échelle plus importante<sup>71,78,79</sup>.

Les effets de surface propres aux nanomatériaux sont en partie dus à leur plus grand ratio surface/volume : plus la taille du matériel diminue, plus la surface disponible – à volume total égal – est importante. Ce ratio surface/volume permet une réactivité augmentée du fait du potentiel d'interactions avec l'environnement plus important (figure 12). Ainsi, les nanoparticules constituent déjà près du tiers du marché de la catalyse. Celles-ci étant par ailleurs à la même échelle que de nombreuses molécules et/ou processus biologiques, on peut aisément imaginer que leurs propriétés biologiques soient très différentes de celles des mêmes matériaux à une échelle plus importante<sup>73</sup>.

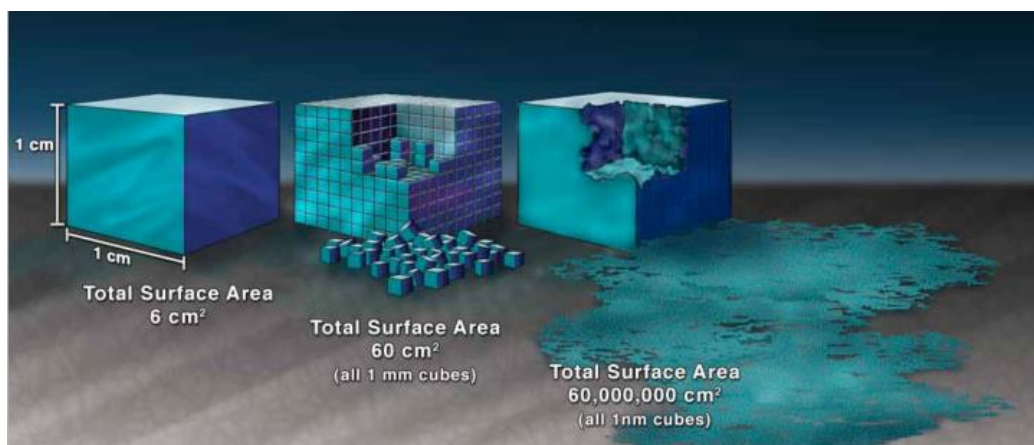


Figure 12 : Ratio surface/volume des nanoparticules. Un cube de 1 cm de côté présente une surface de 6 cm<sup>2</sup> pour un volume d'1 cm<sup>3</sup>. 1000 cubes de 1 mm de côté présentent une surface de 6 mm<sup>2</sup>, soit un total de 60 cm<sup>2</sup> de surface pour le même volume total. Si on passe à des cubes de 1nm de côté, on obtient 10<sup>21</sup> cubes pour une surface totale de 6000 m<sup>2</sup>, toujours à volume constant. Figure issue de la référence <sup>73</sup>.

A l'échelle nanométrique, les électrons possèdent un comportement discontinu du fait du confinement auquel ils sont contraints : ces modifications comportementales définissent les effets quantiques observables avec les nanomatériaux<sup>71</sup>. Ils modifient ainsi diverses propriétés, comme le point de fusion, la conductivité électrique, le magnétisme, la réactivité chimique, les propriétés optiques, mécaniques... et permettent d'envisager des applications particulières pour

ces matériaux, ces propriétés pouvant être « réglées » en jouant entre autre sur la taille des nanomatériaux<sup>73,80</sup> (figure 13).



Figure 13 : Démonstration visuelle du « réglage » des propriétés de nanoparticules métalliques. L'exemple ci-dessus est celui de nanoparticules composées d'un cœur de silice recouvert d'une enveloppe d'or, dont les propriétés d'absorption optiques changent en fonction de la taille du cœur et de l'épaisseur de l'enveloppe d'or. Figure issue de la référence<sup>80</sup>.

### **1.3 Nanotechnologies : Domaines d'application**

Le marché des nanotechnologies ne cesse de croître. Ses applications sont extrêmement variées, et peuvent être classées en quatre grandes catégories d'applications : **(i) technologiques et industrielles ; (ii) humaines et environnementales ; (iii) produits de consommation ; (iv) médicales.**<sup>71,72,81</sup>

Les applications **technologiques et industrielles** concernent les applications électroniques (microélectroniques, stockage de données, batteries), le transport (pneus de voiture, pare-chocs), les revêtements (surfaces autonettoyantes – voir figure 14 – matériaux anti-rayures, peintures), les catalyseurs chimiques, *etc.* Les applications **humaines et environnementales** permettent le développement de panneaux solaires, de textiles antimicrobiens ou « *waterproof* », des applications de purification, *etc.* Les applications pour les **produits de consommation** concernent les crèmes solaires avec des nanoparticules de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) et d'oxyde de zinc ( $\text{ZnO}$ ), les produits cosmétiques, les colorants et certains composants alimentaires ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ), les dentifrices, les cigarettes, les savons, *etc.* Enfin, les applications **médicales** reposent sur les propriétés anti-microbiennes, optiques (imagerie), cargo (délivrance de drogue, vaccination, diagnostic), *etc.*



Figure 14 : L'Hôtel de Police de Bordeaux. Ses murs blancs contiennent des nanoparticules de dioxyde de Titane ( $\text{TiO}_2$ ), utilisées pour leurs capacités autonettoyantes du fait des propriétés de photo-catalyse du  $\text{TiO}_2$ .

## **1.4 Introduction à la Nanomédecine**

La nanomédecine correspond à l'utilisation des nanotechnologies pour améliorer les soins de santé, en se basant sur les propriétés et caractéristiques propres des nanomatériaux afin d'obtenir des outils thérapeutiques, diagnostiques ou d'imagerie optimisés<sup>13,78,82</sup>.

Ainsi, les nanotechnologies touchent principalement les trois domaines médicaux que sont le diagnostic, l'imagerie et la thérapeutique et permettent de les améliorer et d'ouvrir de nouvelles voies de recherche et de prise en charge<sup>83</sup>. Pour le **diagnostic**, les apports de la nanomédecine pourrait permettre l'amélioration des sensibilités et spécificités de tests diagnostiques déjà existant, ou permettre le développement de nouveaux tests plus performants, comme des « *sondes multiplex* » autorisant la détection de plusieurs marqueurs, simultanément<sup>84</sup>.

En regard de l'**imagerie médicale**, les nanotechnologies pourraient permettre des améliorations en offrant des systèmes d'imagerie multimodaux en apportant de nouvelles informations diagnostiques et/ou pronostiques, et de développer l'imagerie cellulaire en temps réel<sup>83</sup>.

Pour les aspects thérapeutiques, les Nanotechnologies offrent des opportunités d'optimisation de la pharmacopée en termes de biodistribution et de ciblage des drogues, mais également en améliorant leur profil de toxicité et/ou leur efficacité. Elle pourrait également rendre possible l'administration de nouvelles molécules thérapeutiques, comme les siRNA ou comme les nanoparticules de numéro atomique élevé pour la radiothérapie<sup>83,85</sup>.

De par ses multiples opportunités de développements, la nanomédecine pourrait être la prochaine révolution médicale. Elle semble d'ores et déjà s'inscrire dans les développements



actuels de la médecine, notamment en oncologie, en ouvrant de nouvelles voies pour la médecine personnalisée au travers de biomarqueurs plus efficaces ou de nouvelles méthodes de génomique et de protéomique. Elle permet également l'émergence de nouveaux concepts comme la nano-théranostique, alliant un agent thérapeutique à un agent d'imagerie dans un seul et même nano-médicament, dans le but de traiter et de suivre dans le même temps l'accumulation, le relargage et l'efficacité d'un nano-médicament au site tumoral<sup>84,86,87</sup>.

Les travaux de recherche et de développement sont de plus en plus nombreux en ce sens, notamment pour la cancérologie, le nombre d'articles disponible sur PubMed associés aux mots clés « nanomédecine » et « oncologie » a quasiment doublé chaque année entre 2000 et 2014<sup>88</sup>. L'Union Européenne a investi près de 650 millions d'euros pour la nanomédecine et de nombreux essais dans tous les champs médicaux sont actuellement en cours<sup>82</sup>. Les nanotechnologies semblent offrir des opportunités illimitées pour l'avancée de la recherche médicale, et il est essentiel d'exploiter dans les années à venir le potentiel de ces nouveaux développements. Néanmoins, toute avancée technologique peut également présenter des risques pour la santé et la sécurité des populations, il est donc nécessaire d'identifier et d'évaluer avec la plus grande attention ces risques potentiels<sup>89</sup>.

## **2. Nanoparticules**

### **2.1 Nanoparticules : définitions**

#### **2.1.1 Différents types de nanoparticules**

Les nanoparticules (NPs) sont des nano-objets possédant leurs trois dimensions dans l'échelle nanométrique. Leur classification peut reposer principalement sur leur composition chimique (organiques, inorganiques, basées sur le carbone), sur leur forme (cubiques, plates, sphériques, en aiguille...), et sur leur type (liposomes, polymères, micelles...)<sup>90</sup>.

Parmi les nanoparticules organiques, se retrouvent : **(i) les liposomes ; (ii) les polymères ; (iii) les micelles ; (iv) les dendrimères ; (v) les nanoprotéines ; (vi) les nanocristaux ; (vii) les virosomes.**

**Les liposomes** sont parmi les NPs les plus étudiées. Synthétisées pour la première fois par Alec D Bangham à partir de 1961, ce sont des structures lipidiques amphiphiles, biocompatibles et biodégradables, composées de vésicules sphériques. Les liposomes sont constitués d'une double couche lipidique (uni lamellaire) ou d'une série de double couches lipidiques

superposées comme les peaux d'un oignon (multi lamellaire). Leurs dimensions varient de 80 nm à 1 mm. Les liposomes permettent d'encapsuler et de transporter des drogues hydrophiles dans leur cœur aqueux, ou des molécules hydrophobes dans leur lamelles lipidiques<sup>79,91,92</sup>.

**Les nanopolymères** sont composées de polymères (macromolécules formées de la répétition de sous-unités monomériques) conjugués à des drogues ou des agents d'imagerie afin d'en augmenter la biodisponibilité et la biocompatibilité. Les polymères utilisés, comme le *Polyéthylène Glycol* (PEG) ou le *Poly(lactic-co-glycolic acid)* (PLGA) sont parmi les plus employés. Ces polymères peuvent être constitués d'une seule chaîne reliée au médicament ou former de véritables architectures polymériques encapsulant la molécule cible dans leur cœur hydrophobe. Leur dégradation progressive permet un relargage contrôlé et prolongé dans le temps<sup>92-94</sup>.

**Les micelles** sont des agrégats sphéroïdaux de molécules amphiphiles auto-assemblées (lipides ou polymères) possédant une tête polaire hydrophile dirigée vers le solvant (si celui-ci est aqueux) et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur. Elles permettent ainsi de solubiliser une molécule hydrophobe afin d'en améliorer la biocompatibilité<sup>14,93,95</sup>.

**Les dendrimères**, synthétisés pour la première fois en 1979 par D.A. Tomalia, sont composés d'un cœur constitué d'un groupe atomique avec au moins 2 fonctions chimiques identiques, sur lesquelles sont branchés de façon séquentielle plusieurs groupes de monomères, eux-mêmes reliés à d'autres monomères. L'ensemble formant une macromolécule formée de polymères branchés entre eux, rayonnant autour d'un centre, et rappelant les branches d'un arbre (dendrimère étant issu de la racine grec « *dendron* », signifiant arbre). La taille de la particule et ses propriétés peuvent être contrôlées en modifiant les monomères branchés. Les groupements terminaux externes peuvent être conjugués, par exemple à des anticorps, pour être fonctionnalisés<sup>13,14,91,94</sup>.

**Les nanoparticules protéiques ou nanoprotéines** sont constituées de drogues conjuguées à des protéines « cargo » endogènes, comme par exemple l'albumine, ou bien à des protéines complètement ou partiellement synthétiques qui peuvent avoir une fonction thérapeutique ou diagnostique<sup>79,93</sup>.

**Les nanocristaux** sont composés à 100% de la drogue sous forme cristalline. L'objectif est d'optimiser la biodisponibilité en améliorant la solubilité de la drogue, potentiellement insoluble sous forme non cristalline<sup>79,93</sup>.

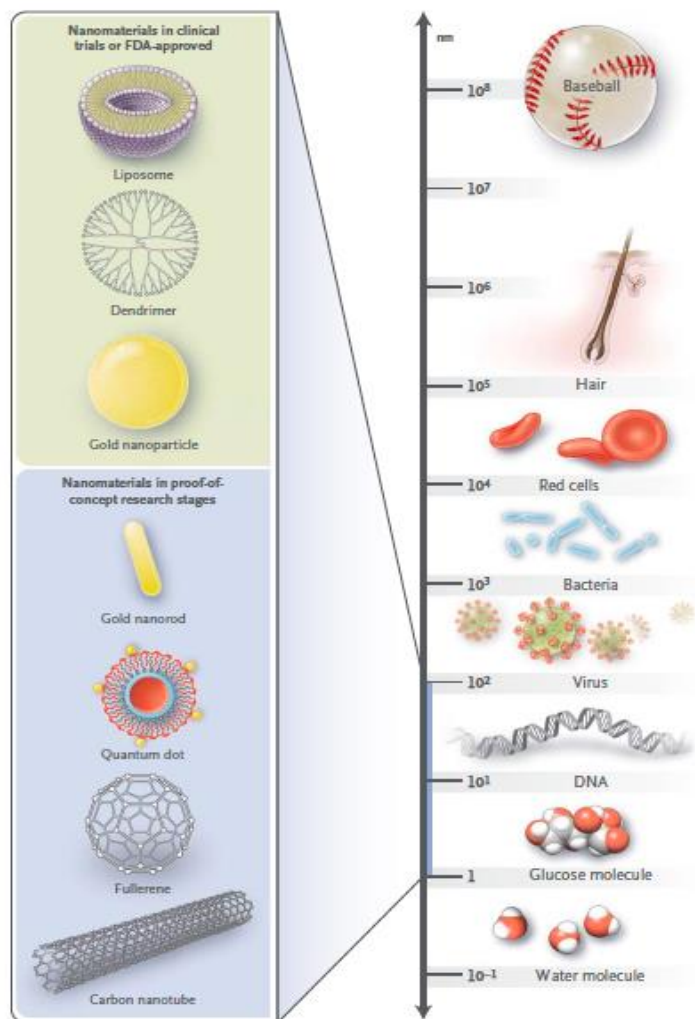
**Les virosomes** sont des nanoparticules qui miment l'organisation biologique des virus et reposent sur des structures et protéines virales (naturelles ou synthétiques). La thérapie génique est donc un champ d'application potentiel<sup>79,88</sup>.

Parmi les **nanoparticules inorganiques**, se retrouvent : **(i)** les nanoparticules de carbone ; **(ii)** les nanoparticules métalliques et de dérivés métalliques.

Les nanoparticules de carbone sont entièrement constituées de liaisons carbone-carbone et ont pour élément structural de base le graphène, une forme allotropique du carbone, cristalline et bidimensionnelle. On peut citer notamment les Fullerènes, classiquement sphériques ou ellipsoïdaux, ou encore les nanotubes de carbone, feuillets de carbone enroulés en un tube composé d'une ou de plusieurs parois de carbone. Ces nanomatériaux purement carbonés peuvent être modifiés chimiquement pour les fonctionnaliser, pour améliorer leur hydrophobicité, ou encore pour servir de transporteurs de différentes molécules<sup>13,91</sup>.

Les nanoparticules métalliques et de dérivés métalliques sont principalement utilisées pour leurs propriétés optiques, magnétiques et électriques. On les retrouve donc principalement pour des modalités diagnostiques et d'imagerie. Les « *Quantums Dots* » et les « *Cornell Dots* » sont des nanocristaux fluorescents encapsulés créés par l'association de métaux semi-conducteurs comme CdSe (Séléniure de Cadmium) ou CdS (Sulfure de Cadmium). Ces nanocristaux présentent des propriétés optiques et électriques uniques. Les NPs d'oxyde de fer (IONPs) sont utilisés comme agents de contraste en IRM. D'autres NPs métalliques et d'oxydes métalliques comme les NPs d'or (Au), de platine (Pt), d'argent (Ag), de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) sont également étudiées et exploitées, que ce soit en imagerie ou en thérapeutique (*via* notamment leurs propriétés magnétiques ou leur numéro atomique élevé)<sup>79,88,91</sup>.

Les NPs constituent donc une très grande famille offrant une très grande variété, par leur forme, leur composition et leur type. Des NPs hybrides, alliant différents types de NPs en une seule formulation, peuvent également exister, selon les besoins et les propriétés recherchées. La taille des NPs leur permet d'évoluer à la même échelle que bon nombre de processus biologiques et ajoute à leur intérêt. La figure 15 permet de mieux se rendre compte de leur taille comparativement aux autres structures biologiques environnantes.



**Figure 15:** A l'échelle du Nanomonde. L'échelle est normalisée au nanomètre, le 1 correspondant à 1 nm soit  $10^{-9}$  m. La balle de baseball est de l'ordre de 10 cm. Figure issue de la référence<sup>13</sup>.

### **2.2.2 Propriétés des Nanoparticules**

Les nanoparticules possèdent du fait de leur taille nanométrique des propriétés physico-chimiques particulières, leur conférant des caractéristiques mécaniques, optiques, électriques et magnétiques particulières<sup>96</sup>, modifiant leur comportement biologique.

Leur taille leur offre un ratio surface/volume très important et leur permet non seulement des interactions multiples avec leur environnement, mais offre également la possibilité de leur « greffer » plusieurs molécules afin de les fonctionnaliser, comme par exemple des anticorps<sup>13</sup>. Leur taille et leur réactivité de surface va ainsi influencer leur comportement en milieu biologique, et leur conférer des propriétés pharmacodynamiques spécifiques<sup>90</sup>.

Les effets quantiques, notamment pour les NPs inorganiques, leur offre des propriétés électroniques, magnétiques et optiques différentes, permettant de les utiliser dans diverses applications allant de l'imagerie à la thérapeutique.

Ces propriétés si particulières expliquent l'intérêt croissant de la médecine pour les NPs. Néanmoins, leur comportement différent fortement de celui des mêmes matériaux à une échelle plus importante, leur possible toxicité doit être correctement évaluée<sup>90</sup>.

### **2.2.3 Voies de synthèse et mode de mesure**

La synthèse de NPs, notamment inorganiques, suit deux grandes voies. Une première approche dite « *Top-Down* » consiste à partir de matériaux bruts à les réduire progressivement à l'échelle nanométrique par différents procédés. La seconde approche, dite « *Bottom-Up* » consiste à assembler des atomes afin d'arriver à une structure nanométrique. Du fait de la difficulté technique et du challenge technologique de cette approche, c'est pour le moment l'approche « *Top-Down* » qui est la plus utilisée<sup>90</sup>.

Une fois ces NPs obtenues, leur mode de mesure pose également question, notamment pour définir une relation dose-réponse pour un effet particulier. La concentration massique (par exemple, en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) n'est pas forcément la plus adaptée, et ce du fait des propriétés particulières des NPs en milieu liquide (insolubilité, agrégation). Il a donc été proposé d'exprimer la concentration nominale de la solution en nombre de NPs par unité de volume ( $\text{m}^3$ ) ou bien en quantité de NPs rapporté à la surface d'exposition afin de tenir compte de la propriété primordiale des NPs qu'est leur ratio surface/volume élevé et leur comportement en suspension/solution. Tant que la standardisation des unités de mesure d'une solution de NPs n'aura pas été établie, les comparaisons entre études utilisant des normes de mesures différentes resteront difficiles<sup>75,97</sup>.

## **2.2 Comportement des nanoparticules en milieu biologique**

L'amélioration de la biodistribution des drogues est une des voies de recherche actuelle afin d'améliorer l'efficacité médicamenteuse des thérapies anti-cancéreuses. Nous allons brièvement rappeler quelques notions de biodistribution, avant de définir le comportement des NPs en milieu biologique et leur impact potentiel dans ce domaine.

### **2.2.1 Biodistribution : principes et place des nanoparticules**

#### **2.2.1.1 Biodistribution : définition, et importance en oncologie**

La pharmacocinétique d'une drogue va définir sa capacité à atteindre et à s'accumuler de façon efficace au site tumoral ciblé, c'est-à-dire sa biodistribution tumorale. Une drogue est soumise à différentes étapes avant d'atteindre « sa » cible. Une première étape consiste à l'absorption sanguine de la drogue (sauf si celle-ci est injectée par voie intraveineuse) et à son transport *via* la circulation sanguine générale aux différentes régions du corps. A ce stade, sa demi-vie

plasmatique, définissant son temps de séjour dans la circulation sanguine, va dépendre de sa clairance : notamment, de son excrétion rénale, de son métabolisme hépatique ou de sa prise en charge par le système réticulo-endothélial (SRE)<sup>77</sup>. La concentration de la drogue à un endroit du corps dépendant de sa concentration systémique, une clairance trop rapide peut affecter sa distribution tumorale, mais une clairance trop lente peut augmenter sa toxicité si la drogue ne cible pas spécifiquement la tumeur. Ce rapport de la concentration plasmatique d'une drogue au cours du temps définit l'AUC (*Area Under Curve*), très utilisée en pharmacologie, et représentative de la biodisponibilité d'une drogue<sup>98</sup>.

La drogue sera ensuite extravasée depuis le milieu vasculaire jusqu'à l'*interstitium* tumoral, traversera l'espace interstitiel jusqu'aux cellules tumorales et enfin sera internalisée par les cellules cibles<sup>99</sup>. Le transport à travers l'endothélium vasculaire s'effectue principalement par diffusion ou convection, selon la taille et le poids de la molécule. Ces deux modes de transport se distinguent par l'origine du transfert. Pour la **diffusion**, la force motrice à l'origine de ce transfert est le gradient de concentration de la molécule entre les deux milieux, c'est le cas notamment pour les plus petites molécules. Elle est donc dépendante de la diffusivité de la molécule et des gradients de concentration de la molécule de la surface à la profondeur tumorale. Pour la **convection**, la force motrice est une force externe, le déplacement de la molécule dépend du déplacement du milieu qui la contient, donc du plasma, d'un compartiment à l'autre. La convection d'une molécule dépend donc directement du flux du milieu l'environnant, dirigé par la conductivité hydraulique (par exemple, les pores de la membrane endothéliale) et les différences de pression entre la tumeur et le compartiment vasculaire. La convection domine pour les molécules de taille plus importante<sup>100</sup>.

L'étape suivante correspond au déplacement de la drogue dans le milieu interstitiel tumoral, de la surface (la sortie du système vasculaire) à la profondeur. Ce transport, également diffusif ou convectif, va dépendre de la composition de l'espace interstitiel, notamment de la matrice extracellulaire. Les différentes protéines et polysaccharides composant l'*interstitium* peuvent être des sources de résistance physique à la progression de la molécule dans le milieu, notamment *via* leurs interactions directes avec la drogue ou par la pression qu'elles exercent<sup>100,101</sup>. Cette étape est fondamentale : une drogue peut montrer une concentration intratumorale importante, mais si la pénétration tissulaire est faible, seules les cellules proches des vaisseaux sanguins seront exposées à une concentration efficace<sup>102</sup>. La dernière étape correspond à l'internalisation dans la cellule tumorale, ou l'atteinte de la cible si celle-ci est différente (constituant du microenvironnement, par exemple). L'internalisation et l'activité de la drogue vont dépendre entre autres de l'état dans lequel se trouve la cellule cible (oxique ou hypoxique, par exemple). Le mode d'internalisation peut aussi être fondamental pour atteindre un compartiment subcellulaire donné. Enfin, la concentration de la drogue au niveau des

cellules tumorales, dépendant de toutes les étapes suscitées, à un impact direct sur son efficacité<sup>102</sup>.

Au niveau tumoral, la pharmacocinétique se retrouve perturbée par plusieurs spécificités, pouvant limiter la distribution de la drogue à la tumeur et ainsi participer au mauvais contrôle de la maladie, au même titre que les mécanismes de résistance. La prolifération tumorale et la croissance vasculaire anarchique modifient en effet les étapes d'extravasation et de diffusion à travers l'espace interstitiel. La pression interstitielle intra-tumorale, plus importante, peut empêcher voire inverser l'extravasation, et limiter le transport au centre de la tumeur. L'absence de drainage lymphatique efficace participe à cette augmentation de pression interstitielle, mais d'un autre côté diminue la clairance tumorale de la drogue<sup>99,100</sup>.

L'architecture anarchique des vaisseaux sanguins tumoraux entraîne un flux sanguin intra-tumoral incohérent, avec une viscosité sanguine importante et des vaisseaux comprimés à l'origine de zones hypoxiques. On définit généralement trois régions vasculaires tumorales : **(i) une région avasculaire et nécrotique, (ii) une région semi-nécrotique avec quelques capillaires circulants et (iii) une région stable en perfusion**, souvent périphérique. Tout cela résulte en une importante hétérogénéité dans la distribution de la drogue, et explique les états métaboliques variables des cellules tumorales et du microenvironnement, avec des zones hypoxiques et acides moins exposées aux drogues et plus résistantes car non proliférantes<sup>99,101,102</sup>.

### **2.2.1.2 Biodistribution : voies d'amélioration et place des nanoparticules**

Améliorer la distribution de la drogue au sein de la tumeur a pour objectif d'améliorer le ratio thérapeutique, en augmentant les concentrations intra-tumorales au dépend des concentrations dans les tissus sains<sup>103</sup>. Les différentes étapes du transport de la drogue peuvent donc être ciblées.

**L'amélioration du transport sanguin de la drogue** revient à diminuer sa clairance, à augmenter sa demi-vie et à diminuer sa toxicité. Cette amélioration peut être obtenue en protégeant la drogue des agressions du milieu biologique, en améliorant sa solubilité et sa stabilité. Les NPs offrent donc une alternative importante en jouant le rôle de cargo, transportant et protégeant la drogue, modifiant ainsi sa pharmacocinétique<sup>100,104</sup>.

**L'amélioration du ciblage tumoral et de l'extravasation** revient soit à modifier la drogue pour lui permettre de cibler spécifiquement le milieu tumoral et améliorer sa pénétration intra-tumorale, soit à modifier le microenvironnement tumoral dans lequel elle évolue. Le ciblage peut être effectué en fonctionnalisant la drogue ou la NPs cargo pour cibler spécifiquement la

tumeur. L'amélioration de la pénétration tumorale peut également être obtenue en tirant profit de la biodistribution particulière des NPs au sein de la tumeur, ou en la fonctionnalisant avec des molécules dégradant la matrice extracellulaire (comme les hyaluronidases). D'autres approches de modification du microenvironnement, comme les modifications de la vascularisation tumorale (*Bevacizumab*<sup>®</sup>), l'utilisation de vasodilatateurs/vasoconstricteurs pour influencer les gradients de pression vasculaires, la diminution de la pression intra-tumorale en ciblant la matrice extracellulaire ou en utilisant des cytotoxiques sont également soit en application clinique, soit en voie de recherche<sup>100,102</sup>. Enfin, des approches visent à cibler spécifiquement des compartiments intra-tumoraux définis comme les zones hypoxiques ou acides afin de concentrer l'action thérapeutique sur ces zones plus résistantes.

Les spécificités du microenvironnement tumoral restent donc un défi à la distribution de la drogue au sein de la tumeur, et à son efficacité thérapeutique. Les NPs, de par leur biodistribution et leurs propriétés particulières, offrent ainsi une alternative intéressante pour la délivrance de thérapeutiques ou d'agents d'imagerie<sup>13</sup>.

## **2.2.2 Biodistribution : Apport des nanoparticules**

Nous allons voir plus en détail dans cette partie les spécificités de la biodistribution des NPs et leur impact potentiel.

### **2.2.2.1 Clairance des Nanoparticules**

La clairance des NPs dépend principalement de 2 voies distinctes : **(i) la clairance rénale**, et **(ii) la clairance** *via* la prise en charge par le **système réticulo-endothélial (SRE)**.

**La clairance rénale** des NPs se fait *via* la filtration glomérulaire et dépend principalement de la taille, mais aussi de la forme et de la charge des NPs. La taille ici évoquée ne correspond pas à la taille intrinsèque de la NPS, mais à son diamètre hydrodynamique, issu de ses interactions avec le milieu environnant. Pour une filtration glomérulaire efficace, il est considéré que le diamètre hydrodynamique de la NP doit être inférieure à 5,5 - 8 nm, ce qui correspond aux plus petites des NPs. Cette filtration est rapide, de l'ordre de quelques minutes, ne permet pas un long temps de circulation de la NPs. Si elle semble intéressante pour certaines molécules potentiellement toxiques, comme les métaux lourds (afin d'éviter leur persistance), elle peut constituer un frein à une bonne accumulation intra-tumorale en diminuant la demi-vie de la molécule. Ainsi, les agents de contraste, nécessitant une excrétion rapide, sont de bons candidats pour cette voie de clairance<sup>24,98,103,105,106</sup>.



**La clairance par le système réticulo-endothélial (SRE)** intéresse principalement les NPs dont le diamètre hydrodynamique est supérieur à 10 nm. Cette clairance du SRE fait appel à plusieurs processus. Le premier est la reconnaissance des NPs par les monocytes et les macrophages du système phagocytaire mononucléaire, dont la fonction est de « nettoyer » la circulation des macromolécules ou des virus (qui sont dans le même ordre de grandeur en taille que les NPs). Cette reconnaissance est facilitée par l'adsorption de diverses molécules à la surface des NPs, dont des anticorps et des fragments du complément. C'est le phénomène d'opsonisation des NPs qui permet leur reconnaissance et leur phagocytose.

Une fois phagocytées, les NPs s'accumulent dans les organes du SRE, principalement dans les cellules de Kupffer (macrophages du lobule hépatique) au niveau du foie, la rate, les ganglions et organes lymphoïdes. Selon la nature dégradable ou non des NPs considérée, celles-ci peuvent s'accumuler et résider des mois ou des années dans ces organes, jusqu'à occasionner une nanotoxicité, ou bien être excrétées par la bile et les selles. D'autres NPs inorganiques peuvent se décomposer dans les macrophages et être à l'origine du rejet d'ions métalliques toxiques<sup>24,92,98,103,105</sup>.

La clairance des NPs par le SRE constitue également un obstacle à leur accumulation sélective dans la tumeur. Cette clairance peut également selon la nature de la NPs, conduire à une rétention prolongée et une potentielle toxicité. Afin d'éviter la prise en charge par les cellules du système phagocytaire mononucléaire, les NPs doivent donc en être « dissimulées ». Leur opsonisation peut être prévenue en les recouvrant de polymères comme le PEG (« *pegylation* »), ou encore en les internalisant au sein de liposomes. En diminuant l'adsorption, ces systèmes préviennent la formation de la *corona* de protéines autour de la NP. Cette corona, de par les modifications physico-chimiques et du diamètre hydrodynamique qu'elle engendre, est un facteur fondamental dans la pharmacocinétique d'une NP. La *pegylation*, en empêchant du moins en partie sa formation, change la biodistribution de la NP en diminuant sa prise en charge par le SRE. Elle permet d'augmenter la demi-vie plasmatique, et la concentration de la NPs d'un facteur 10 à 100<sup>85,93,107,108</sup>. *A contrario*, la prise en charge par le SRE peut également être un avantage, notamment pour l'utilisation d'agents de contraste visant à imager les organes lymphoïdes<sup>79</sup>.

### **2.2.2.2 Nanoparticules et ciblage tumoral : ciblage passif et actif**

#### **2.2.2.2.1 Modes d'extravasation**

Le transport du milieu vasculaire au milieu interstitiel fait appel à la diffusion ou la convection selon la taille des molécules. Ce transport peut s'effectuer soit à travers les cellules

endothéliales elles-mêmes (comme pour l'eau, ou des molécules lipophiles pouvant traverser la bicouche lipidique), à travers les fenestrations intercellulaires ou les jonctions intercellulaires de tailles variables selon les organes (eau, molécules lipophiles, hydrophiles, macromolécules, NPs) ou bien *via* un transport vésiculaire ou d'autres modes nécessitant une consommation d'énergie cellulaire (canaux ATP-dépendants, autres modes d'endocytose ou de phagocytose)<sup>99,109</sup>.

#### 2.2.2.2.2 L'effet de perméabilité et de rétention augmentées ou EPR

L'effet EPR ou de perméabilité et de rétention augmentées (« *Enhanced Permeability and Retention effect* »), a été découvert par H. Maeda en 1986, avec la mise en évidence d'une accumulation intra-tumorale préférentielle de bleu d'Evans lié à de l'albumine<sup>110</sup>. Il se caractérise, comme son nom l'indique, par une accumulation et une rétention préférentielle de certaines macromolécules dans la tumeur. Ces macromolécules ont un poids moléculaire au-dessus du seuil de filtration rénal (>40 kDa). L'EPR est en effet favorisé pour les molécules présentant une concentration et un temps de circulation sanguine plus important : les NPs ne présentant pas une clairance rénale sont donc plus à même de tirer profit de ce mécanisme<sup>98,111,112</sup>. L'intérêt de l'EPR est ainsi de permettre une accumulation préférentielle de macromolécules ou de NPs au niveau tumoral, en créant un effet différentiel avec les tissus sains qui eux, n'y sont pas soumis. On qualifie ce processus de « ciblage passif »<sup>14,104</sup>.

Cet effet EPR est la conséquence de particularités tumorales, anatomiques et fonctionnelles.

Du point de vue anatomique, l'activation de l'angiogenèse dès 2-3 mm de taille tumorale, mène à la formation anarchique et extensive de nouveaux vaisseaux. Cette vascularisation tumorale est anormale, avec moins de cellules musculaires lisses, une membrane basale dégradée et des fenestrations intercellulaires bien plus importantes que dans les tissus normaux (pouvant aller de 200 nm à plus d'1 µm selon les modèles, alors que celles des tissus normaux sont de l'ordre de 2 à 6 nm, hormis celles du foie ou de la rate pouvant atteindre 50 à 150 nm)<sup>77,78,94</sup>.

Cette vascularisation anormale permet donc une meilleure perméabilité et une conductivité hydraulique plus importante que celle des tissus normaux.

Le microenvironnement tumoral se caractérise également par une forte diminution des vaisseaux lymphatiques et veineux, diminuant ainsi la clairance des macromolécules hors de la tumeur et participant à leur rétention<sup>110</sup>. Cette absence de drainage, associé à une forte prolifération et à une importante sécrétion de MEC, est responsable d'une élévation de la pression du fluide interstitiel intra-tumoral, responsable d'un effet inverse en diminuant le gradient de pression hydrostatique entre le milieu vasculaire et le milieu tumoral, pouvant empêcher voir inverser en partie le transport convectif<sup>101,112</sup>.

A ces particularités anatomiques s'ajoutent des particularités fonctionnelles du milieu tumoral. Le microenvironnement tumoral est en effet à l'origine de la sécrétion de multiples facteurs augmentant la perméabilité vasculaire comme la bradykinine, le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines ou diverses cytokines, favorisant l'EPR<sup>110,111</sup>.

L'utilisation de cet effet EPR comme méthode de ciblage passif pour l'adressage tumoral de drogues *via* des NPs cargo a ainsi été à la base du développement de **nanovecteurs**. En exploitant les spécificités du milieu tumoral, les NPs permettent théoriquement une accumulation préférentielle dans la tumeur par rapport aux tissus sains (de l'ordre de 5 à 10 fois comparativement à une drogue libre). On peut ainsi espérer une augmentation de l'efficacité de la drogue délivrée et une diminution de ses toxicités<sup>13,15,105</sup>.

Néanmoins, cet effet EPR présente certaines limites. La forte pression interstitielle tumorale est un obstacle à la pénétration et à la progression des NPs qui peut conduire à une distribution inhomogène au sein de la tumeur. Cette hétérogénéité de distribution est également soutenue par la variabilité de l'architecture vasculaire tumorale, certains endroits pouvant présenter une perméabilité moins importante du fait de variations anatomiques du mur vasculaire. Les zones d'hypoxie sont également une limite à la distribution des NPs au sein du volume tumoral, notamment au sein des plus grosses tumeurs. Enfin, la présence d'endothéliums fenêtrés au sein d'autres organes comme le foie ou la rate limite l'accumulation préférentielle au sein de la tumeur : la pénétration tumorale basée sur le seul effet EPR est en moyenne inférieur à 5% de la dose de NPs injectée, quand près de 37% sont retrouvées dans le foie et la rate en cas d'injection intraveineuse<sup>22,99,104,105</sup>.

Ces limitations peuvent, de par la distribution et la métabolisation inhomogène de la drogue au sein de la tumeur, mener à une inefficacité voir à des mécanismes de résistance. Elles nécessitent ainsi le développement de nouvelles stratégies, comme le ciblage actif par fonctionnalisation des NPs, ou des techniques d'injection intra-tumorale.

#### *2.2.2.2.3 Ciblage actif et fonctionnalisation des Nanoparticules*

Le ciblage actif a pour objectif d'améliorer le ratio thérapeutique en augmentant la concentration de la NPs dans la tumeur au dépend des tissus sains et d'influencer la localisation de la NP à l'échelle tissulaire, voir son internalisation et sa localisation à l'échelle cellulaire<sup>103</sup>. Il rejoint ainsi le concept de la « *Magic Bullet* » de Paul Ehrlich, le père spirituel de la thérapie ciblée, définissant « *une drogue qui s'attache spécifiquement aux cellules malades mais qui n'est pas toxique pour les cellules saines* »<sup>87</sup>.

Le ciblage actif s'obtient en fonctionnalisant (modification de surface) la NPs avec des ligands spécifiques de la cible choisie. Cette cible peut être les cellules tumorales en elle-même ou le microenvironnement tumoral, comme le système vasculaire ou l'interstitium<sup>78,101</sup>.

Parmi les ligands possibles, on peut citer les anticorps monoclonaux (comme les anti-HER2), les *aptamères* (petites séquences simple brin d'ADN ou d'ARN occasionnant moins de réactions immunitaires et pouvant se lier avec une forte affinité à des cibles spécifiques : exemple de BIND-014 ciblant le PSMA), des protéines ou des peptides (comme la transferrine, ou des ligands des intégrines pour cibler l'endothélium vasculaire), ou encore des petites molécules comme les folates<sup>87,95</sup>.

Le succès de la fonctionnalisation des NPs dépendra de l'affinité et de la densité des ligands, mais également des modifications dans les interactions avec le milieu biologique que cela entraînera, et des conséquences sur la pharmacocinétique de la NP.

#### 2.2.2.2.4 Nanoparticules et microenvironnement tumoral

Une fois les NPs extravasées dans le milieu interstitiel tumoral, elles doivent encore le traverser pour atteindre les cellules cibles, et si possible permettre une distribution homogène au sein de la tumeur.

Le microenvironnement tumoral est caractérisé par une importante pression interstitielle, du fait de la multiplication anarchique de cellules et de la production anormale de matrice extracellulaire. Cette forte pression limite fortement les mouvements de fluide et donc la convection, favorisant la pénétration des NPs de taille inférieure à 200 nm par diffusion, au détriment des plus grandes, qui ont tendance à rester en péri-vasculaire.

Cette matrice extracellulaire, variable en qualité et en quantité, est également un obstacle aux mouvements des NPs – convectif ou diffusif - du fait des interactions qu'elle leur présente. Ces interactions avec les molécules de la matrice extracellulaire peuvent résulter en la constitution d'une nouvelle *corona* et jouer le rôle d'une véritable barrière de liaison, empêchant les mouvements des NPs. La charge de surface et la forme des NPs sont ici déterminantes pour les interactions électrostatiques et les forces de Van der Waals à l'origine de ces interactions.

Afin d'améliorer le transport des NPs à travers le milieu interstitiel, il est nécessaire de modifier et d'adapter leurs propriétés physico-chimiques, comme la taille, la forme ou encore la charge de surface. Recouvrir les molécules de PEG peut être une des solutions afin de limiter les interactions avec la matrice extracellulaire. D'autres stratégies, comme la fonctionnalisation des NPs avec des hyaluronidases pour dégrader cette matrice extracellulaire, ou des thérapies visant à réduire la pression interstitielle, peuvent être proposées pour améliorer le parcours des NPs au sein du microenvironnement tumoral<sup>99-102</sup>.

#### 2.2.2.2.5 Internalisation cellulaire et ciblage subcellulaire

Une fois les NPs parvenues au contact de la cellule tumorale, leur internalisation va suivre différentes voies et étapes selon leurs caractéristiques physico-chimiques.

La première étape correspond à la **liaison de la NP à la surface cellulaire**. Celle-ci peut être « non-spécifique », *via* des interactions électrostatiques, et est donc favorisée en cas de charge surfacique positive de la NPs. Le revêtement par du PEG, ou la formation d'une *corona*, en changeant les propriétés de surface, peuvent être un frein à ce type de liaison. Elle peut également être « spécifique », *via* la liaison d'un ligand de surface à un récepteur cellulaire en cas de fonctionnalisation de la NP.

La seconde étape correspond à l'**internalisation**, qui peut s'effectuer de différentes façons. Elle peut être « passive » pour les petites NPs, par diffusion à travers la membrane ou à travers certains canaux membranaires. Elle est sinon « active », nécessitant une prise en charge *via* une déformation membranaire (selon la taille, la forme et la charge de la NPs) et peut s'effectuer *via* des liposomes, ou plus classiquement par endocytose. Il peut s'agir de phagocytose dans certaines cellules spécialisées (celles du SRE), ou de différents types d'endocytose : endocytose à clathrine principalement, à cavéole, ou par pinocytose, dépendant là aussi des caractéristiques des NPs. L'internalisation par endocytose médiée par la clathrine peut être promue en ciblant certains récepteurs membranaires, comme ceux de la transferrine ou HER2.

La troisième étape correspond au transit intracellulaire des NPs. En cas de diffusion à travers la membrane ou de transport par liposome, les NPs sont libérées dans le cytoplasme. En cas de transport par endocytose, les NPs peuvent transiter *via* les endosomes précoces, tardifs, et les lysosomes, caractérisés par une baisse progressive du pH pouvant amener à une dégradation de la NPs ou au relargage d'ions toxiques en cas de NPs inorganiques. *Via* cette voie, les NPs peuvent aussi entrer en contact avec diverses organelles comme l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. La libération dans le cytosol peut être favorisée en fonctionnalisant les NPs avec des peptides sensibles au pH (peptide GALA, par exemple), ou d'autres revêtements favorisant la fusion membranaire des endosomes. Une fois dans le cytosol, les NPs peuvent également entrer en contact avec les organelles cellulaires comme l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie, où ils peuvent exercer leur effet. Le transport dans le noyau peut lui être effectué de façon « passive » *via* des pores membranaires (si <9nm) ou pendant la mitose, ou bien de façon « active » *via* un ciblage spécifique (à l'aide d'un signal de localisation nucléaire, notamment).

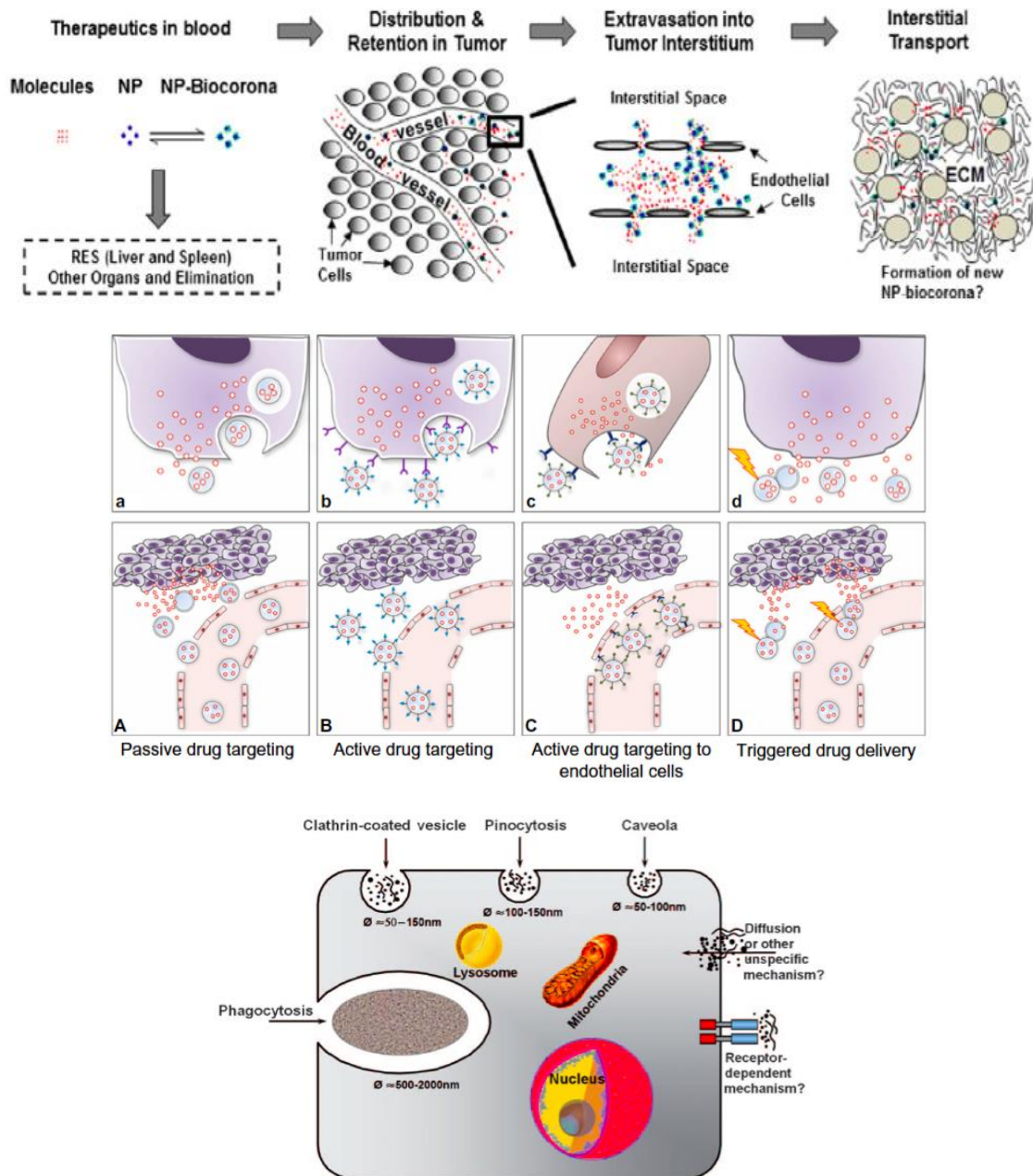
Ainsi, l'internalisation et le transit intracellulaire des NPs dépendent étroitement de leurs propriétés (taille, forme, charge de surface ou fonctionnalisation). Un ciblage cellulaire et subcellulaire peut donc être obtenu *via* un adressage spécifique des NPs<sup>90,94,100,101,103</sup>.

### **2.2.3 Résumé du comportement biologique des nanoparticules**

De par leurs propriétés, les NPs permettent d'améliorer la solubilité de composés hydrophobes, de protéger une molécule des interactions avec le milieu (métabolisation, dégradation), d'améliorer la biodistribution d'une drogue ou d'un agent d'imagerie *via* différents moyens de ciblage actif ou passif. Les NPs offrent ainsi la possibilité d'employer de nouvelles thérapies inutilisables jusqu'alors, ou d'améliorer le ratio thérapeutique de certaines drogues déjà existantes en ciblant préférentiellement la tumeur par rapport aux tissus sains.

Afin de tirer parti de ces avantages théoriques, les NPs doivent être synthétisées en tenant compte des modifications de biodistribution engendrées par leurs différentes propriétés physicochimiques. Sont ainsi particulièrement à prendre en compte leur taille et dispersion en taille, leur forme, charge de surface, réactivité, chimie de surface et fonctionnalisation éventuelle. Une taille de 60-80 nm par exemple, a été avancée comme un bon compromis pour la délivrance d'une drogue. Le milieu biologique dans lequel elles évoluent nécessite aussi d'être pris en compte, celui-ci pouvant modifier les propriétés initiales de la NPs *via* la formation d'une *corona* protéique ou la prise en charge par le système réticulo-endothélial. Le type cellulaire cible, de par ses propriétés propres, doit également être pris en compte. Enfin, toute modification engendrant un changement de comportement *in vivo*, un intérêt particulier doit être porté à l'éventuelle toxicité de ces nouvelles thérapeutiques<sup>90,92,93,100,103,107</sup>.

Les différentes étapes clés de la distribution des NPs *in-vivo*, expliquées ci-dessus, sont résumées dans la figure 16.



**Figure 16 :** Comportement des NPs *in-vivo*. *Figure du haut :* le transport d'une NP du point d'injection à la tumeur subit plusieurs étapes : un transport *via* les vaisseaux sanguins où a lieu la clairance par le SRE ou les reins et la formation d'une *corona*, le transport aux organes ou à la tumeur, puis l'extravasation dans l'interstitium via l'effet EPR, enfin le transport interstitiel avec formation d'une nouvelle *corona*. Issue de <sup>100</sup>. *Figure du milieu :* Stratégies pour le ciblage des NPs. En A et a, le ciblage passif ne prend en compte que l'effet EPR. La drogue est libérée dans les cellules tumorales ou le microenvironnement. En B et b, le ciblage actif des cellules tumorales par fonctionnalisation se base sur l'effet EPR pour extravaser dans l'*interstitium* tumoral, mais permet une meilleure internalisation et une délivrance de la drogue principalement en intracellulaire. En C et c, le ciblage actif du système vasculaire tumoral permet de délivrer la drogue directement au niveau du microenvironnement, qui peut être pris pour cible. En D et d, exemple d'un relargage de drogue déclenché par un stimulus externe comme un champ magnétique. Issue de <sup>87</sup>. *Figure du bas :* Mécanismes d'internalisation cellulaire des Nanoparticules. Plusieurs voies d'internalisation sont possibles, selon la taille des NPs et leurs propriétés physico-chimiques, allant de la diffusion à la phagocytose, en passant par diverses voies d'endocytose. Issue de <sup>76</sup>. ECM = MEC : Matrice Extracellulaire, RES = SRE: système réticulo-endothélial.

## **2.3 Applications médicales des nanoparticules**

### **2.3.1 Impact potentiel des nanoparticules en médecine**

Le rôle des NPs en médecine, et particulièrement en oncologie, peut affecter principalement trois domaines<sup>83</sup> : **(i) la thérapeutique** *via* l'amélioration de la délivrance de drogue ou l'utilisation de propriétés intrinsèques aux NPs pour de nouvelles applications comme l'hyperthermie ou la radiopotentialisation ; **(ii) l'imagerie**, en profitant là aussi des avantages de biodistribution offerts par les NPs pour véhiculer des agents de contraste préexistants, ou *via* leurs propriétés particulières comme agents de contraste à part entière ; **(iii) le diagnostic**, en améliorant les outils de détection moléculaire et en participant à l'avènement de la médecine personnalisée

De par leur potentiel de multifonctionnalité, de nouvelles applications peuvent également être développées, comme l'approche théranostique, alliant dans un même composé des propriétés thérapeutiques et d'imagerie<sup>107</sup>.

Nous allons voir dans les parties suivantes les applications des NPs dans ces différents champs de la médecine.

### **2.3.2 Applications thérapeutiques des nanoparticules**

#### **2.3.2.1 Transport de drogues**

Les NPs utilisées comme transporteurs de drogue, ou *cargo*, offrent plusieurs avantages : le transport de drogues non solubles initialement, la protection de la drogue de la clairance ou de dégradations enzymatiques, l'amélioration de la biodistribution et du ciblage tumoral, une diminution de l'accumulation dans les tissus non cibles, le tout résultant potentiellement en une amélioration de l'efficacité thérapeutique et une diminution des effets secondaires<sup>113</sup>.

Les différents types de NPs décrites au début de ce chapitre peuvent être utilisées. Les premières NPs à avoir été implémentées en clinique sont les liposomes, notamment avec l'Amphotéricine B liposomale dès les années 1990<sup>93</sup>. Les formulations nanoparticulaires actuellement utilisées en clinique pour l'oncologie sont :

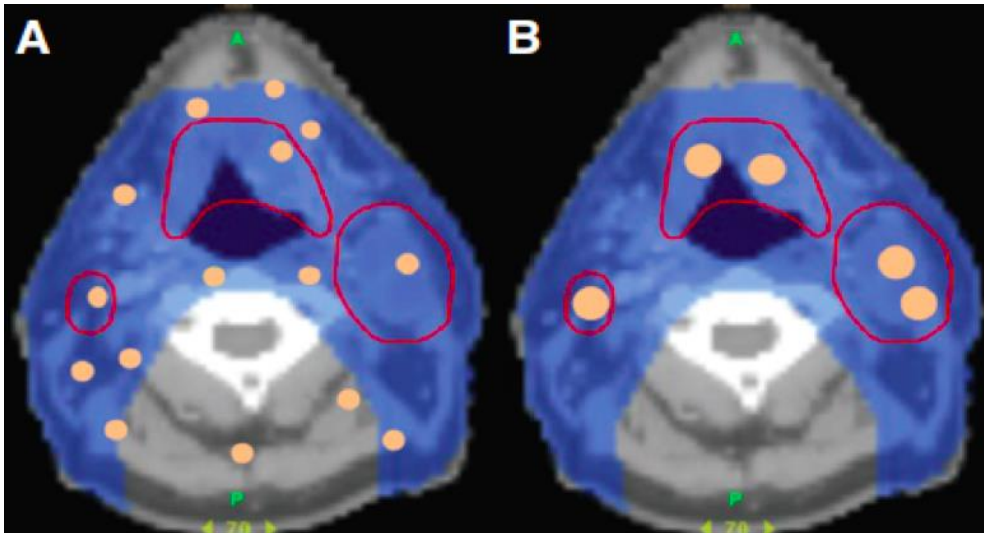
- **pour les liposomes** : les Anthracyclines liposomales, existant sous trois formes différentes (*Caelyx*<sup>®</sup> : doxorubicine liposomale Pegylée utilisée pour les cancers du sein, de l'ovaire et les sarcomes de Kaposi; *Myocet*<sup>®</sup> : doxorubicine liposomale non pégylée utilisée dans les cancers du sein; *DaunoXome*<sup>®</sup> : Daunorubicine liposomale utilisée dans le sarcome de Kaposi)<sup>92</sup>. Des formulations de Cisplatine liposomal sont également à l'étude<sup>114</sup>.



- **pour les nanoprotéines** : l'*Abraxane*<sup>®</sup>, constituée de Paclitaxel lié à une molécule d'albumine et qui permet une meilleure réponse tumorale dans le cancer du sein que le Paclitaxel seul<sup>92</sup>.
- **pour les nanopolymères** : Le *Neulasta*<sup>®</sup>, ou encore l'*Eligard*<sup>®</sup> avec une fonction de relargage progressif, sont des exemples<sup>93</sup>.
- **pour les micelles polymériques** : Le *Genexol-PM*<sup>®</sup>, Paclitaxel polymérique actuellement approuvé en Corée du Sud pour le traitement des cancers du sein et du poumon<sup>14</sup>. Le *BIND-014*<sup>®</sup>, constitué de Docetaxel au cœur d'une micelle polymérique, et bénéficiant d'un ciblage actif via un aptamère ciblant le PSMA, est en cours d'investigation pour le cancer de la prostate notamment<sup>114</sup>
- **pour les virosomes** : la *Gendicine*<sup>®</sup>, adénovirus recombinant exprimant la forme sauvage de la protéine P53 afin de transférer les cellules tumorales, est approuvé pour les cancers de la tête et du cou en Chine<sup>79</sup>.

D'autres molécules trop toxiques pour être utilisées seules pourraient bénéficier d'un transport par NP afin de réduire leur toxicité en augmentant leur sélectivité. C'est notamment le cas de la *Wortmannin*, dont les études précliniques semblent montrer une toxicité diminuée d'un facteur 3 à 5 en cas de formulation nanoparticulaire<sup>14</sup>. De nouvelles thérapies, comme l'immunothérapie ou les siRNA, peuvent également bénéficier des NPs et sont actuellement en cours d'investigation<sup>92</sup>.

En radiothérapie, l'impact d'une amélioration du transport de la chimiothérapie, notamment lors de traitements de radio-chimiothérapie concomitants, constitue un nouveau champ de recherche. Peu de données sont encore disponibles, et seuls quelques essais de faibles effectifs, principalement avec le *Caelix*<sup>®</sup> (pour des cancers du poumon, de la tête et du cou ou encore du col utérin) sont actuellement disponibles<sup>114</sup>. Le principe en est illustré sur la figure 17.



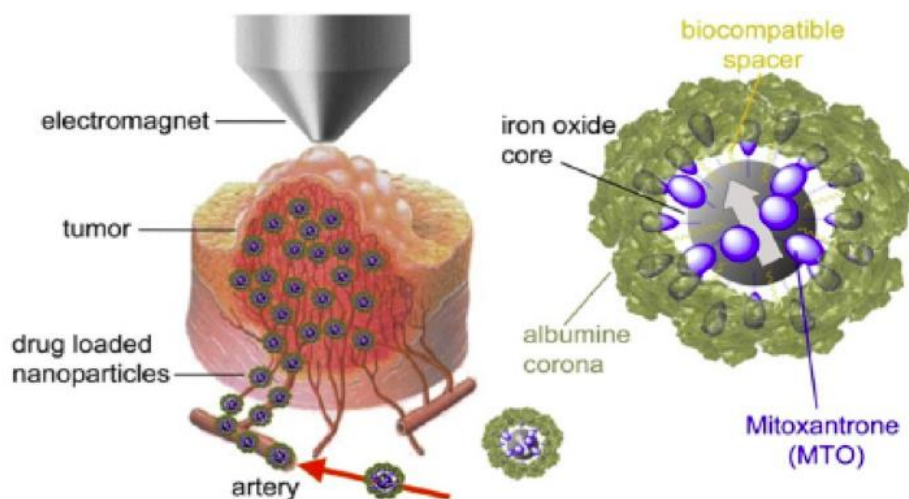
**Figure 17 :** Radio-chimiothérapie pour cancer de la tête et du cou. Sur cette coupe scannographique, les zones tumorales sont en rouge et le volume irradié en bleu. Les points « orange » correspondent à l'accumulation de la chimiothérapie, leur taille correspondant à leur concentration locale. En A, petite molécule de chimiothérapie, se répartissant dans un large volume de tissu sain. En B, la même molécule de chimiothérapie délivrée par une NP : accumulation préférentielle dans les zones tumorales, épargnant les tissus sains. Issue de <sup>14</sup>.

### **2.3.2.2 Autres applications thérapeutiques**

D'autres applications thérapeutiques peuvent être obtenues en exploitant les propriétés physico-chimiques particulières des NPs, notamment des NPs inorganiques.

Les propriétés magnétiques de ces NPs peuvent être utilisées comme moyen de guidage, en attirant les NPs injectées à l'aide d'un champ magnétique externe jusqu'à la zone d'intérêt, comme cela est illustré sur la figure 18. Ce procédé est appelé le « *Magnetic Drug Targeting* »

105.



**Figure 18 :** Principe du « *Magnetic Drug Targeting* ». A gauche, les NPs magnétiques transportant la drogue sont injectées en IV. L'application d'un champ magnétique externe au niveau de la zone cible attire les NPs dans la région tumorale. A droite, la NP composée d'un cœur d'oxyde de fer super-paramagnétique, chargé de *Mitoxantrone* et recouverte d'une bicouche lipidique et d'une *corona* d'albumine. Figure issue de <sup>105</sup>.

Ces mêmes propriétés peuvent également être utilisées à des fins thérapeutiques propres. Ainsi, l'apparition à l'échelle nanométrique de nouvelles propriétés, comme le super-paramagnétisme, permet en appliquant un champ magnétique externe alternant de faire varier rapidement le dipôle magnétique de ces NPs, résultant en l'émission de chaleur, dont l'intensité peut être contrôlée. Il est ainsi possible de réaliser un traitement local par hyperthermie (entre 41-45°C, pouvant amener une radiosensibilisation) voir même par thermo-ablation (plus de 45-50°C). C'est par exemple le cas pour certaines SPIONs (*SuperParamagnetic Iron Oxyde Nanoparticles*) comme pour les *Nanotherm*<sup>®</sup> 22,93,115.

D'autres propriétés permettent également le dégagement de chaleur par les NPs et le même type de traitement. La thérapie photothermale suit ce principe de production locale de chaleur en utilisant le phénomène de Résonance de Surface Plasmatique Localisée, notamment avec les NPs d'or. Ce phénomène est issu des propriétés optiques spécifiques de ces NPs et est généré par la lumière lorsqu'elle interagit avec des NPs conductrices de taille inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente. Cette interaction résulte en une excitation des électrons d'une bande conductrice et en une oscillation localisée de ces électrons, dégageant de l'énergie thermique. Ainsi, en définissant la taille et les propriétés des NPs d'or, il est possible de choisir une longueur d'onde d'excitation pour ce type de traitement<sup>115,116</sup>.

L'utilisation d'une source de lumière est également à la base de la Photothérapie Dynamique : dans ce cas, la réaction d'une source lumineuse d'une longueur d'onde donnée avec une NPs inorganique aura pour conséquence la production d'espèces réactives de l'oxygène dans le milieu<sup>106,117</sup>. Enfin, comme il sera vu plus loin, l'utilisation de NPs de numéro atomique élevé en combinaison avec la radiothérapie peut également présenter un intérêt thérapeutique.

Le tableau 1 présente une liste non exhaustive des NPs actuellement utilisées ou en évaluation clinique à des fins thérapeutiques.

**Tableau 1 : Nanomédecines en onco-radiothérapie au stade clinique. Adapté des références <sup>79,88</sup>.**

Modalité	Nom	Type de NPs	Principe actif	Type de cancer	Statut
Chimiothérapie Ciblage passif (EPR)	Doxorubicine liposomale	Liposome	Doxorubicine	Kaposi, Ovaire, Sein,	Approuvé FDA
	Caelyx/Doxil (pegylée), Myocet (non pégylée)	Pegylé ou non		Myélome multiple	Myocet : approuvé Europe et Canada
	Daunorubicine liposomale (DaunoXome)	Liposome	Daunorubicine	Kaposi	Approuvé FDA
	Vincristine liposomale (Marqibo)	Liposome	Sulfate de Vincristine	Leucémie Aigüe lymphoblastique	Approuvé FDA
	Irinotecan liposomal (Onivyde ou MM-398)	Liposome Pegylé	Irinotecan	Pancréas métastatique	Approuvé FDA
	Mifamurtide (Mepact)	Liposome	Muramyl tripeptide	Ostéosarcome résectable	Approuvé en Europe
	Cisplatine liposomale	Liposome	Cisplatine	Poumon non à petites cellules	Phase III
	Paclitaxel liposomal (EndoTag-1)	Liposome	Paclitaxel	Pancréas, Métastases hépatiques, Sein	Phase II
	Nab-paclitaxel (Abraxane)	Albumine NP	Paclitaxel	Sein, Poumon, Pancréas	Approuvé FDA

	Nab-rapamycine (ABI-009)	Albumine NP	Rapamycine	Tumeurs épithélioïdes périvasculaires et cancers mutés mTOR	Phase II
	SMANCS	Polymère conjugué	Néocarzinostatine	Foie et Rein	Approuvé au Japon
	Genexol-PM	Micelle Polymérique	Paclitaxel	Sein et Poumon non à petites cellules	Approuvé en Corée du Sud
	Opaxio	NP polymérique	Paclitaxel	Glioblastome	Approuvé FDA
	Eligard	Polymère	Leuproréline	Cancer de la prostate	Approuvé FDA
	NK-105	Micelle Polymérique	Paclitaxel	Sein méta ou récurrent	Phase III
	CRLX 101	NP Polymérique	Camptothecine	Rein, Ovaire, Poumon, Péritoine	Phase II
Chimiothérapie Ciblage actif	MM-302	Liposome ciblant HER2	Doxorubicine	Sein HER2 +	Phase II/III
	BIND-014	Nanoparticule polymérique ciblant le PSMA	Docetaxel	Prostate résistant à la castration, poumon non à petites cellules	Phase II
	MBP-426	Liposome ciblant le Récepteur de la transferrine	Oxaliplatine	Adénocarcinome Estomac, Œsophage et Gastro-Oesophagien	Phase I/II
	Docorubicine liposomale anti-EGFR	Liposome ciblant EGFR	Doxorubicine	Tumeurs solides	Phase I

Chimiothérapie délivrance par stimulus	ThermoDox	Liposome	Doxorubicine	Carcinome Hépatocellulaire	Phase III
Chimiothérapie délivrance combinée	Vyxeos (CPX-351)	Liposome	Cytarabine Daunorubicine (5 :1)	Leucémie Aigüe Myéloïde à haut risque	Phase III
	CPX-1	Liposome	Irinotecan Floxaduridine (1 :1)	Cancer Colo-rectal avancé	Phase II
Hyperthermie	NanoTherm	NP d'oxyde de fer		Glioblastome	Approuvé en Europe
	AuroLase	NP composée d'un cœur d'or et d'une enveloppe de silice		Cancer de la tête et du cou, Poumon primitif ou métastatique	Etude pilote
Thérapie génique ou RNAi	Gendicine	Virosome	Adénovirus recombinant, p53 wild type	Cancers de la tête et du cou	Approuvé en Chine
	Rexin-G	Virosome	Mutant dominant-négatif de la cycline G1 humaine	Toutes tumeurs solides	Approuvé aux Philippines

SGT53	Liposome ciblant le récepteur de la transferrine	DNA p-53 wild type	Glioblastome récurrent, Pancréas métastatique	Phase II
PNT2258	Liposome	Oligonucléotides d'ADN contre BCL2	Lymphome Non Hodgkinien ou Lymphome B à grandes cellules	Phase II
SNS01-T	NP Polymérique	siRNA contre eIF5A	Pathologies à cellules B	Phase I/II
Atu027	Liposome	siRNA contre PKN3	Pancréas	Phase I/II
TKM-080301	NP lipidique	siRNA contre PLK1	Neuroendocrines, Foie	Phase I/II
DCR MYC	NP lipidique	siRNA contre MYC	Foie	Phase I/II
MRX34	Liposome	miR 34 mimic	Foie, tumeurs solides et hématologiques	Phase I
CALAA-01	Nanoparticule polymérique ciblant le récepteur de la transferrine	siRNA contre la ribonucléotide réductase M2	Tumeurs solides	Phase I
ALN-VSP02	NP lipidique	siRNA contre KSP et VEGFA	Tumeurs solides	Phase I

	siRNA EPHA2 DOPC	Liposome	siRNA contre EPHA2	Cancers avancés	Phase I
	Pbi shRNA STMN1 LP	NP lipidique	siRNA contre stathmin 1	Cancers avancés et/ou métastatiques	Phase I
Immunothérapie	Tecemotide	Liposome	Antigène MUC1	Poumon	Phase III
	dHER2 + AS15	Liposome	Antigène recombinant HER2 et adjuvant AS15	Cancer du sein métastatique	Phase I/II
	DPX-0907	Liposome	Antigènes multiples associés aux tumeurs	Ovaire, Sein et Prostate HLA-A2 positifs	Phase I
	Lipovaxin-MN	Liposome	Antigène mélanome	Mélanome malin	Phase I
	JVRS 100	NP lipidique	Plasmide d'ADN	Leucémie réfractaire ou en rechute	Phase I
	CYT 6091	NP d'or colloïdales	TNF	Tumeurs solides avancées	Phase I
Radiothérapie	NBTR3	Nanoparticule d'oxyde d'Hafnium		Sarcome des tissus mous, Tête et cou, Foie, Prostate	Phase I Phase I/II Phase II/III
	GuIX	Nanoparticule de Gadolinium		Métastases cérébrales, Col utérin	Phase I



### **2.3.3 Apport des nanoparticules à l'imagerie**

Les NPs, de par leurs propriétés de biodistribution ou leurs caractéristiques intrinsèques, peuvent également servir à améliorer les modalités d'imagerie actuelles, ou en créer de nouvelles.

L'apport des NPs à la Tomodensitométrie (TDM). Les agents de contraste pour la TDM doivent avoir comme propriété d'atténuer les rayons X afin d'améliorer le contraste tissulaire. Le plus utilisé est actuellement l'iode. L'apport des NPs peut se faire ici de deux façons, soit en incorporant de l'iode dans une NP *cargo* afin d'en augmenter la demi-vie, soit en utilisant des NPs ayant la capacité d'atténuer par elle-même les rayons X, comme les NPs de numéro atomique élevé (or, bismuth, lanthanides...). Dans le cadre de la radiothérapie, l'amélioration du contraste peut être utile sur les scanners de planification ou sur les postes de traitement *via* l'IGRT<sup>15,113,118</sup>.

L'apport des NPs à l'IRM. Le principe de l'IRM est d'obtenir une image anatomique en mesurant le temps de relaxation des atomes d'hydrogène du patient, mis en résonance par un champ magnétique et l'émission d'ondes radio spécifiques lors de séquences d'examen. Les caractéristiques des images obtenues lors de ces séquences (T1, T2...) dépendent des spécificités des mesures effectuées. Les agents de contraste utilisés en IRM ont comme mode d'action d'altérer ce processus de relaxation. Certains agents augmentent le signal obtenu lors de séquences T1 (agents paramagnétiques comme le gadolinium), et d'autres réduisent le signal obtenu lors de séquences T2 (agents super-paramagnétiques : SPIONs, USPIONs). Le résultat est une amélioration du contraste des tissus cibles ou l'analyse de caractéristiques spécifiques. Le gadolinium est actuellement l'agent de contraste le plus employé. Des NPs contenant du gadolinium peuvent être développées pour améliorer sa biodisponibilité. Les NPs d'oxyde de fer comme les SPIONs (*Super-Paramagnetic Iron Oxyde* NPs) ou les USPIONs (*Ultra-small SPIONs*, < 50nm) peuvent également être utilisées et ont déjà été mises sur le marché (*Feridex*<sup>®</sup>, production arrêtée en 2008 ; actuellement *Ferumoxtran-10*<sup>®</sup> utilisé dans certains centres). En ciblant le SRE, ces agents de contraste permettent notamment d'améliorer la sensibilité et la spécificité de l'IRM pour le diagnostic d'invasion ganglionnaire, comme dans le cas du cancer la prostate, avec une sensibilité et une spécificité de l'ordre de 90.5% et 97.8%, y compris pour les petits ganglions de moins de 10 mm, contre 35.4% et 90.4% pour une IRM standard<sup>83,118-120</sup>.

L'apport des NPs à la Tomographie par Emission de Positions (TEP). La TEP permet de réaliser une imagerie en quantifiant et en localisant la désintégration nucléaire de radionucléides au sein du patient. Les NPs pourraient de par leurs propriétés pharmacodynamiques, améliorer la sensibilité de la TEP pour la détection de stades précoces, diminuer la captation par d'autres

organes en réduisant ainsi le bruit de fond, et permettre une multi-modalité en couplant ces radionucléides à d'autres agents de contraste notamment pour le scanner<sup>113,118</sup>.

**L'apport des NPs à l'échographie.** L'échographie utilise des vagues acoustiques de l'ordre du MHz dont la diffusion et la réflexion dans le milieu vont être analysées afin de reconstruire une image de l'organe examiné. Des agents de contraste basés sur des microbulles ont été développés afin d'augmenter l'échogénicité de certaines régions et du réseau vasculaire. Des nanobulles ont également été développées, avec cependant des performances moins intéressantes. Leur fonctionnalisation ou leur couplage à des thérapeutiques pourrait s'avérer plus intéressants<sup>113,118</sup>.

**L'apport des NPs à l'imagerie optique.** L'imagerie optique comme l'imagerie de fluorescence est surtout utilisée en clinique en situation *per* opératoire ou endoscopique afin de repérer les tissus tumoraux. Cette imagerie de fluorescence se base sur l'utilisation de fluorophores, dont l'excitation par une radiation lumineuse d'une longueur d'onde donnée produit une onde d'énergie généralement inférieure et spécifique. En utilisation clinique, les longueurs d'onde utilisables doivent permettre une bonne pénétration tissulaire, et sont souvent situées dans la région proche des infra-rouges (« *Near Infra-Red* », NIR, 650-950 nm). Parmi les NPs candidates pour ce type d'imagerie se retrouvent les Quantum dots, des NPs inorganiques qui offrent de grandes possibilités de réglage et potentiellement utilisables pour des situations comme la recherche de ganglions sentinelles. Leur fluorescence peut dépasser de 10 à 100 fois celle de fluorophores organiques et les rend donc très intéressants dans ces indications, mais leur potentielle toxicité se doit d'être prise en compte<sup>117,118</sup>.

Les NPs ont donc indéniablement un rôle à jouer afin d'améliorer les modalités d'imagerie et de permettre une détection plus précise et plus précoce des pathologies. Les NPs permettent également d'apporter de nouvelles informations par rapport à l'imagerie traditionnelle, et s'inscrivent donc dans le concept de la « *radiomic* ». De par leurs fonctionnalités modulables, elles permettent également d'incorporer dans une même NP des drogues thérapeutiques et des agents de contraste, ouvrant la voie à l'approche théranostique<sup>15,66</sup>.

### **2.3.4 Nanoparticules : diagnostic, biomarqueurs et médecine personnalisée**

Les NPs peuvent également améliorer les outils diagnostiques à notre disposition. Les NPs s'inscrivent ainsi dans le développement de la médecine personnalisée. Parmi les raisons expliquant l'inadéquation entre les progrès en connaissances fondamentales et ceux en soins du cancer, on peut citer l'incapacité de détecter suffisamment précocement l'apparition d'une maladie ou sa rechute, ainsi que l'incapacité de traiter efficacement des maladies métastatiques

du fait de l'importance et de la variété des altérations moléculaires qu'elles présentent. Sur ces deux fronts, les NPs peuvent avoir un apport intéressant<sup>89</sup>.

Concernant la détection, celle-ci peut se faire *via* des moyens d'imagerie, ou par des outils diagnostiques biologiques ou tissulaires. La détection rapide et précoce de molécules ou de signatures biologiques à partir de prélèvement est donc nécessaire. Dans ce domaine, les Nanotechnologies peuvent améliorer la sensibilité et la spécificité de ces tests, et être utilisées pour mettre au point des *sondes multiplex* permettant la détection de plusieurs biomarqueurs dans le même temps diagnostic<sup>83</sup>.

Nous pouvons par exemple citer les tests de détection du PSA améliorés par des NPs d'or fonctionnalisées avec des anticorps anti-PSA. En utilisant les propriétés magnétiques des NPs d'or, la détection du PSA est possible dès  $330 \text{ fg.mL}^{-1}$ , soit bien plus tôt que les  $0.1 \text{ ng.mL}^{-1}$ , des méthodes plus classiques<sup>121</sup>.

De nombreux kits de détection à base de NPs peuvent ainsi être envisagés, permettant de quantifier l'expression protéique ou génique au sein d'échantillons et de transformer ces analyses souvent longues en analyses à haut débit. Les NPs participent ainsi pleinement à l'essor de la protéomique et de la génomique, permettant de stratifier les patients selon leurs caractéristiques propres, et annonçant la médecine personnalisée<sup>86</sup>.

De par leur multifonctionnalité, les NPs permettent également la naissance de la théranostique, consistant en l'association dans une même formulation de moyens diagnostiques et thérapeutiques. Encore dans l'enfance, ce concept offre de belles opportunités et participe à la nanomédecine personnalisée. Deux approches principales existent<sup>107</sup> : **(i) une approche « biomarqueur »** ou **« compagnon diagnostique »** qui consiste, *via* les propriétés de diagnostic variées des NPs, à aider à la sélection du meilleur traitement selon les caractéristiques tumorales, à en prédire la réponse, et à en suivre l'administration et l'efficacité ; **(ii) une approche « thérapie guidée par l'image »**, qui elle consiste à repérer la cible, à suivre la biodistribution et l'accumulation d'une drogue à son niveau, à la quantifier et à en évaluer l'efficacité.

L'approche théranostique, de par l'analyse spécifique qu'elle fait de chaque patient et des possibilités thérapeutiques modulables qu'elle offre, s'inscrit donc elle aussi dans la médecine personnalisée<sup>66,86,89</sup>.

### **2.3.5 Nanoparticules de numéro atomique élevé en radiothérapie : naissance d'un nouveau concept**

L'approche classique afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie consiste à utiliser des drogues ou des moyens physiques (thermothérapie) afin de modifier la réponse chimique ou biologique (radiosensibilisation ou radioprotection) des tissus aux rayonnements ionisants. Ces approches peuvent bénéficier des Nanotechnologies comme nous venons de le voir.

Une nouvelle approche consiste à induire des modifications plus précocement, dès la phase physique de la radiothérapie. Il s'agit donc de modifier les interactions entre les rayonnements incidents et le milieu qu'ils traversent, en introduisant dans ce milieu des molécules capables d'induire une absorption de dose plus importante que dans les tissus normaux. Cette approche est le principe même de l'utilisation des nanoparticules de numéro atomique ( $Z$ ) élevé. Nous l'appellerons « **radiopotentialisation** » afin de la différencier de la « **radiosensibilisation** » dont une définition a été proposée précédemment<sup>14,22</sup>.

### **2.3.6 Nanoparticules en onco-radiothérapie : résumé des apports potentiels**

Ainsi, nous venons de voir que l'apport des NPs en onco-radiothérapie s'effectue à plusieurs niveaux, comme résumé sur la figure 19 : **(i) avant et après traitement** : par l'amélioration des moyens diagnostiques et d'imagerie, participant à la médecine personnalisée ; **(ii) pendant le traitement** : en améliorant la délivrance de drogues comme la chimiothérapie ou en ayant elle-même des propriétés thérapeutiques ; en guidant le traitement par l'imagerie.

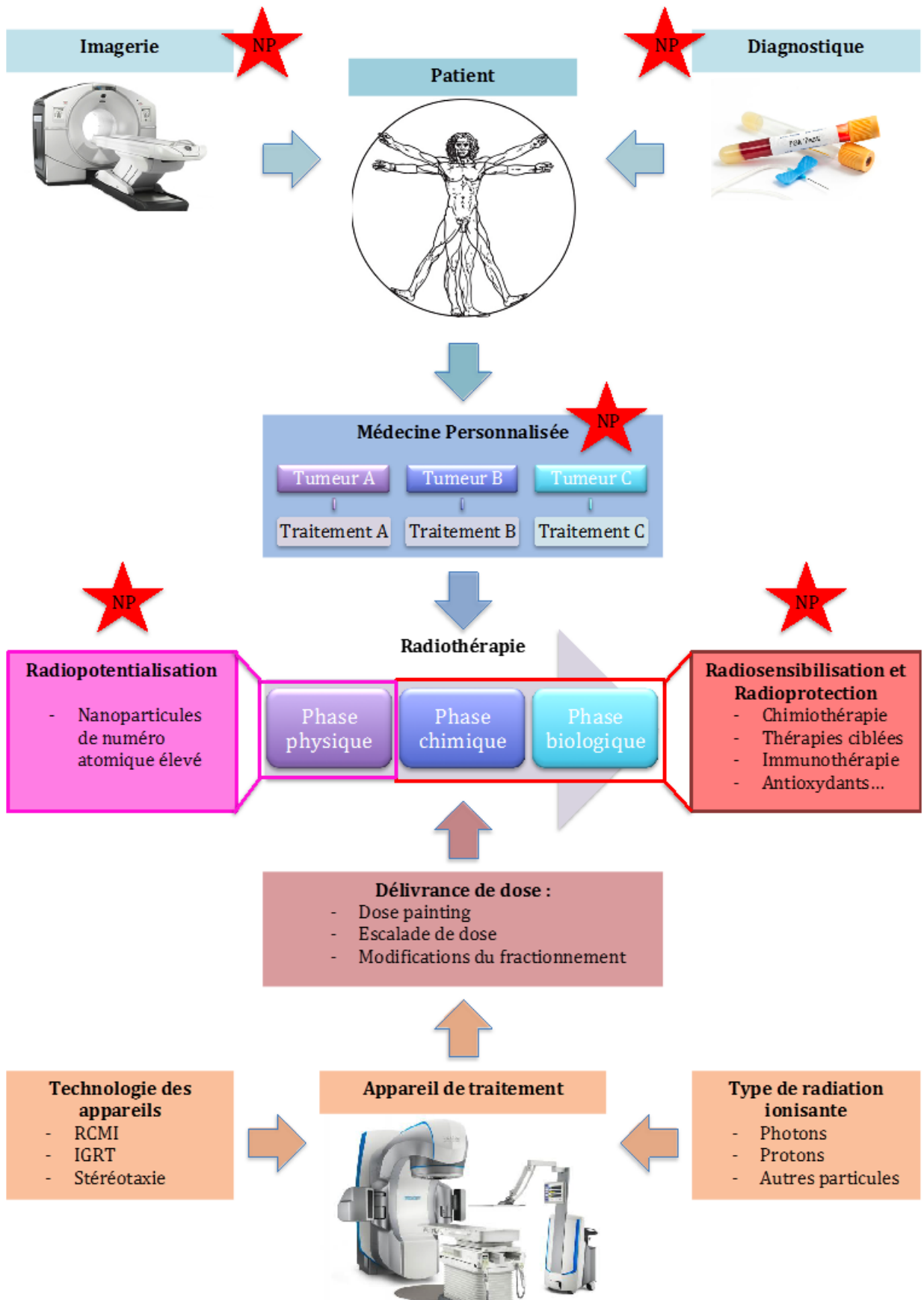


Figure 19 : Développements actuels en radiothérapie et apport des nanoparticules. Les étoiles rouges signalent les contributions potentielles des nanoparticules (NP).

## **3. Nanoparticules à numéro atomique élevé en radiothérapie**

### **3.1 Nanoparticules à numéro atomique élevé : introduction**

Dans cette partie, nous allons évoquer le principe de l'utilisation de *nanoparticules à numéro atomique (Z) élevé* afin d'augmenter le dépôt de dose aux tissus. Nous verrons par la suite que leur mode d'action est toujours sujet à débat.

#### **3.1.1 Numéro atomiques élevés et augmentation de dose : historique**

Le concept d'augmenter la dose absorbée dans un tissu en modifiant sa composition n'est pas nouveau. Dès les années 1950, Spiers *et al.* remarque une augmentation de la dose déposée autour de matériaux présentant un numéro atomique élevé<sup>122</sup>. Cette augmentation de dose locale s'observe également en clinique, notamment lors d'irradiations ORL, où les reconstructions de mandibules par des tiges métalliques causent lors de l'irradiation des brûlures et nécroses des tissus adjacents<sup>123</sup>. Adams *et al.* en 1977, observait que l'injection de produit de contraste iodé lors d'imageries était à l'origine de dommages chromosomiques dans les lymphocytes circulants<sup>124</sup>.

De l'observation à l'application, il n'y a alors qu'un pas à franchir. Matsudaira *et al.*, en 1980, s'en chargea en montrant que l'ajout d'iode à une lignée de cellules leucémiques murines suivie d'une irradiation par des photons de 200 kV améliorait l'efficacité de la radiothérapie<sup>125</sup>. Le principe de la « **radiopotentialisation** » était né. Par la suite, Herold *et al.* en 2000 montra que des microsphères (1,5 – 3 microns) d'or permettent également d'augmenter le dépôt de dose lors d'une irradiation en kV sur des lignées cellulaires en cultures, mais l'application *in-vivo* par injection intra-tumoral chez des souris ne montra pas l'efficacité attendue. Une des raisons avancées est la grande hétérogénéité de distribution des microparticules au sein de la tumeur<sup>126</sup>. L'apport des NPs, de par leur biodistribution avantageuse, peut ainsi être vue comme une des solutions. En 2004, parut l'article *princeps* à la base des recherches actuelles pour la radiopotentialisation par NPs de Z élevé. Ainsi, Hainfeld JF *et al.*, en utilisant des NPs d'or injectées en intraveineux (IV) à des souris ayant subi une greffe hétérotopique de carcinome mammaire, est parvenu à obtenir une radiopotentialisation significative et une augmentation de la durée de la vie des souris après une irradiation (gamme d'énergie de l'ordre du kV)<sup>123</sup>.

### **3.1.2 Principes de base et positionnement dans la stratégie thérapeutique**

L'objectif de l'utilisation de NPs de Z élevé en radiothérapie est donc de permettre une amélioration du ratio thérapeutique, à savoir dans ce cas une augmentation de la dose délivrée à la tumeur sans induire de toxicité supplémentaire sur les tissus sains adjacents. Le but final étant d'améliorer la probabilité de contrôle tumoral (TCP)<sup>22,127,128</sup>.

Pour ce faire, les NPs de Z élevés proposent une nouvelle approche consistant à agir au niveau de la phase physique de l'interaction rayonnement – matière. Leur haute densité électronique permet une augmentation de la probabilité d'interaction avec le rayonnement incident par rapport aux tissus normaux adjacents. Le rôle des NPs est ainsi d'induire un dépôt de dose plus important dans leur environnement direct. En utilisant les propriétés de biodistribution des NPs, une accumulation tumorale préférentielle est espérée afin de créer un différentiel suffisant avec les tissus sains voisins<sup>129,130</sup>.

Cette approche est donc à différencier de la radiosensibilisation utilisée en clinique depuis des années. En effet, les agents radiosensibilisants, *via* leur mode d'action principalement biologique, se positionnent plus tardivement dans l'échelle du temps radiobiologique. Ils présentent également un profil de toxicité pouvant être important, avec des effets systémiques existant même en l'absence de rayonnements ionisants (RI).

Les NPs de Z élevé, produisent théoriquement leur effet lors de la phase physique de l'interaction RI–NPs et sont supposées être inactives en dehors d'une irradiation. Ce caractère « *on/off* » en font un traitement intéressant, leurs actions et toxicités « *off* » pouvant être modulées en modifiant leurs propriétés physico-chimiques. En ajoutant à cela leurs caractéristiques de biodistribution évoquées dans la partie précédente, ces NPs de Z élevées proposent une amélioration spatiale (sélectivité tumorale accrue) et temporelle (effet « *on/off* ») par rapport à des agents radiosensibilisants classiques<sup>22,129–131</sup>.

De par leur mode d'action complètement différent des molécules radiosensibilisantes, nous proposons ici d'utiliser le terme d'action « radiopotentialisante » pour définir toute amélioration de l'effet des rayonnements ionisants sur un processus défini (cytotoxicité, contrôle tumoral, *etc.*) à l'échelle moléculaire, cellulaire, tissulaire ou tumorale, induite par l'utilisation d'un agent agissant au niveau de la phase physique de l'interaction rayonnement ionisant – matière et améliorant de façon quantitative ou qualitative le dépôt de dose local.

### **3.1.3 Postulat physique sous-jacent**

Nous allons ici brièvement introduire les bases physiques de l'interaction RI - NPs de Z élevé, sur lesquelles reposent le principe même de leur utilisation comme agent radiopotentialisant.

Le postulat physique sous-jacent stipule que l'introduction d'un matériau de haut numéro atomique dans un tissu augmente le dépôt de dose local d'un rayonnement ionisant. La probabilité d'interaction d'un photon avec le milieu dépend en effet de deux facteurs principaux : (i) **l'énergie du photon incident**, et (ii) **le numéro atomique des atomes rencontrés**. La probabilité que le photon interagisse en rencontrant un atome *via* un mécanisme physique donné définit la section efficace d'interaction ( $\sigma$ , « *cross section* »).

Comme vu précédemment, lors d'un traitement par radiothérapie, les photons interagissent avec le milieu par deux mécanismes principaux : (i) **l'effet photo-électrique** et (ii) **l'effet Compton** (d'autres mécanismes comme la production de paires ou la diffusion cohérente existent également, respectivement pour les très hautes et très faibles énergies). L'effet photo-électrique prédomine entre 10 et 500 keV, et sa section efficace est proportionnelle à  $Z^5/E^3$ . L'effet Compton prédomine entre 500 keV et 1.02 MeV, sa section efficace est proportionnelle à  $Z/E$ .

L'introduction de NPs de Z élevé induit donc théoriquement une augmentation de la probabilité d'interaction des photons incidents dans le milieu *via* ces deux mécanismes, et ainsi une augmentation du **dépôt local de dose**. Pour exemple, le numéro atomique moyen des tissus humains étant de 7.4, le rapport des probabilités d'interaction d'un photon incident *via* l'effet photoélectrique entre un atome d'or ( $Z=79$ ) et cet hypothétique « atome moyen humain » est de 1217, donc largement en faveur de l'atome d'or. Il est ainsi estimé qu'un ratio d'absorption de l'énergie de près de 160 peut être obtenu pour une énergie proche de 0.1 MeV entre deux tissus théoriques, l'un composé d'atomes d'or, l'autre d'atomes de Z moyen 7.4 (figure 20). La zone d'énergie la plus favorable est par ailleurs celle à laquelle se produit préférentiellement l'effet photoélectrique. Cette observation est à la base de la recherche actuelle sur le potentiel radiopotentialisant des nanoparticules<sup>26,132</sup>.



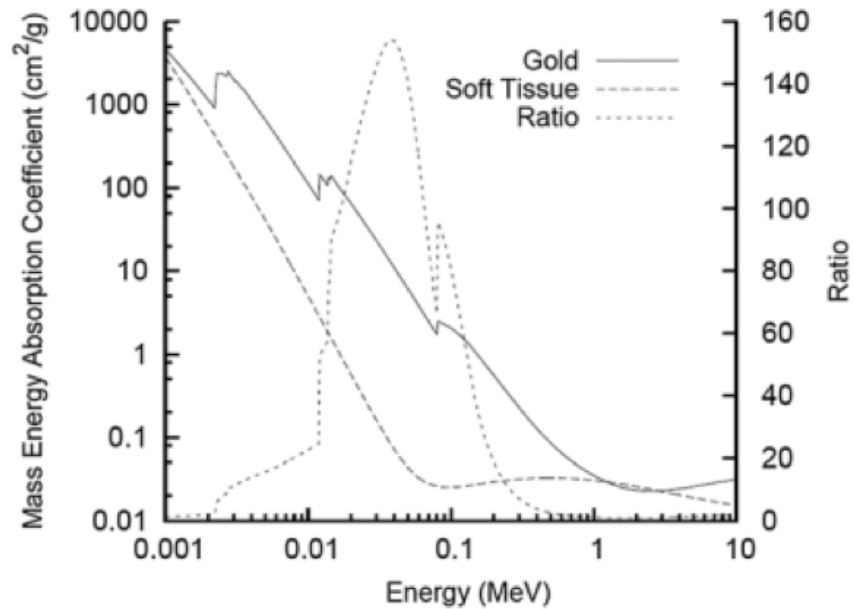
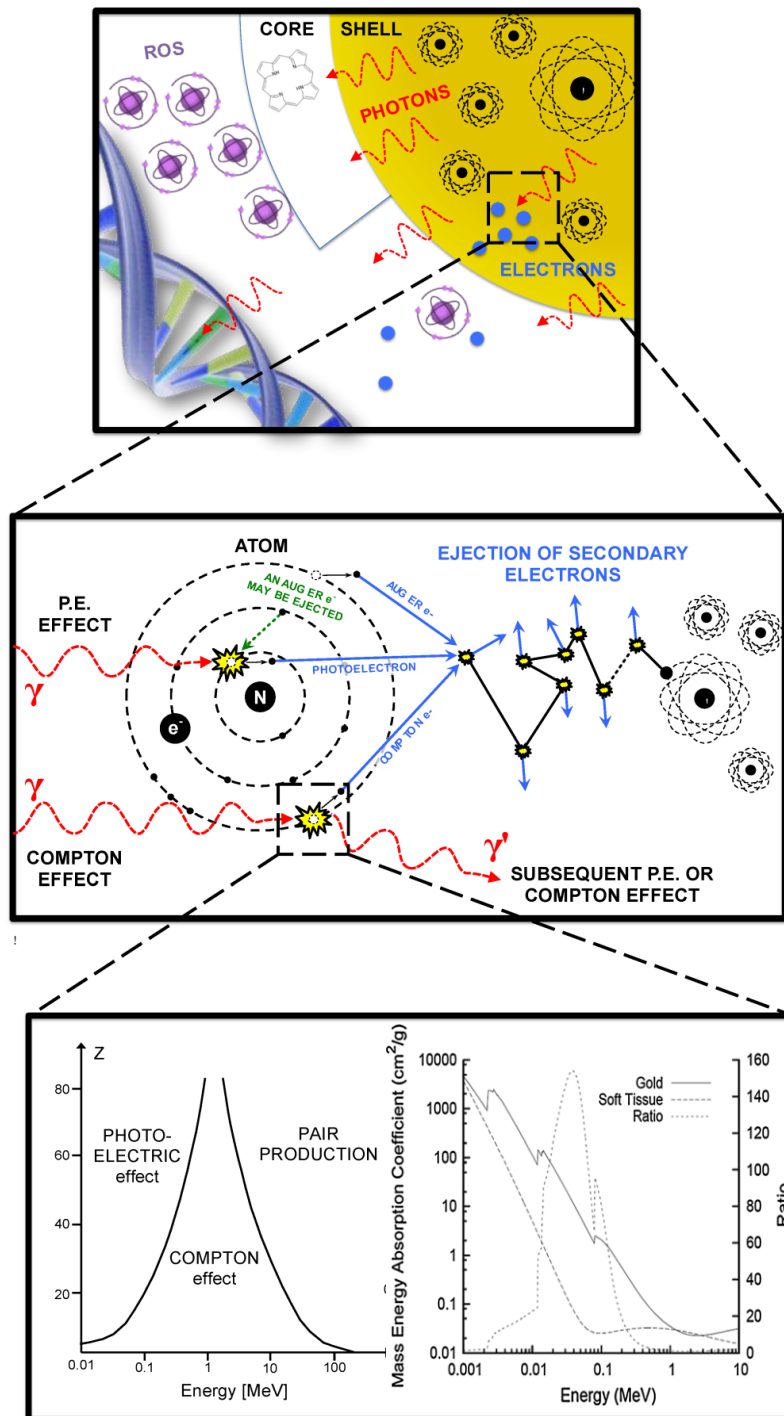


Figure 20: Coefficient d'absorption massique de l'énergie (variante de la cross section, définie ici par unité de masse de tissu traversé) entre les tissus mous et l'or selon l'énergie (en MeV) d'un faisceau de photon X incident. Figure issue de <sup>27</sup>.

Cette augmentation de dépôt de dose, directement en lien avec la probabilité d'interaction du photon avec son milieu, est appelée le « *Dose Enhancement Factor* » (DEF). Il en résulte alors une production d'électrons secondaires (photo-électrons, électrons Auger), de radicaux libres, d'espèces réactives de l'oxygène et de dégâts biologiques responsables d'effets cytotoxiques<sup>15,20,23,24,26,29,133</sup>.

Le principe général du postulat physique expliquant l'effet radiopotentialisant des NPs de Z élevé est résumé dans la figure 21.



**Figure 21:** Principe de l'interaction de photons incidents avec des NPs de Z élevé. La rencontre de photons incidents avec les électrons des atomes de Z élevé mène à des interactions de type effets photo-électrique (PE) et Compton. Il en résulte l'émission d'électrons secondaires et de photons de plus faible énergie responsables de l'ionisation des molécules d'eau, de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et en définitive de dommages aux structures cellulaires comme l'ADN. En bas, on peut voir la probabilité des différents types d'interaction photon – matière selon l'E du photon incident et le Z de l'atome (schéma de gauche). Sur le schéma de droite, une comparaison du coefficient d'absorption massique de l'énergie entre l'or et les tissus mous, avec le ratio de l'absorption en fonction de l'énergie E du photon incident. Figures issues des références <sup>26,29</sup>.

### **3.1.4 Etudes de la « radiopotentialisation » : validation du concept**

Différentes études ont cherché à démontrer le potentiel « radiopotentialisant » de NPs de Z élevé et ont été réalisées en condition *in-vitro* (sur des lignées cellulaires en culture) ou *ex vivo* (après injection et suivi de la croissance de cellules tumorales chez un modèle murin – le plus souvent, des souris « *nude* »).

Dans le cadre des études *in vitro*, l'évaluation de la « radiopotentialisation » des NPs sur la survie cellulaire s'effectue grâce aux tests de survie clonogénique (« *clonogenic assay* »). La « mortalité » cellulaire est ici considérée comme le reflet de la perte de la capacité répliquative. Les cellules irradiées, « contrôles » ou exposées, sont cultivées dans des milieux de culture adaptés. Classiquement, les cellules « contrôles » correspondent à des cellules non exposées aux NPs. Le compte du nombre de colonies formées au bout d'un temps de culture déterminé définit le nombre de cellules viables après le traitement. En multipliant les conditions d'irradiations avec différentes doses testées, des courbes de survie cellulaires en fonction de la dose peuvent alors être obtenues. Ce test est considéré comme étant le « *gold standard* » en radiobiologie. La comparaison des courbes de survie obtenues entre les cellules exposées et les cellules « contrôles » permet alors de déterminer l'efficacité du traitement.

Plusieurs types de mesures existent, pouvant compliquer les comparaisons inter-études<sup>29</sup> :

**Le facteur de modification de dose**, traduit de l'anglais « *Dose Modifying Factor* » (DMF). Il est défini par l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique et représente le rapport entre la dose nécessaire de RI pour produire un effet donné en présence d'un traitement (ici, addition de NPs) et la dose nécessaire de RI pour produire ce même effet sans ce traitement. Par exemple, la DMF peut être déterminée en faisant le ratio, sur 2 courbes de survie (une « contrôle », une expérimentale avec NPs), de la dose nécessaire pour obtenir une fraction de cellule survivante déterminée avec NPs et sans NPs. Si ce ratio est  $<1$ , alors le traitement testé augmente l'efficacité de la radiothérapie. La détermination de la DMF nécessite la construction de courbes de survie à comparer, donc de tester plusieurs doses de rayonnements ionisants. Le principe est illustré par la figure 22.

**Le rapport d'amélioration nano-induit**, traduit de l'anglais « *Nanoparticle-mediated Enhancement Ratio* » (NER) correspond au même principe que le DMF, mais est utilisée quand la comparaison des effets ne s'effectue que sur une seule dose testée. C'est notamment le cas lorsque des études ne mesurent l'effet qu'avec une dose donnée et que les courbes de survie ne sont pas disponibles. Une valeur  $<1$  montre donc une augmentation de l'efficacité des RI par le traitement.

**Le rapport d'amélioration de la sensibilisation**, traduit de l'anglais « *Sensitization Enhancement Ratio* » (SER) représente le rapport entre la dose nécessaire pour produire un

effet donné en absence du traitement (sans NPs) et la dose nécessaire avec traitement (avec NPs). Dans ce cas si le ratio est  $>1$ , l'effet des NPs potentialise celui des RI, car la dose de RI nécessaire avec les NPs est inférieure à celle nécessaire sans NPs pour obtenir le même effet biologique. Le DEF (« *Dose Enhancement Factor* ») suit le même principe. Ce sont donc des corollaires de l'*efficacité biologique relative* (EBR), classiquement utilisé pour comparer l'effet biologique de différents types de rayonnements ionisants.

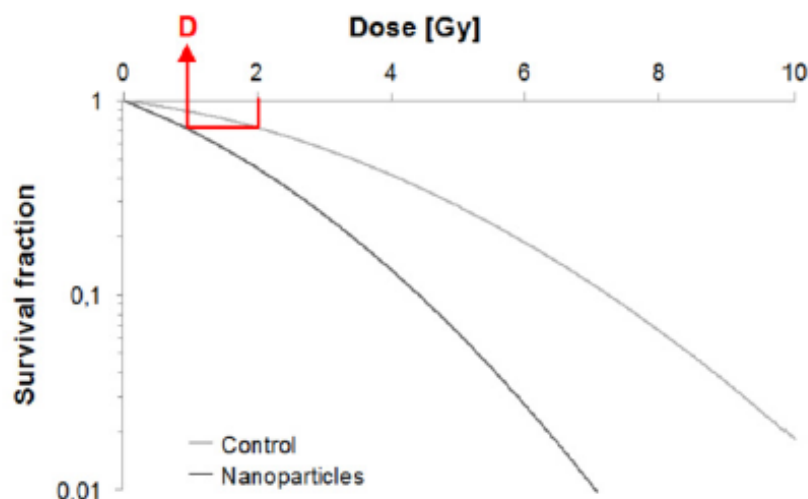


Figure 22 : Deux courbes de survie cellulaires fictives (survie logarithmique en fonction de la dose). La DMF peut être facilement mesurée ici. La fraction cellulaire survivante à 2 Gy est déterminée sur la courbe « contrôle » et la dose nécessaire avec les NPs pour obtenir la même fraction cellulaire survivante est déterminée sur la courbe « expérimentale ». Le ratio de la dose « expérimentale » par la dose « contrôle » (2 Gy) est ici de 0,5 en faveur d'une efficacité des NPs. Figure issue de <sup>29</sup>.

Dans le cadre des études *ex-vivo*, des greffes hétérotopiques ou orthotopiques de cellules tumorales sont réalisées sur des modèles murins. Les modes d'injection des NPs utilisées dans ces différentes études sont réalisées par voies : **(i)** intraveineuse, **(ii)** intra-tumorale, ou **(iii)** intra-péritonéale (plus rarement). L'analyse biologique porte sur plusieurs et différents paramètres selon les études comme la survie des animaux, la croissance tumorale, la taille tumorale à un temps donné, la survie clonogénique des cellules tumorales excisées puis cultivées *in-vitro*, etc.

Ces différentes études reposent également sur l'utilisation de différents types cellulaires, de milieux de culture, de type de NPs (composition, taille et distribution en taille, forme, propriétés de surface, fonctionnalisation, etc.), de l'expression de la concentration des NPS (exprimée en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , en  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , en nombre, en quantité massique ou molaire du métal employé, etc.), de l'énergie des rayonnements ionisants utilisés (keV ou MeV), de source de rayonnement ionisants (accélérateur médical avec un faisceau multi-énergétique, accélérateur dit « de paillasse », microfaisceaux de particules chargées, etc.), de la dose administrée et des schémas

d'administration (dose unique et importante, dose « clinique », fractionnement)... Au final, la multiplicité des schémas expérimentaux et des tests menés, avec des valeurs difficilement comparables, rendent très difficiles la généralisation d'un résultat expérimental à l'ensemble des NPs<sup>29</sup>.

Malgré ces limites dans la comparaison des études, de très nombreuses études ont été menées et permettent de suggérer le potentiel « radiopotentialisant » des NPs de Z élevé. Près de la moitié des études menées ont été réalisées avec des NPs d'or (Au, Z=79). Ce matériau présente l'avantage d'être biocompatible (sous sa forme macroscopique)<sup>134</sup>. D'autres NPs ont été étudiées comme les NPs d'oxyde d'hafnium (HfO<sub>2</sub>), d'oxyde de gadolinium (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), d'argent (Ag), de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), ou encore de germanium, de cérium, d'oxyde de zinc (ZnO), de bismuth, de platine...<sup>129,135,136</sup>

Afin d'illustrer ces expériences, nous allons rapporter les résultats de trois d'entre elles, réalisées avec trois types de NPs: NPs d'or, NPs d'oxyde de titane et NPs d'oxyde d'hafnium.

La première étude, historique dans le domaine, menée par Hainfeld JF *et al.* est parue dans la revue « *Phys. Med. Biol.* » en 2004<sup>123</sup>. Les NPs étudiées sont des NPs d'or de 1.9 nm. Le modèle tumoral est une lignée cellulaire de carcinome mammaire EMT-6, injecté en sous-cutanée dans le flanc de souris « *nude* » immunodéprimées. Après une semaine de croissance tumorale, les souris ont été traitées par injection de NPs d'or par voie intraveineuse suivie d'une irradiation. Les doses de NPs injectées étaient de 1.35 g d'or par kg pour un groupe, de 2.7 g d'or par kg de poids de souris pour un autre groupe, et de 0 pour le groupe contrôle. L'irradiation tumorale était réalisée 2 minutes après l'injection par un accélérateur de 250 kV et une dose unique de 30 ou de 26 Gy a été délivrée.

Les souris irradiées à 30 Gy ont été suivies pendant 1 mois puis sacrifiées. L'analyse du volume tumoral des souris injectées avec la solution à 1.35 g.kg<sup>-1</sup> a montré que l'association irradiation et NPs induit une très importante diminution du volume tumoral avec la plupart de ces souris qui ne présentent plus de tumeur viable (figure 23). Ce qui n'est pas le cas pour les autres groupes.

Les souris irradiées à la dose de 26 Gy ont été suivies pendant une année. Les souris n'ayant pas eu de radiothérapie, ou des NPs sans radiothérapie, sont toutes décédées en 2 semaines. La figure 23 montre également que la radiothérapie seule permet à 22% des souris de survivre à un an. En revanche, l'association radiothérapie – NPs permet à une plus grande proportion de souris injectées avec une dose de 1.35 g.kg<sup>-1</sup> ou 2.7 g.kg<sup>-1</sup> de survivre une année (50% et 86%, respectivement).

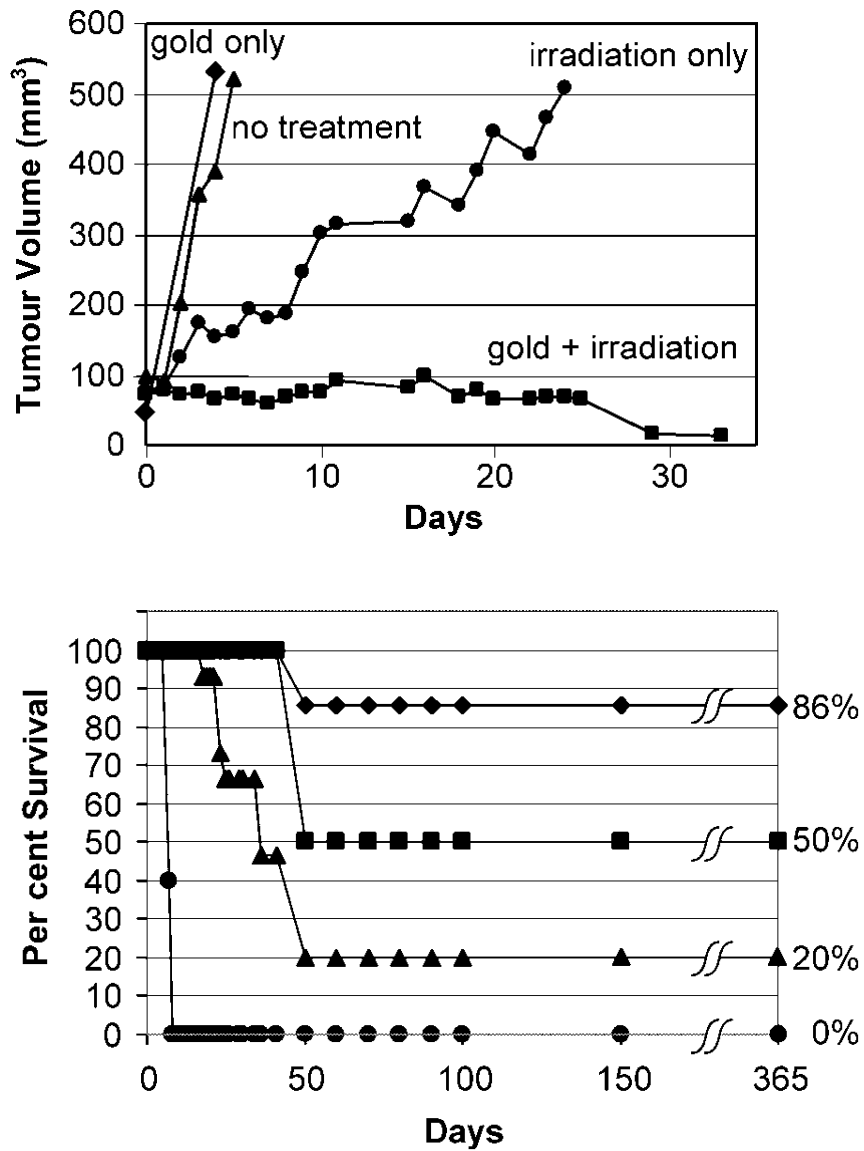
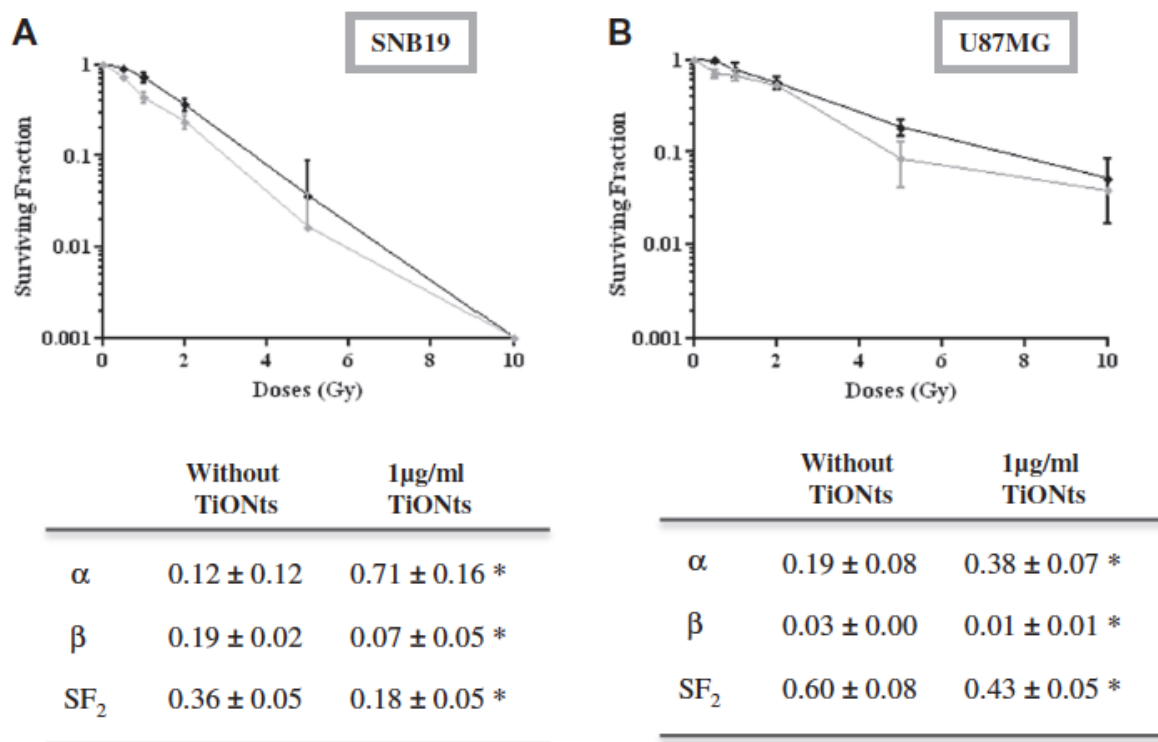


Figure 23: Hainfeld *et al.* 2004<sup>123</sup>. *Figure du haut* : Volume tumoral sur 1 mois. Dose de NPs : 1.35 g.kg<sup>-1</sup>. Irradiation de 30 Gy en 250 kV. Une très nette diminution du volume tumoral à 1 mois dans le groupe RI – NPs est observée par comparaison aux autres groupes. *Figure du bas* : **Survie des souris en fonction du temps**. L'injection de NPs avant l'irradiation augmente de façon significative la survie des souris. ●: pas de traitement (n=17) et NPs seules (1.35 g.kg<sup>-1</sup>, n=4, non distinguable du groupe sans traitement) ; ▲: Irradiation seule (26 Gy à 250 kVp) ; ■: Irradiation – NPs 1.35 g d'or par kg (n=4) ; ◆: Irradiation – NPs 2.7 g d'or par kg (n=7).

La seconde étude *in vitro* concerne les travaux de Mirjolet C. *et al.* et parue dans la revue « *Radiotherapy and Oncology* » en 2013<sup>137</sup>. Les NPs étudiées sont des nanofeuillets d'oxyde de titane de 10 nm de diamètre pour quelques centaines de nm de long. Les lignées cellulaires utilisées sont deux lignées de glioblastomes humains (SNB-19 et U87MG). A l'exception de la condition « contrôle », les deux lignées cellulaires ont été exposées à une concentration de NPs de 1 µg.mL<sup>-1</sup> et irradiées à l'aide de photons de 6 MV avec des doses de : 0.5, 1, 2, 5 et 10 Gy, respectivement. Irradiation réalisée à l'aide un accélérateur médical linéaire de type CLINAC600 (énergie nominale des photons : 6 MV).

L'analyse des fractions cellulaires survivantes à 2 Gy montre une diminution des cellules viables en présence de NPs (figure 24). L'analyse des courbes de survie, extrapolées à l'aide du modèle linéaire quadratique, montre que cette « radiopotentialisation » impacte principalement le paramètre  $\alpha$  (représentatif des événements « directement létaux ») et semble faire diminuer le paramètre  $\beta$  (représentatif des événements « secondairement létaux »).



**Figure 24:** Étude de Mirjolet C. *et al*<sup>137</sup>. *En haut* : Les courbes de survie des lignées SNB19 (A) et U87MG (B) avec NPs (courbes grises) ou sans NPs (courbes noires), montrant un effet potentialisant des NPs sur l'irradiation. *En bas* : Valeurs des paramètres  $\alpha$ ,  $\beta$  et de la fraction survivante à 2 Gy (moyenne et déviations standards) obtenues *via* une analyse par le modèle linéaire quadratique des courbes de survie. Le traitement par NPs diminue la SF<sub>2</sub> et le paramètre  $\beta$ , et augmente le paramètre  $\alpha$ .

Le troisième exemple est une étude réalisée par Maggiorella L. *et al.*, parue dans la revue « *Future Oncol.* » en 2012 et à la base du développement des *NBTXR3*<sup>®</sup>, actuellement en essais cliniques<sup>138</sup>. Ces NPs sont composées d'un cœur d'oxyde d'hafnium recouvert d'un agent biocompatible et sont sphériques avec un diamètre hydrodynamique de 50 nm. Plusieurs types cellulaires étaient analysés, en particulier les lignées HT1080 (fibrosarcome humain) et HCT116 (cancer colorectal humain). Des xénogreffes tumorales ont été obtenues en injectant ces lignées cellulaires dans les flancs de souris immunodéprimées. Une fois une taille tumorale suffisante atteinte, une dose d'une solution de *NBTXR3*<sup>®</sup> à 64 g.L<sup>-1</sup> a été injectée par voie intratumorale.

Les souris xéno greffées avec la lignée HT1080 ont été irradiées 24h après l'injection à des doses de 0, 4 et 8 Gy *via* une source de  $^{60}\text{Cobalt}$  (irradiation  $\gamma$ ). Immédiatement après irradiation, ces souris ont été sacrifiées et la xéno greffe excisée afin de permettre leur culture *in vitro* et d'effectuer un test de survie clonogénique. Les auteurs parlent d'un test de survie clonogénique dit *in vivo/in vitro*.

Les souris xéno greffées avec la lignée HCT116 ont été irradiées à l'aide d'une source d' $^{192}\text{Iridium}$ , un important émetteur de rayons  $\gamma$ , à différentes énergies comprises entre 0.2 et 0.6 MeV. Les irradiations ont été réalisées soit avec une dose unique de 8 Gy à 24h de l'injection, soit en deux doses de 4 Gy à 24h et 48h de l'injection. Les souris ont été ensuite suivies pour une évaluation *in-vivo/ex-vivo*.

Concernant l'analyse *in-vivo/in-vitro* de la lignée HT1080, les auteurs mettent en évidence un DEF de l'ordre de 1,5 à 4 Gy et 8 Gy. Ils ne mettent par ailleurs pas en évidence de toxicité des NBTXR3 dans le groupe non irradié vis à vis du groupe « contrôle ».

Pour l'analyse *in-vivo/ex-vivo* de la lignée HCT116, les auteurs mettent en évidence une diminution significative du temps de croissance tumoral avec les NPs, et même des réponses tumorales complètes, comparativement aux conditions sans NPs ou « contrôle ». Ces meilleurs taux de contrôle tumoral se concrétisent par la suite en une amélioration significative de la survie globale des souris traitées dans le groupe NPs-RI vis-à-vis des autres groupes. Ces résultats sont illustrés par la figure 25.



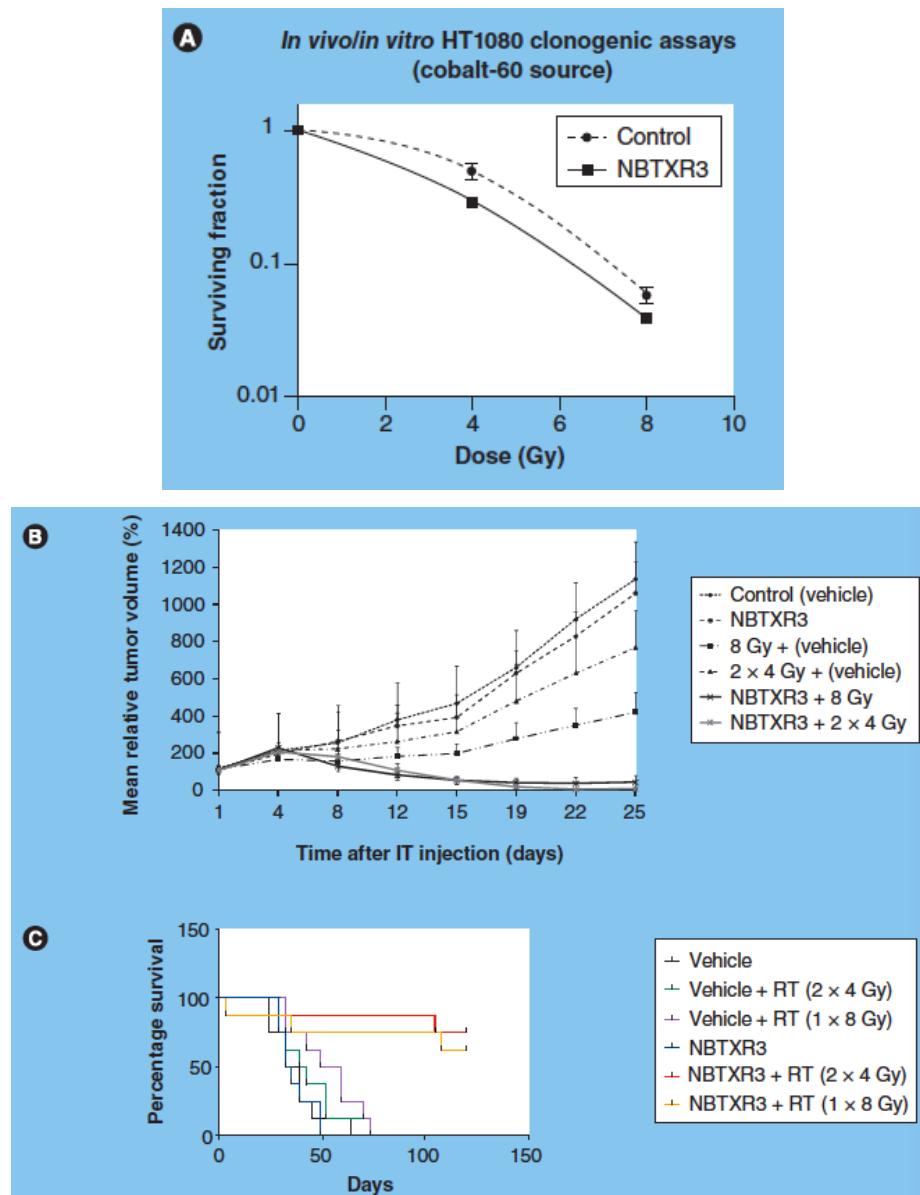


Figure 25 : Étude de Maggiorella C *et al.*, 2012<sup>138</sup>. En A, courbe de survie de l'analyse *in-vivo/ex-vivo* avec HT1080. En pointillés la condition contrôle, en trait plein avec NBTXR3®. En B et C, analyse *in-vivo/ex-vivo* avec HCT116. B : taille tumorale relative en % du volume initial selon le temps, avec une bonne réponse pour les conditions avec NBTXR3®. En C : Courbe de survie des différents groupes de souris. Les conditions avec NBTXR3 et RI (courbes rouge et jaune) montrent de meilleurs résultats.

Ces différentes études tendent à montrer un effet « radiopotentialisant » des NPs de numéro atomique élevé en combinaison avec de la radiothérapie, que ce soit en conditions *in-vitro* ou *in-vivo*. Dans une revue parue en 2014 dans « *BioImpacts* », Babaei M. *et al.* estime que 6 facteurs clés sont impliqués dans le potentiel « radiopotentialisant » de ces NPs, en plus du matériau de base utilisé<sup>136</sup>. Ces facteurs sont liés aux NPs, aux milieux biologiques ou encore aux conditions expérimentales.

**Parmi les facteurs liés aux NPs**, on retrouve la taille (équilibre entre clairance et internalisation cellulaire, avec une taille optimale pour les NPs d'or estimée aux alentours de 50 nm) et les propriétés de surface (notamment les différentes modifications surfaciques modifiant leur comportement comme un ciblage actif ou un revêtement par un matériau biocompatible).

**Parmi les facteurs liés aux milieux biologiques**, on retrouve le type de lignée cellulaire utilisée (dont les paramètres biologiques propres influencent l'efficacité du traitement) et la localisation intracellulaire de ces NPs, considérée plus efficace qu'une accumulation extracellulaire. Cette localisation intracellulaire est aussi dépendante du type cellulaire et des propriétés intrinsèques des NPs considérées.

Enfin, **parmi les facteurs liés aux conditions expérimentales** se retrouvent **(i)** la concentration de NPs utilisée (très variable selon les études et représentative de la quantité d'atomes de haut Z introduits dans le milieu), **(ii)** les niveaux d'énergie des RI utilisés de l'ordre du KeV et favorisant l'effet photoélectrique et **(iii)** la dose de rayonnements ionisants délivrée (gamme de doses et fractionnements utilisées varient selon les études).

Le tableau 2 présente une liste – non exhaustive – des études *in-vitro* et *in-vivo* réalisées avec des combinaisons de NPs (principalement d'or) et d'irradiation par faisceaux de photons. Selon le type de NPs (taille, fonctionnalisation), les concentrations, les modèles cellulaires et le type d'irradiation, de grandes variations peuvent être notées, ce qui influence les résultats observés.

**Tableau 2 : liste non exhaustive des études de radiopotentialisation par NPs de Z élevé (or principalement) et faisceaux de photons. Tableau issu de <sup>24</sup> et complété par <sup>26,29,137,138</sup>.**

Référence	Expérience	Type de NPs	Taille NPs	Concentration	Cellules	Energie/source	Résultats
<b>Bobyk, 2013</b>	<i>In-vitro</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm 15 nm	10 mg d'or/mL	F98 (Gliome)	50 keV, 6 Gy	SER 10% : 1,92 (1,9 nm) 1,4 (15 nm)
<b>Butterworth, 2010</b>	<i>in-vitro</i>	Or	1,9 nm	0,24 – 2,4 µM	AGO-1552B Astro DU-145 L132 MCF-7 MDA-MB-231 PC-3 T98G	160 kVp	DEF : 1,97 0,96 0,81 0,87 1,09 1,11 1,02 1,91
<b>Chattopadhyay, 2013</b>	<i>in-vitro</i>	Or, ciblage HER2	30 nm	2,4 mg/mL	MDA-MB-361	100 kVp	DEF : 1,6 ciblage HER2 1,3 sans ciblage
<b>Chen, 2015</b>	<i>in-vitro</i>	Or	28 nm	36 µg/mL	U87	160 kVp	DEF : 1,37
<b>Chithrani, 2010</b>	<i>in-vitro</i>	Or	14 nm 50 nm 74 nm	7 x 10 <sup>9</sup> NPs/mL	HeLa	105 kVp 220 kVp 662 keV (137-Cs) 6MVp	DEF : 1,66 1,43 1,18 1,17
<b>Coulter, 2012</b>	<i>in-vitro</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	12 µM (500µg/mL)	MDA-MDB-231 DU145 L132	160 kVp	DEF : 1,8 (MDA-MB-231)
<b>Cui, 2014</b>	<i>in-vitro</i>	Or	2,7 nm	0,5 mg/mL	MDA-MB-231	255 kVp	DEF 1,04 – 1,44
<b>Geng, 2011</b>	<i>in-vitro</i>	Or	14 nm	1,25 – 2,5 – 5 nM	SK-OV-3	90 kVp 6 MV	DEF : 1,44 1,3 – 1,37
<b>Jain, 2014</b>	<i>in-vitro</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	12 µM (500µg/mL)	MDA-MB-231	160 kVp	DEF : 1,41
<b>Jain, 2011</b>	<i>in-vitro</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	12 µM (500µg/mL)	MDA-MB-231 L132 DU145	160 kVp 6 MV 15 MV	DEF : 1,41 1,29 1,16 (MDA-MB-231)
<b>Joh, 2013</b>	<i>in-vitro</i>	Or	12 nm	1 mM	U251	150 kVp	DEF : 1,3
<b>Kaur, 2013</b>	<i>in-vitro</i>	Or	5-9 nm	5,5 µmol/mL	HeLa	Cobalt-60	DEF 1,52
<b>Khoshgard, 2014</b>	<i>in-vitro</i>	Or, ciblage Folates	47-52 nm	50 µM	HeLa	Cobalt-60	DEF : 1,64 (ciblage) 1, 35 (sans ciblage)

<b>Kong, 2008</b>	<i>in-vitro</i>	Or	10,8 nm	15 µM	MCF-7	200 kVp 662 keV (137-Cs) Cobalt-60	DEF : 1,3 – 1,6
<b>Liu, 2010</b>	<i>in-vitro</i>	Or	6,1 nm	0,4 – 1 mM	EMT-6 CT26	6,5 keV 8,048 keV 160 kVp 6 MeV	Diminution du taux de survie de 2 à 45%
<b>Liu, 2008</b>	<i>in-vitro</i>	Or	4,7 nm	500 µM	CT26	6 MV	DEF : 1,33 – 1,59
<b>Liu, 2015</b>	<i>in-vitro</i>	Or	14,8 nm	1,5 – 15 µg.mL <sup>-1</sup>	HeLa	50 kVp	DEF : 1,14 – 2,88
<b>Rahman, 2009</b>	<i>in-vitro</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	0,25 – 0,5 – 1 mM	BAEC	80 kVp 150 kVp 6 MeV 12 MeV	DEF : 20 1,4 2,9 3,7 (0,5 mM)
<b>Roa, 2009</b>	<i>in-vitro</i>	Or	10,8 nm	15 nM	DU-145	662 keV (137-Cs)	DEF : 1,24 – 1,38
<b>Taggart, 2014</b>	<i>in-vitro</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	12 µM (500 µg.mL <sup>-1</sup> )	MDA-MB-231 T98G DU-145	225 kVp	DEF : 1,17 – 1,23 1,35 – 1,90 1,01 – 1,1
<b>Wang, 2013</b>	<i>in-vitro</i>	Or	13 nm	20 nM	A549	6 MV	DEF : 1,49
<b>Wang, 2015</b>	<i>in-vitro</i>	Or	16 nm 49 nm	20 nM	MDA-MDB-231	6 MV	DEF : 1,49 (16 nm) 1,86 (49 nm)
<b>Wolfe, 2015</b>	<i>in-vitro</i>	Or, ciblage Gosereline	31 x 9 nm	Densité optique 0,3	PC3	6 MV	DEF : 1,36 (ciblage) 1,19 (sans ciblage)
<b>Zhang, 2008</b>	<i>in-vitro</i>	Or	30 nm	15 nM	DU-145	200 kVp	DEF > 1,3
<b>Zhang, 2012</b>	<i>in-vitro</i>	Or	4,8 nm 12,1 nm 27,3 nm 46,6 nm	0,05 mM	HeLa	662 keV (137-Cs)	DEF : 1,42 (4,8 nm, à 20 nM) 1,65 (12,1 nm, à 20 nM) 1,58 (21,3nm, à 20 nM) 1,42 (46,6 nm, à 20 nM)
<b>Zhang, 2014</b>	<i>in-vitro</i>	Or	< 2 nm	50 µg.mL <sup>-1</sup>	HeLa	662 keV (137-Cs)	DEF : 1,21 – 1,3
<b>Bobyk, 2013</b>	<i>in-vitro</i>	Or (AuroVist)	15 nm	5 µL à 25 ou 50 mg.mL <sup>-1</sup> d'or	F98 (Gliome)	88 keV, 15 Gy	Survie moyenne : 33 jours RT seule vs 41,6 jours RT + NPs (50 mg d'or/mL)
<b>Chattopadhyay, 2013</b>	<i>in-vitro</i>	Or, ciblage HER2	30 nm	Intra-tumoral, 0,8 mg d'or (4,8 mg.g <sup>-1</sup> tumeur)	MDA-MB-361	100 kVp, 11 Gy	Inhibition de la croissance tumorale (46% vs 16%)
<b>Chen, 2015</b>	<i>in-vitro</i>	Or	28 nm	Intraveineux 1,3 mg.mL <sup>-1</sup> (250µL)	U87	160 kVp : 3 Gy 2h post injection puis 2 Gy à 24h	Régression tumorale

<b>Hainfeld, 2004</b>	<i>in-vivo</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	Intraveineux 1,35 g.kg <sup>-1</sup> 2,7 g.kg <sup>-1</sup>	EMT-6	250 kVp, 26 Gy	1,35 g/kg : 50% de survie à 1 an 2,7g/kg : 86% de survie à 1 an
<b>Hainfeld, 2010</b>	<i>in-vivo</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	Intraveineux 1,9 g.kg <sup>-1</sup>	SCCVII	68 keV 42Gy 157 keV 50,6 Gy	Augmentation survie médiane 53 vs 76 jours à 68 keV 31 vs 49 jours à 157 keV
<b>Hainfeld, 2013</b>	<i>in-vivo</i>	Or (AuroVist)	1,9 nm	Intraveineux 4 g.kg <sup>-1</sup>	Tu-2449	100 kVp, 30Gy	50% de survie sans maladie à plus d'1 an
<b>Joh, 2013</b>	<i>in-vivo</i>	Or	12 nm	Intraveineux 1,25 g.kg <sup>-1</sup>	U251	175 kVp, 20 Gy	Augmentation survie médiane 28 jours vs 14 jours
<b>Miladi, 2014</b>	<i>in-vivo</i>	Or, + DTDTPA (+Gadolinium pour Gliosarcome 9L)	6,6 nm	50 µL, 50 mM	Osteosarcome Gliosarcome 9L	Energie moyenne 90keV Microfaisceaux Dose d'entrée à la peau : 400-500Gy pic, 20-25Gy vallée	Augmentation temps de survie médiane : 61 jours vs 42,5 jours (ostéosarcome, injection intra- tumorale) et 129 jours vs 72,5 jours (Gliosarcome, injection IV) vs irradiation seule.
<b>Wolfe, 2015</b>	<i>in-vivo</i>	Or ciblage Gosereline	31 x 9 nm	Intraveineux 100 µL, solution de 40 µM AuNPs	PC3	6 MV	Retard de croissance tumorale de 17 jours (ciblage) ou 3 jours (sans ciblage)
<b>Zhang, 2012</b>	<i>in-vivo</i>	Or	4,8 nm 12,1 nm 27,3 nm 46,6 nm	Intraveineux 4 mg.kg <sup>-1</sup>	HeLa	662 keV (137-Cs)	Inhibition de la croissance tumorale
<b>Zhang, 2014</b>	<i>in-vivo</i>	Or	< 2 nm	Intra-péritonéal 10 mg.kg <sup>-1</sup>	U14	662 keV (137-Cs)	Diminution de la croissance tumorale de 38 à 55%
<b>Maggiorella, 2012</b>	<i>in-vivo/in- vitro</i>	Hafnium (NBTXR3)	50 nm	64 g.L <sup>-1</sup>	HT1080  HCT116	Cobalt 60 LINAC 6MeV Iridium 192	DEF 1,5-1,8 DEF 1,4  Augmentation survie in vivo
<b>Sancey, 2014</b>	<i>in-vivo</i>	Gadolinium (AGuIX)	5 nm	40 µg.g <sup>-1</sup> de rat IV soit 1,4 mL de solution à 49 mM de Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9L Gliosarcome	Microfaisceaux 20 min ou 24h post- injection. Dose d'entrée à la peau : pic 400 Gy, vallée 20Gy	Augmentation médiane de survie d'un facteur 2
<b>Mirjolet, 2013</b>	<i>in-vitro</i>	Nanotubes d'oxyde de titane	10x100 nm	1 µg.mL <sup>-1</sup>	SNB19 U87MG	Clinac 600	Diminution survie à 2 Gy : 0,36 vs 0,18 (SNB19) et 0,60 vs 0,43 (U87MG)

### **3.1.5 Débat actuel**

Les résultats obtenus lors des modélisations et simulations physiques initiales d'augmentation de la dose en présence de NPs et les résultats expérimentaux *in vitro* et *in vivo* sont à l'origine d'un débat autour du potentiel « radiopotentialisant » des NPs de Z élevé. Ce débat s'articule principalement autour de deux axes : **(i)** la faisabilité clinique de cette approche, et **(ii)** les discordances entre les prévisions physiques et les résultats expérimentaux.

#### **3.1.5.1 Applicabilité clinique**

L'applicabilité cliniques des NPs en tant qu'agent « radiopotentialisant » a été remise en question notamment pour deux raisons : **(i)** les doses de NPs nécessaires et **(ii)** l'énergie du faisceau de photon à laquelle l'effet devient significatif.

**Concernant les doses nécessaires de NPs afin d'obtenir un effet « radiopotentialisant » significatif.** Les premières simulations, basées sur les comparaisons des spectres d'absorption de dose selon le Z moyen du milieu, considéraient qu'une concentration intra-tumorale de 0.1 à plus de 1% de NPs rapportée à la masse tumorale devait être obtenue pour permettre une augmentation d'absorption de dose allant de 10% à 2 fois la dose initiale. De telles concentrations, qui peuvent atteindre de fait plusieurs mg de NPs par gramme de tumeur (jusqu'à 7 à 20 mg/g de tumeur selon certains auteurs), paraissent difficilement accessible en clinique<sup>139-142</sup>. Pour comparaison, dans l'article d'Hainfeld *et al.* en 2004, la dose nécessaire est de 2.5 g.kg<sup>-1</sup> de NPs d'or (soit 50 fois plus que la dose efficace de Taxol en clinique, qui est de l'ordre de 50 mg.kg<sup>-1</sup>). Par ailleurs, se baser sur le seul effet EPR afin d'atteindre ces concentrations n'est pas suffisant. Ainsi, l'internalisation et la distribution si possible homogène des NPs au sein du volume tumoral est soumis à tout un ensemble de barrières. Selon une revue de Wilhelm S *et al.* en 2016, l'effet EPR ne permet qu'à environ 0.7% de la dose administrée de NPs d'atteindre effectivement la tumeur<sup>143</sup>. De nombreuses améliorations dans la délivrance des NPs et leur distribution au sein de la tumeur (fonctionnalisation, ciblage...) sont donc nécessaires avant de pouvoir prétendre atteindre de telles concentrations. A défaut, les doses théoriques de NPs à administrer ne semblent pas réalisables cliniquement.

Le second argument concerne **l'énergie des faisceaux de photons** à laquelle cette « radiopotentialisation » devient significative. Si nous nous basons sur les coefficients d'absorption en fonction du numéro atomique (comme vu précédemment sur la figure 23), le ratio d'absorption entre l'or et les tissus mous est maximal pour des énergies de l'ordre du KeV (par absorption photo-électrique principalement) et permet donc une radiopotentialisation

théoriquement significative à ces niveaux d'énergie. En revanche, ce ratio devient très faible pour les énergies de l'ordre du MeV (proche de 1), ce qui ne permet qu'une faible augmentation de l'absorption de dose (de l'ordre du %), et ce en présence de très fortes quantités de NPs. Ainsi, selon Her *et al.*, le DEF obtenu à partir de 7 mg.g<sup>-1</sup> de NPs d'or serait, selon des calculs théoriques par méthode de Monte Carlo, de l'ordre de 2.114 pour une énergie de photons incidents de 140 KV contre 1.007-1.014 si cette énergie est de 6 MV<sup>24</sup>. Ainsi, les doses de NPs nécessaires pour réaliser des irradiations avec des énergies de l'ordre du MeV et obtenir un effet similaire qu'avec des énergies de l'ordre du KeV serait de 300 fois supérieures. Cet argument conduit certains auteurs à conclure à la non applicabilité clinique de cette approche<sup>24,26,139,140,142</sup>.

Dans la pratique clinique actuelle, les faisceaux dans la gamme d'énergie du KeV – de par leur faible pénétration tissulaire – ne sont utilisés que pour des traitements superficiels par radiothérapie externe ou par des sources de curiethérapie. La plupart des traitements de radiothérapie externe sont réalisés avec des faisceaux dont la gamme d'énergie réside dans le MeV afin d'atteindre des tumeurs souvent profondément situées.

Néanmoins, ces évaluations théoriques de l'impact des faisceaux de photons en MeV sur l'absorption énergétique engendrée par les NPs ne sont valables que dans le cas théorique de faisceaux homogènes en énergie (« mono-énergétiques »). Dans la pratique, les faisceaux utilisés sont poly-énergétiques avec une énergie nominale du faisceau (6 MeV, 18 MeV...) qui ne représente que son énergie théorique maximale. De plus, les accélérateurs linéaires actuels permettent de plus en plus de se passer de filtre. Celui-ci a pour objectif de « durcir » le faisceau de photons extrait de la tête de l'accélérateur, en atténuant les faibles énergies et en rendant le spectre énergétique plus homogène en faveur des énergies élevées (ce qui permet de simplifier les calculs et les plans de traitement). Le retrait de ce filtre, constituant les faisceaux FFF (« *Flattening Filter Free* »), rend le spectre à nouveau poly-énergétique (permet d'« adoucir » le faisceau) et permet d'accélérer le temps de traitement en augmentant le débit de dose. Ces nouveaux spectres de photons en « MeV » contiennent ainsi une proportion non négligeables de photons en KeV, proportion encore augmentée au sein du patient par les phénomènes de diffusion et pouvant ainsi atteindre près de 20% des photons à 10 cm de profondeur<sup>29,103</sup>. Ainsi, du fait de leur caractère poly-énergétique, les faisceaux cliniques en MeV pourraient ne pas être aussi « inutiles » que cela dans l'objectif d'une « radiopotentialisation ».

L'applicabilité clinique des NPs est tout de même défendue par plusieurs auteurs, notamment par McMahon SJ *et al.*<sup>140</sup>. En effet, les résultats expérimentaux sont assez différents des prévisions initiales, ce qui donne lieu à la seconde partie de ce débat.

### 3.1.5.2 Discordances entre prévisions physiques et résultats expérimentaux

Si les prévisions physiques initiales ne donnent que peu de chance d'obtenir un effet « radiopotentialisant » significatif pour de faible concentration de NPs et à l'aide d'irradiation à hautes énergies, les résultats expérimentaux tendent quant à eux à montrer le contraire.

Concernant la concentration intra-tumorale de NPs, alors que les prévisions estiment nécessaires des concentrations de NPs de l'ordre de 0.1 à 1% du poids tumoral, les résultats expérimentaux démontrent des effets significatifs à des concentrations bien moins importantes. Ainsi, Jain S. *et al.* montrent en 2011, un DEF de près de 1.4 sur la lignée MDA-MB-231 avec une concentration de NPs d'or de seulement 0.05% de la masse tumorale à 160 kVp, bien supérieur au DEF de 1.05 estimé par les modèles physiques<sup>26,144,145</sup>.

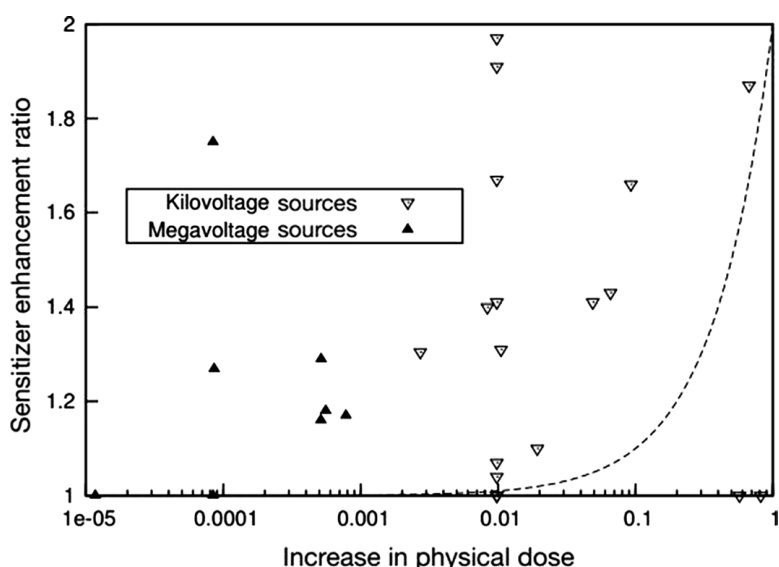


Figure 26 : Comparaison des valeurs de SER prédites et observées pour des NPs d'or et pour des énergies de faisceau de photons incidents de l'ordre du KeV et du MeV. L'augmentation de la dose physique en abscisse correspond au ratio de la dose additionnelle déposée par les Rayons X en présence de NPs d'or par celle qui serait déposée en leur absence. La ligne pointillée représente la tendance que montrerait le SER s'il suivait directement l'augmentation de dose prédite par les modèles de comparaison des coefficients d'absorption de l'énergie. Les triangles représentent des résultats expérimentaux *in-vitro* : le SER est celui mesuré par l'expérience et l'augmentation de dose physique celle calculée par le modèle précédemment cité. On peut voir ici une discordance entre le SER prédit et le SER mesuré expérimentalement. Notamment, on obtient un SER significatif et bien plus important que prévu avec des sources en MeV. Figure issue de la référence<sup>26</sup>.

Concernant l'énergie du faisceau de photon incident, les modèles physiques prédisent un effet maximum pour des énergies de l'ordre du KeV, diminuant progressivement en se rapprochant des énergies de l'ordre du MeV. Cependant, les résultats expérimentaux ne sont pas en accord avec ces prédictions, car le phénomène de « radiopotentialisation » se retrouve également induit



pour des irradiations dans la gamme du MeV. Ainsi, Chithrani *et al.* retrouve pour des NPs d'or, un DEF de 1.66 à 105 kV, de 1.43 à 220 kV et de 1.17 à 6 MV<sup>146</sup>. Bien qu'une diminution de l'efficacité à hautes énergies soit décrite, ces observations sont bien supérieures aux prédictions, ce qui suggère une efficacité potentielle de cette approche même lors d'irradiations à 6 MV. La figure 26 donne un aperçu des disparités entre prévisions physiques et résultats expérimentaux<sup>23,24,27,140,147</sup>.

Néanmoins, les faisceaux de photons cliniques de 6 MeV possèdent un spectre poly-énergétique. Ces faisceaux étant la plupart du temps ceux employés lors des études *in vitro*, il est ainsi possible d'expliquer en partie l'effet « radiopotentialisant » par la composition en énergie de ces spectres. Ce spectre énergétique est relativement similaire entre deux accélérateurs cliniques, ce qui peut également expliquer que les DEF observées lors d'irradiations en MeV soient plus similaires entre elles que celles observées lors d'irradiations réalisées à différentes énergies dans la gamme du KeV ou par des irradiateurs de « paille »<sup>29</sup>. Par ailleurs, la « radiopotentialisation » ne semble pas dépendre que de l'énergie ou de la concentration en NPs. Comme évoqué précédemment par Babaei M. *et al.*, il faut aussi prendre en compte le type cellulaire et les spécificités des NPs considérées<sup>136,140</sup>. Le tableau 3 résume les différences décrites entre prédictions (modèles physiques) et effets expérimentaux observés *in vitro* en fonction du type cellulaire, de l'énergie du rayonnement ionisant, du type/concentration des NPs.

**Tableau 3 : comparaison des résultats expérimentaux et des augmentations de doses prédites par les coefficients d'atténuation énergétiques, les concentrations de NPs d'or et l'énergie de la source de photons, pour une sélection d'études In Vitro. Tableau issu de la référence <sup>27</sup>.**

Référence	Type de NPs	Taille NPs	Concentration	Cellules	Energie/source	Augmentation de dose prédite	SER/DEF expérimental
<b>Geng, 2011</b>	Or « coating » GLU	14 nm	5 nM	SK-OV-3	90 kVp	1,002	1,3
					6 MV	1,00009	1,2
<b>Jain, 2011</b>	Or « coating » Thiol	1,9 nm AuroVist)	12 µM 500µg.mL <sup>-1</sup>	DU145	160 kVp	1,05	< 1,41
				MDA-MDB-231	6 MV	1,0005	< 1,29
				L132	15 MV	1,0005	1,16
<b>Chithrani, 2010</b>	Or « coating » Citrate	14 nm	1 nM (7 x 10 <sup>9</sup> NPs / mL)	HeLa	220 kVp	1,09	1,17 – 1,6
		74 nm 50 nm			662 keV (137-Cs)	1,0006	
<b>Lui, 2010</b>	Or « coating » PEG	6,1 nm	1 mM	CT26	160 kVp	1,02	1,1
				EMT-6	6 MV	1,002	1
<b>Butterworth, 2010</b>	Or « coating » Thiol	1,9 nm (AuroVist)	0,24 – 2,4 µM	DU-145	160 kVp	1,01	< 1
				MDA-MB-231		1,01	< 1,67
				AG0-1522		1,01	< 1,97
				Astro		1,01	< 1,04
				L132		1,01	< 1
				T98G		1,01	< 1,91
				MCF-7 PC-3		1,01 1,01	< 1,41 < 1,07
<b>Kong, 2008</b>	Or « coating » GLU et AET	10,8 nm	15 µM	MCF-7	220 kVp	1,01	1,3
				MCF-10A	662 keV (137-Cs)	1,00008	1,6
					1,2 MV	1,00001	
<b>Rahman, 2009</b>	Or « coating » Thiol	1,9 nm (Aurovist)	0,25–0,5-1 mM	BAEC	80 kV	6,6	20
					150 kV	5,2	1,4
<b>Roa, 2009</b>	Or « coating » GLU	10,8 nm	15 nM	DU-145	662 keV (137-Cs)	1,00008	> 1,5
<b>Zhang, 2008</b>	Or, « coating » GLU et TGS	30 nm	15 nM	DU-145	200 kVp	1,0083	> 1,3 – 1,5

Ces discordances soulèvent donc des questions sur le mode d'action des NPs. Il semble, au vu des résultats, que l'augmentation de la dose absorbée, qui est souvent associée à un effet biologique, ne peut ici prédire de façon adéquate l'effet « radiopotentialisant » des NPs de haut Z.

**A partir de ce constat, deux attitudes peuvent se dégager et nous nous devons de considérer que soit : (i) l'effet physique, toujours à la base de l'efficacité des NPs, n'est pas bien analysé, soit que (ii) les effets « radiopotentialisants » des NPs ne sont pas exclusivement d'origine physique.**

En faveur de la première hypothèse, l'analyse des courbes de survie cellulaire en présence et en absence de NPs montre que la présence de NPs induit une augmentation du paramètre  $\alpha$ , et une diminution du paramètre  $\beta$ . Cet effet est encore plus contrasté lorsque la concentration de NPs augmente. Ces modifications sont résumées dans le tableau 4 extrait de l'article de McMahon SJ *et al.* et suggèrent que les événements directement létaux (représentés par le paramètre  $\alpha$ ) sont plus fréquents en présence de NPs. Ces mêmes modifications se retrouvent avec l'utilisation de particules dites « lourdes » comme avec les ions carbonés. Ces particules possèdent un haut Transfert Linéique d'Énergie (TLE), responsable le long de la trace de la particule de dommages ADN complexes non ou difficilement réparables. Ces dommages ADN induisent une mort cellulaire, représentée comme une mortalité par un événement directement létaux. Ainsi, le paramètre  $\alpha$  tend à augmenter avec le TLE, alors que le paramètre  $\beta$ , représentatif des dommages secondairement létaux par accumulation de dommages non réparés, en semble indépendant. La résultante est pour ces particules une EBR plus élevée que pour les photons<sup>131,140,148</sup>.

Les modifications du paramètre  $\alpha$  retrouvées en présence de NPs semblent ainsi signifier que ceux-ci ne modifient pas que la « quantité » de dose absorbée, mais également sa « qualité ». Le profil du dépôt de dose, peut correspondre de façon imagée à une « *modification du TLE dans l'environnement direct de la NPs* ». Ainsi, les modèles physiques employés pour prévoir l'effet « radiopotentialisant » des NPs ne sont peut-être pas adaptés ou sont imparfaits. La plupart de ces modèles optent en effet pour une approche dite « macroscopique », sans tenir compte de l'inhomogénéité du dépôt de dose à l'échelle micrométrique<sup>25</sup>. Ces différentes approches seront analysées dans les chapitres à suivre.

**Tableau 4 :** EBR (RBE) adaptées des résultats expérimentaux de Chithani et al. et de Jain S *et al.*, et paramètres des courbes de survie en fonction de l'énergie de la source et de la présence ou non de NPs. Les cellules et NPs employées sont décrites dans les tableaux 2 et 3. Concentrations massiques de NPs : Jain 0,05%, Chithrani 0,001%. L'effet selon les sources d'énergie est quantifié en  $EBR = 2/DAu$  ou  $DAu$  est la dose nécessaire en présence de NPs d'or pour obtenir la même fraction survivante à 2 Gy qu'en absence de NPs. On retrouve un effet des NPs même en MeV, avec une différence par rapport aux KeV moins importante que prévue par les modèles physiques. On remarque qu'en présence de NPs (Au), le paramètre alpha a tendance à augmenter, alors que le paramètre beta reste globalement stable. Tableau issu de la référence <sup>140</sup>.

Source energy	$\alpha$	$\beta$	$\alpha_{Au}$	$\beta_{Au}$	RBE	
105 kVp	$0.237 \pm 0.005$	$0.041 \pm 0.002$	$0.528 \pm 0.007$	$0.054 \pm 0.003$	$1.84 \pm 0.07$	Chithrani <i>et al</i> (2010)
220 kVp	$0.150 \pm 0.004$	$0.041 \pm 0.001$	$0.352 \pm 0.005$	$0.041 \pm 0.002$	$1.72 \pm 0.05$	
6 MV	$0.110 \pm 0.008$	$0.029 \pm 0.002$	$0.191 \pm 0.002$	$0.031 \pm 0.001$	$1.40 \pm 0.06$	
160 kVp	$0.019 \pm 0.025$	$0.052 \pm 0.007$	$0.091 \pm 0.031$	$0.093 \pm 0.011$	$1.65 \pm 0.07$	Jain <i>et al</i> (2010)
6 MV	$0.002 \pm 0.022$	$0.079 \pm 0.007$	$0.104 \pm 0.04$	$0.098 \pm 0.011$	$1.48 \pm 0.06$	

Néanmoins, les résultats discordants selon les études et les questions soulevées sur la possibilité d'utiliser ou non le *Modèle Linéaire Quadratique* pour rendre compte de l'effet des rayonnements ionisants en présence de NPs compliquent l'analyse de leur effet physique<sup>29</sup>.

Ainsi, leur mode d'action est remis en question. D'un effet purement physique, les NPs pourraient également avoir des effets chimiques ou biologiques intrinsèques, qui expliqueraient les discordances de résultats entre les prévisions physiques et les expériences. Citons pour exemple, les études contradictoires concernant les dommages ADN en présence de NPs. Alors qu'une augmentation des dommages ADN en présence de NPs est décrite dans l'étude de Chithrani *et al.* en 2010, une étude réalisée par Jain S. *et al.* en 2011 ne détecte pas cette augmentation bien que soit reportée une augmentation de l'efficacité de l'irradiation<sup>144,146</sup>.

Ainsi, l'effet « radiopotentialisant » des NPs ne semble pas s'expliquer par la seule augmentation de la dose, ni par la simple et unique modification du profil de dépôt de dose. Le rôle des actions biochimique et/ou biologique des NPs pourrait donc contribuer à cet effet « radiopotentialisant ». Ainsi, il peut être supposé une action chimique possible des NPs lors de la formation radio-induite d'espèces radicalaires (ROS), ou encore des effets biologiques variés comme l'induction de stress oxydant, de modifications de l'homéostasie cellulaire et/ou des perturbations de la réparation de l'ADN, ...<sup>22,135,147,149</sup>.

En conclusion, il apparaît que l'action des NPs de Z élevé ne suit pas aussi strictement les modèles prédictifs et théoriques initialement proposés. Si cela peut s'expliquer par des modélisations/simulations physiques inadaptées (qui ne prennent notamment pas en compte les modifications du dépôt de dose autour de la NPs), il semble également que ces dernières

possèdent des actions chimiques et/ou biologiques potentielles associées à leur effet anti-tumoral. Ces différents mode d'action des NPs, à savoir physiques, chimiques et biologiques, font l'objet des chapitres suivants, et sont résumés de façon succincte dans la figure 27<sup>15,24,27</sup>.

A partir de ces hypothèses, se pose alors une nouvelle question. Car si depuis le début de ce manuscrit, nous parlons de « radiopotentialisation » afin de respecter le postulat initial du développement des NPs, ce terme est-il le bon pour définir leur effet ? Dans notre définition de la « **radiopotentialisation** », nous avons volontairement mis l'accent sur le fait que cet effet était purement physique, afin de le différencier d'une « **radiosensibilisation** » et de mettre en avant ce qui constitue la théorie initiale des NPs de Z élevé en combinaison avec la radiothérapie. A la lumière des développements précédent se pose donc cette question : « *les NPs de Z élevé : radiopotentialisation, radiosensibilisation, ou un peu des deux ?* »

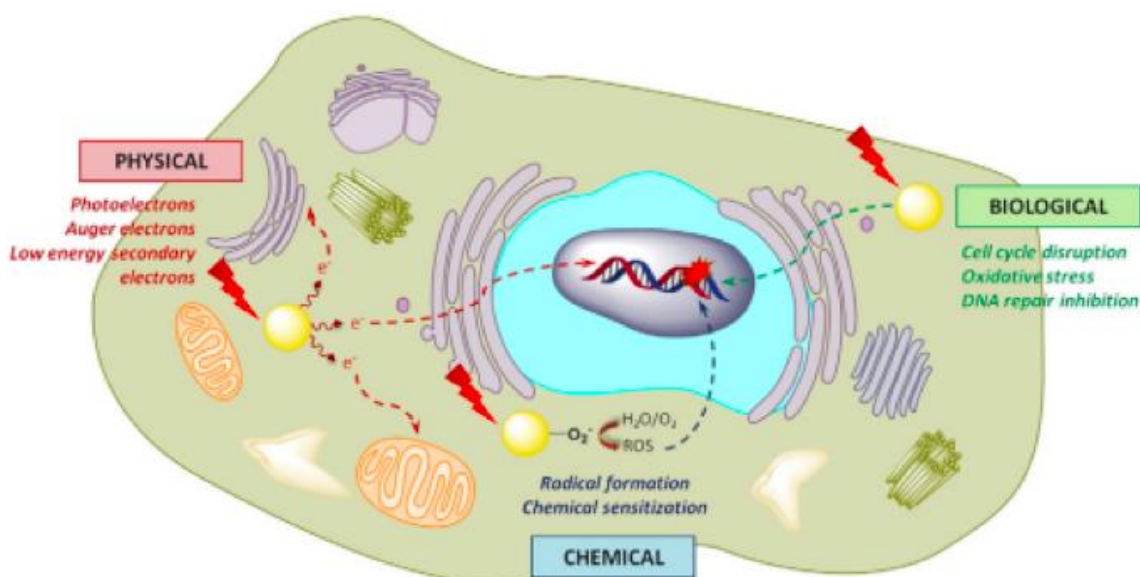


Figure 27 : Mécanismes d'action des NPs en présence de rayonnements ionisants. En plus de la phase physique initialement proposées, les NPs pourraient également avoir un effet au travers des phases chimique et biologique, rompant avec le principe de pure « radiopotentialisation » et montrant de possibles propriétés de « radiosensibilisation ». Figure issue de la référence <sup>24</sup>.

## **3.2 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Physique**

Dans cette partie, nous allons décrire les conséquences de l'introduction de NPs de Z élevé sur les interactions RI – tissu cible et les approches pour quantifier leur impact sur le dépôt de dose.

### **3.2.1 Débat autour des interactions RI-NPs**

Comme vu précédemment sur la figure 23, l'introduction de NPs de Z élevé au sein d'un tissu induit une augmentation probabiliste des interactions du faisceau de photon dans la matière, notamment *via* l'effet photo-électrique. Une augmentation significative du taux d'interaction photoélectrique signifie donc la création de plus d'électrons secondaires et l'absorption d'une dose plus importante. Mais cette augmentation du dépôt de dose doit être analysée plus finement que comme une augmentation « globale » de la dose. En effet, les électrons secondaires créés par effet photoélectrique peuvent être des photoélectrons, ou des électrons Auger. Comme vu précédemment, l'énergie de ces électrons, leur parcours dans le milieu et donc la trace de leur dépôt de dose dans la matière sont très différents :

**L'énergie des photoélectrons** est directement dépendante de l'énergie du photon incident, elle est ainsi souvent élevée. Leur parcours dans la matière peut être grand, de plusieurs centaines de  $\mu\text{m}^{23}$ . Leur dépôt de dose s'effectue donc à distance de leur lieu d'émission.

**L'énergie des électrons Auger** est indépendante de l'énergie du photon incident, elle dépend du différentiel énergétique entre les différentes orbitales atomiques amenant à son émission. Cette énergie peut varier de quelques eV à quelques dizaines de keV: elle induit un parcours dans la matière très court, avec un dépôt de dose s'effectuant principalement dans les 250 nm autour de leur point d'émission<sup>103</sup>.

Toute une partie du débat actuel sur les aspects physiques de l'augmentation du dépôt de dose par les NPs repose justement sur l'importance des électrons Auger dans ce processus. La probabilité de création d'un effet Auger dépend non seulement de la probabilité d'apparition d'un effet photoélectrique, mais également du Z du matériel, cette probabilité diminuant à mesure que le Z augmente (favorisant alors l'émission d'un photon de fluorescence). De plus, leur très court trajet dans la matière signifie également qu'une grande proportion de ces électrons Auger peuvent être absorbés par la nanoparticule même dont ils sont originaires, et ainsi ne pas participer au dépôt de dose. Les simulations dosimétriques de leur participation au dépôt de dose sont ainsi, selon les auteurs, discordantes<sup>29</sup>.

La création de nombreux électrons Auger de faible parcours, lors d'un événement ionisant entre un photon et une NP, se traduit par une augmentation potentiellement très importante de la dose

déposée dans la proximité immédiate (quelques nm) de la nanoparticule. Ainsi, McMahon *et al.*, en étudiant le dépôt de dose à l'échelle nanométrique au tour des NPs, estime ainsi qu'un seul évènement ionisant issu d'une interaction RI - NP peut conduire à un dépôt de dose de l'ordre de plusieurs milliers de Gy dans les 50 nm autour de la NP<sup>25</sup>. Une telle augmentation de dose aussi localisée, et les dommages complexes qu'elle peut induire, va dans le sens de l'augmentation du paramètre  $\alpha$  montré précédemment en présence de NPs, réalisant une modification de la « qualité » du rayonnement, en augmentant le TLE dans la proximité immédiate de la NP.

On se rend ainsi compte qu'une augmentation de dépôt de dose qui serait dominé par un tel effet, impliquant une forte inhomogénéité de distribution de la dose par des électrons dont l'énergie est indépendante de celle du photon incident, ne peut être analysée efficacement par une simple comparaison des coefficients d'absorption de masse, comme cela était fait précédemment : la modélisation dosimétrique de l'impact des NPs de Z élevé nécessite donc des modèles dédiés, prenant en compte l'ensemble de ces phénomènes<sup>25</sup>.

Dans la partie suivante, nous allons ainsi expliquer les différences entre les deux principaux modèles d'évaluation dosimétrique de l'impact des NPs de Z élevé : le modèle macroscopique et le modèle microscopique.

### **3.2.2 Quantification de l'augmentation de dose**

Deux approches distinctes ont été employées afin d'évaluer l'augmentation de dose médiée par les NPs : l'approche **macroscopique**, et l'approche **microscopique**.

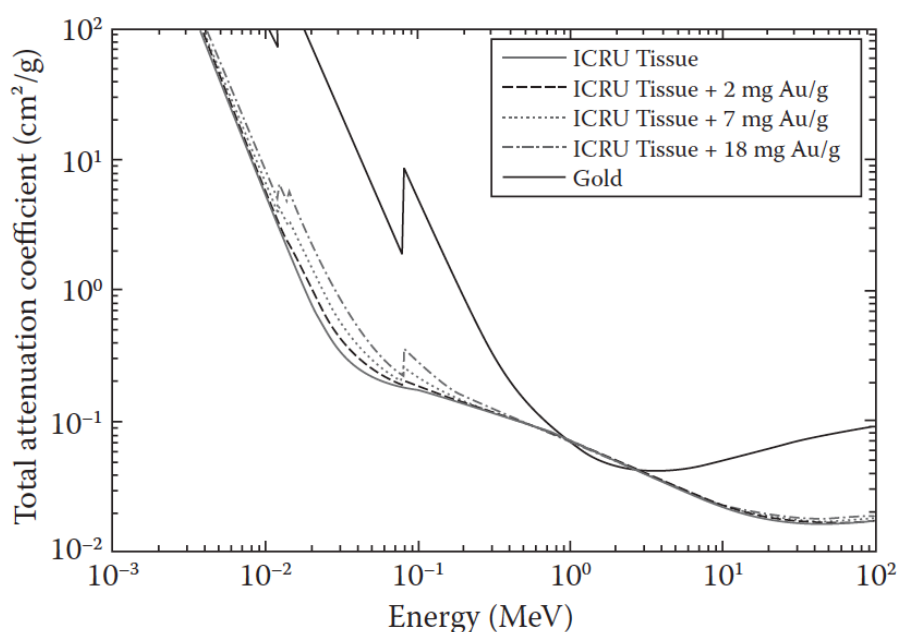
L'approche **macroscopique** se définit comme une mesure de l'augmentation moyenne de la dose déposée au sein d'un volume (la tumeur, par exemple) contenant une concentration de NPs de répartition considérée uniforme au sein du volume.

L'approche **microscopique** se définit comme une estimation du dépôt de dose à l'échelle nano- ou micrométrique, dont les modèles les plus développés tendent à prendre en compte des situations plus réalistes comme la distribution hétérogène des NPs au sein de la cellule et la participation localisée des électrons de faible énergie à ce dépôt de dose<sup>22</sup>.

#### **3.2.2.1 Approche dite « macroscopique »**

L'approche macroscopique cherche à évaluer l'augmentation moyenne de la dose due à la présence de NPs dans un tissu considéré : le **facteur d'augmentation macroscopique de la dose** traduit de l'anglais « *Macroscopic Dose Enhancement Factor* » (MDEF). Ce facteur se définit par le rapport entre la dose moyenne déposée par une irradiation dans le tissu considéré calculée avec et sans la présence de NPs.

Cette approche assume une distribution uniforme des NPs au sein du tissu, ce qui peut être interprété comme une absence d'interface physique entre les NPs et le milieu biologique. On obtient ainsi le modèle dit de la « *mixture uniforme* », qui se définit par une modélisation du tissu comme une mixture intégrant des atomes de haut Z, à une certaine concentration massique, distribués de façon homogène au sein d'un milieu. Le milieu utilisé est dans ce cas un milieu validé par le Comité International des Unités et Mesures Radiologiques (ICRU) et dont la composition est standardisée. Par exemple, le modèle ICRU 1989 donne pour un tissu donné la composition suivante : 10.1% (v/v) d'hydrogène, 11.1 % (v/v), de carbone, 2.6 % (v/v) d'azote et 76.2 % (v/v) d'oxygène. L'intégration d'une certaine quantité de NPs, donc d'atome de haut Z, se traduit ici par une variation des pourcentages des autres éléments dans le tissu, ainsi que par une mise à l'échelle de la densité tissulaire (dont la valeur standard ICRU est de  $1 \text{ g.cm}^{-3}$ ). On peut ainsi obtenir des tissus homogènes variant uniquement par la concentration massique de NPs d'un certain type, donc par leur quantité d'atome de haut Z. Il n'y a plus par la suite qu'à comparer les sections efficaces ( $\sigma$ ) de ces différents tissus pour évaluer l'impact d'une certaine concentration massique de NPs sur le dépôt de dose, comme montré sur la figure 28 (qui se rapproche dans le principe de la figure 20)<sup>22,150</sup>.



**Figure 28 :** Comparaison des sections efficaces pour une irradiation par photons de différentes énergies pour un tissu ICRU standard chargé de doses croissantes d'atomes d'or (en mg d'or par g de tissu), et pour un tissu composé uniquement d'atomes d'or. Une augmentation des interactions avec l'or est observée dans la zone énergétique de l'effet photoélectrique principalement, mais également une augmentation (plus faible) pour les hautes énergies (10 MeV et plus) par production de paires. Figure issue de <sup>22</sup>.



Une autre approche utilisant le modèle de la « *mixture uniforme* » consiste à calculer le dépôt de dose par des modélisations Monte Carlo. L'approche Monte Carlo se définit par une simulation probabiliste, événement par événement et pas à pas, des interactions du rayonnement ionisant au sein d'un volume selon les atomes rencontrés sur son parcours et les sections efficaces qui s'y rattachent pour les différents types d'interactions physiques. La modélisation des différentes particules secondaires générées par ces interactions, et de leurs propres interactions successives, à différents niveaux de précision selon les codes Monte Carlo employés, permet de calculer le dépôt de dose. La comparaison des résultats obtenus peut se faire en faisant varier l'énergie des photons incidents ou la concentration massique de NPs. Parmi les codes Monte Carlo utilisés, on peut citer les codes PENELOPE, GEANT4 et GEANT4DNA, EGSnrc/BEAMnrc, MCNP5/MCNPX...<sup>22,23,129</sup>

L'évaluation de cette MDEF par simulation Monte Carlo donne au sein de la littérature des résultats assez similaires, notamment pour les NPs d'or. Aux énergies de l'ordre du KeV, le dépôt de dose peut être doublé si les concentrations massiques intra-tissulaires de NPs d'or sont de l'ordre de 0.1 à 1%, soit de l'ordre de quelques mg d'or par g de tumeur. A l'échelle du MeV en revanche, avec l'approche macroscopique, il n'est généralement pas ou peu retrouvé d'augmentation significative du dépôt de dose. La taille des NPs a également un impact selon ces modélisations, une taille plus importante (donc une quantité d'atomes de haut Z plus élevée) induisant un MDEF supérieur<sup>22,25-27,129,151</sup>.

Le tableau 5 compare les MDEF d'un tissu tumoral hypothétique avec plusieurs concentrations croissantes de NPs d'or, à différentes énergies d'irradiation par faisceaux de photons. Le code Monte Carlo utilisé pour cette approche est le code BEAMnrc/DOSXYZnrc. Une forte dépendance du MDEF à la concentration de NPs et à la dose peut être observée (effet principal en kVp, peu d'effets en MV). Les faisceaux de photon modélisés étaient ceux de LINAC cliniques pour les énergies MV, avec ou sans filtre<sup>22</sup>.

**Tableau 5 : MDEF sur un volume tumoral théorique avec différentes concentration intra-tumorales de NPs d'or (Au, en mg par g de tumeur), à différentes énergies d'irradiation par faisceaux de photon. En MV, modélisation d'un faisceau clinique de LINAC, avec filtre (FF) ou sans filtre atténuateur (NFF). Tableau issu de <sup>22</sup>.**

Concentration (per g tumor)	140 kVp	250 kVp	6 MV FF	6 MV NFF	4 MV FF	4 MV NFF
7 mg Au	2.114	1.632	1.007	1.014	1.009	1.019
18 mg Au	3.811	2.622	1.015	1.032	1.019	1.044
30 mg Au	5.601	3.682	1.025	1.053	1.032	1.074

Si cette approche macroscopique donne un bon aperçu de l'augmentation globale du dépôt d'énergie au sein d'un volume *via* la présence de NPs, ses prédictions ne correspondent pas aux résultats expérimentaux<sup>26</sup>. Elle néglige en effet deux facteurs fondamentaux : (i) la distribution particulière des NPs au sein des cellules et des tissus irradiés, et (ii) l'inhomogénéité du dépôt de dose autour des NPs<sup>152</sup>. La répartition des NPs au sein d'un volume tissulaire, et au sein même d'une cellule, est loin d'être homogène. La biodistribution des NPS est soumise à plusieurs facteurs, comme l'effet EPR, le ciblage actif ou passif, la constitution d'une *corona*... aboutissant en une distribution hétérogène au sein du volume tumoral avec la formation d'agrégats de NPs dans ou hors des cellules cibles<sup>22</sup>.

De plus, si cette approche permet de bien comparer les probabilités d'interaction selon les énergies considérées, elle omet de prendre en compte les différences de profil de dépôt de dose des différentes particules secondaires produites.

A l'échelle du kV, le dépôt d'énergie total en présence de NPs est dominé par l'effet photoélectrique et notamment par la production de photoélectrons.

A l'échelle du MV, le dépôt total est principalement dominé par l'effet Compton et les nombreux électrons secondaires issus de cette interaction, ainsi que par des photoélectrons issus de l'effet photoélectrique. Mais si l'on s'intéresse plutôt au dépôt de dose dans la proximité immédiate de la NPs, ce sont les électrons Auger qui dominent, tant à l'échelle du kV qu'à l'échelle du MV. Si leur quantité influe moins sur la dose totale que celle des photoélectrons, leur absorption très localisée induit un fort dépôt de dose dans la proximité immédiate des NPs, alors que les photoélectrons de haute énergie « diluent » leur dépôt dans un volume bien plus important. Ceci induit une inhomogénéité de dépôt de dose conséquente, non prise en compte dans le modèle macroscopique<sup>150</sup>.

Cette différence entre effet prédit par l'approche macroscopique et effet observé par l'expérience peut en partie s'expliquer par ce manque de prise en compte des hétérogénéités de dépôt de dose. Il faut ainsi distinguer ici l'augmentation globale du dépôt de dose de l'effet biologique attendu, et trouver une nouvelle approche afin d'expliquer les effets observés : soit une approche physique comme l'approche microscopique, soit l'intégration d'effets chimiques et/ou biologiques intrinsèques aux NPs, comme cela sera développé dans une prochaine partie<sup>22,26,27,150</sup>.

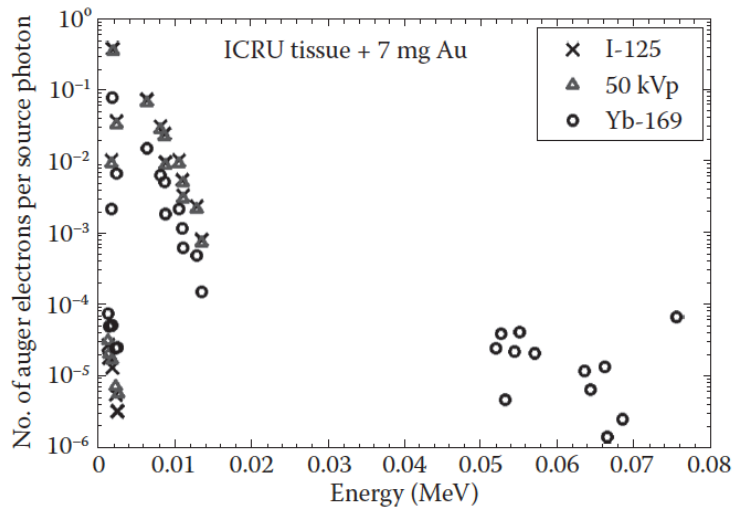
### **3.2.2.2 Approche dite « microscopique »**

L'approche microscopique part du principe que l'effet des rayonnements ionisants sur un tissu ne dépend pas que de la dose absorbée, mais également de la façon dont s'effectue le dépôt de dose au niveau microscopique. Une telle approche a déjà démontré son intérêt dans la compréhension du dépôt de dose de particules chargées dites « lourdes » comme les ions

carbones, dont la « trace » de dépôt de dose, autrement dit le transfert linéique d'énergie (TLE- le transfert moyen d'énergie par unité de longueur le long du parcours de la particule) est à l'origine d'une efficacité biologique relative plus importante. Cette distribution inhomogène de la dose est à l'origine de dépôts de dose localisés très importants, résultant en des dommages complexes non réparables et fortement létaux<sup>22,27</sup>. Si les photons ne possèdent en eux même pas un haut TLE, l'ajout de NPs au milieu peut induire une modification du profil de dépôt de dose *via* la création de nombreux électrons secondaires de faible énergie (principalement des électrons Auger), résultant en une augmentation potentiellement très importante de la dose autour des NPs. De ce fait, on produit une « augmentation artificielle du TLE » autour des NPs. Il devient ainsi nécessaire, pour évaluer les effets des NPs, de modéliser l'augmentation du dépôt de dose et sa distribution spatiale. C'est ce que propose l'approche microscopique<sup>22</sup>.

Cette approche nécessite trois principales étapes : **(i)** une modélisation du spectre des électrons secondaires produits par l'interaction d'un rayonnement ionisant avec un tissu chargé de NPs, **(ii)** l'analyse micrométrique de l'augmentation de dose autour des NPs et au sein du volume, puis **(iii)** une estimation de l'effet biologique attendu *via* des modèles prédictifs.

**La première étape** consiste à modéliser le spectre des électrons produits par l'interaction du rayonnement ionisant avec le tissu chargé de NPs. Donc à analyser la quantité et la qualité (type, énergie) des électrons produits *via* les différentes interactions physiques possibles. Les électrons secondaires étant responsables du dépôt de dose, connaître leurs caractéristiques est essentiel. La figure 29 montre par exemple le spectre de production d'électrons Auger résultant des interactions entre un rayonnement par trois sources différentes de photons et un tissu contenant des NPs d'or. Le nombre et l'énergie des électrons Auger ainsi produits dépendent de l'énergie du faisceau incident et du Z de l'atome rencontré. Cette production Auger est en compétition avec l'émission de photons de fluorescence lorsque le Z augmente, les NPs qui produisent le plus d'électrons Auger ne sont donc pas nécessairement celles possédant le plus haut Z<sup>22,150</sup>.



**Figure 29 :** spectre des électrons Auger produits dans une tumeur de 3x3x3 cm, irradiée par des sources de 50 kVp,  $^{125}\text{I}$  et  $^{169}\text{Yb}$  situées au centre de la tumeur. Le tissu est chargé de NPs d'or à 7 mg/g de tissu. Figure issue de la référence <sup>22</sup>.

**La seconde étape** consiste à analyser le dépôt de dose microscopique dans l'environnement des NPs, considérées comme point source des électrons secondaires. Plusieurs codes Monte Carlo, développés par différentes équipes, sont adaptés à ce type de microdosimétrie, comme GEANT4-DNA<sup>153</sup>. La modélisation du parcours des électrons secondaires à partir de leur point d'émission à la surface ou dans la profondeur de la NPs permet ainsi de calculer des mDEF (*microscopic dose enhancement factor*, version micrométrique du MDEF) autour des NPs. Ces modélisations peuvent être effectuées au sein de modèles cellulaires théoriques de différents niveaux de complexité. L'apport de la microscopie confocale ou d'autres méthodes de micro-analyse chimique multi-élémentaire comme la PIXE<sup>154</sup> permettent de reconstituer des architectures et des compositions cellulaires réalistes, notamment concernant la répartition des NPs au sein des cellules<sup>155</sup>.

La figure 30 montre la modélisation de la trace des électrons secondaires issus de l'interaction d'un photon incident avec une NPs, et le dépôt de dose théorique autour des NPs induit par une ionisation. On remarque que le dépôt de dose dans la proximité immédiate de la NPs, induit par l'émission de nombreux électrons de faible énergie lors d'une même ionisation (notamment par effet Auger), peut être extrêmement important, de l'ordre de milliers de Gy. Il est donc aisé de comprendre l'importance potentielle d'un tel dépôt sur la survie cellulaire si une structure clé comme l'ADN se trouve à proximité des NPs. Un tel dépôt de dose peut être à l'origine de dommages complexes non réparables, de façon similaire à ceux produits par un rayonnement de haut TLE. De par sa proximité immédiate des NPs, se pose en conséquence la question de l'importance de la localisation subcellulaire des NPs <sup>22,27,139,156</sup>.

Il est aussi important de souligner que les électrons secondaires produits à l'intérieur de la NP peuvent interagir directement avec les NPs, et ne pas déposer leur énergie dans le milieu environnant. Les interactions à la surface des NPs sont donc celles produisant le plus de dépôt de dose autour des NPs. Cette analyse démontre ici l'importance de ces modélisations numériques lors du développement des NPs. Ainsi, la taille et le volume des NPs ont une importance car le rapport surface/volume est inversement proportionnelle à la taille et doit être pris en considération dans la recherche d'une efficacité optimale. Les données « microdosimétriques » obtenues par une analyse microscopique vont donc à l'encontre des données issues de l'analyse macroscopique, plutôt en faveur de NPs de taille importante<sup>157</sup>.

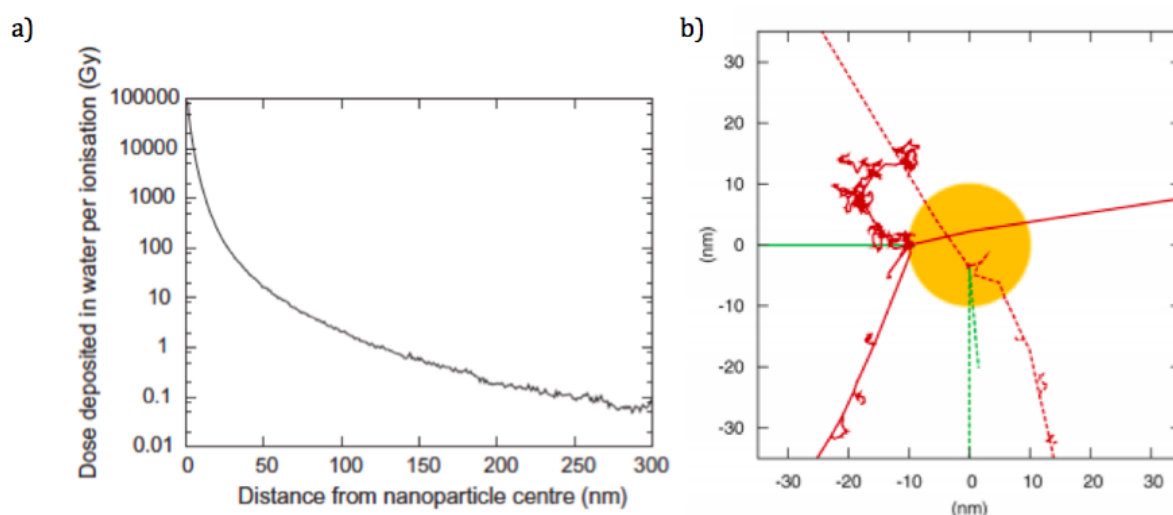


Figure 30 : a) Dose radiale moyenne déposée après un seul événement ionisant par une irradiation LINAC de 6 MV sur une NP d'or de 2 nm. La dose est exprimée en couches concentriques centrées sur la NP. La création potentielle de nombreux électrons secondaires de faible énergie par un seul événement ionisant induit le dépôt de très fortes doses autour de la NP et une distribution de dose très inhomogène. b) Modélisation de la trace des événements ionisants induits par l'irradiation d'une NP d'or de 20 nm par une source de photons de 50 keV. Le photon incident est en vert, les électrons secondaires et leur parcours sont en rouge. Les événements ionisants à la surface de la NP sont en traits pleins, et dans la NP en trait pointillés. Ceux ayant lieu en profondeur sont pour la plupart stoppés dans la NP, alors que ceux ayant lieu à la surface sont à l'origine de très nombreux électrons secondaires de faible énergie résultant en un dépôt de dose très dense dans la proximité immédiate de la NP. Figures issues des références <sup>139,157</sup>.

**La troisième étape** consiste à utiliser des modèles théoriques dont l'objectif est de prédire l'efficacité de ce dépôt de dose sur la survie cellulaire. Comme les analyses macroscopiques ne permettent pas de prédire efficacement la réponse de cellules à l'irradiation en présence de NPs, il est nécessaire d'utiliser des modèles qui prennent en compte l'inhomogénéité du dépôt de dose, notamment au travers de modèles tels que le LEM (« *Local Effect Model* »). Ce modèle est utilisé dans certains centres d'hadronthérapie délivrant des ions carbonés en pratique clinique. Le LEM assume que les effets biologiques obtenus dans un petit volume sont

directement déterminés par la quantité d'énergie déposée dans ce volume, et ceci indépendamment du type de rayonnements ionisants. Le principe considéré dans ce modèle se concentre sur la densité locale d'ionisation – donc par extension, le TLE – comme déterminant de l'effet biologique (à savoir les dommages locaux). L'estimation de la létalité cellulaire ne se base pas sur la « dose moyenne » à la cellule, mais sur la probabilité de dommages létaux en chaque point de la cellule selon la dose déposée en chacun de ces mêmes points. Ce modèle, comme la plupart des modèles prédictifs de réponse à l'irradiation, assume que l'ADN nucléaire est la cible principale. Ceci implique donc une bonne connaissance de la distribution spatiale des NPs à l'échelle sub-cellulaire et l'intégration de ces données dans les codes de simulation afin d'améliorer le plus précisément possible ces simulations numériques<sup>25,129,139,140,147,152,157</sup>.

McMahon SJ *et al.* a publié en 2011 un article dans la revue « *Radiotherapy and Oncology* » et a évalué l'intérêt du LEM dans le cas précis d'une irradiation en présence de NPs, en comparant les prévisions d'un modèle basé sur le LEM avec des résultats expérimentaux. Après avoir cultivé des cellules de cancer du sein MDA-MB-231, ces cellules ont été exposées ou non à des NPs d'or de 1.9 nm à une concentration massique de 0.05%, puis irradiées à des doses croissantes par un LINAC clinique à des énergies de 6 MV et 15 MV. La répartition intracellulaire des NPs a été analysée par microscopie électronique. Alors qu'une approche macroscopique ne prédit pas d'effet significatif à ces énergies, les résultats expérimentaux retrouvent une radiosensibilisation en présence des NPs. En revanche, l'utilisation d'une approche basée sur le LEM avec le code Monte Carlo GEANT4-DNA permet de prédire une radiosensibilisation en accord avec celle effectivement observée, comme cela est montré sur la figure 31 issue de cet article<sup>139</sup>. En 2017, d'autres auteurs comme Ferrero V. *et al.*, dans la revue « *Medical Physic* » ou Lechtman, E. & Pignol, J.-P dans la revue « *Scientific Report* » font également état de modélisation, basées sur le LEM et qui sont en adéquation avec les résultats expérimentaux<sup>147,152,157</sup>.

Ces résultats suggèrent que l'impact des NPs sur le dépôt de dose s'exercerait principalement par la création de zones de fortes densités d'ionisation et non par une augmentation globale de la dose à l'échelle cellulaire ou tissulaire. Ce type d'action permet d'expliquer qu'aux énergies à l'échelle du MeV, malgré un faible taux d'événement ionisant (moins de 0.001 ionisation par NP et par Gy pour des NP d'or de 20 nm à 100 keV), il suffit d'un seul événement pour induire un dépôt de dose conséquent à l'origine de dommages cellulaires létaux, et ainsi rendre compte en partie des résultats expérimentaux<sup>25</sup>. Le type de lésions créées dans ces zones de forte densité d'ionisation (appelés « clusters d'ionisation »), complexes et non réparables, permet également d'expliquer les variations mesurées du paramètre  $\alpha$  lors de ces irradiations<sup>137,140</sup>.

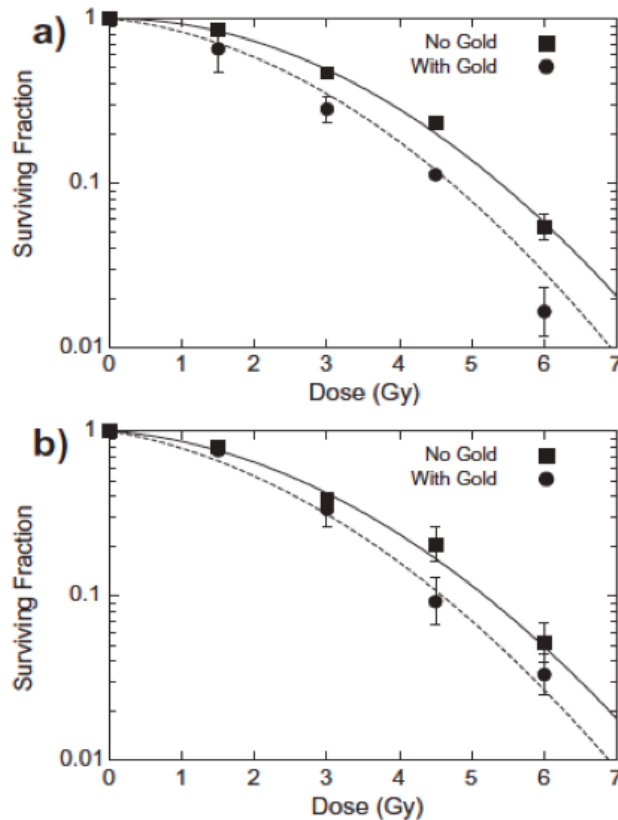


Figure 31 : Courbes de survie cellulaire en fonction de la dose, comparaison des prédictions par un modèle LEM et des résultats expérimentaux de la lignée cellulaire MDA-MB-231 irradiée par un LINAC à 6 MV (a) ou 15 MV (b), avec ou sans NPs d'or de 1.9 nm à 0.05% de concentration massique. Les points sont les valeurs mesurées expérimentalement (■: contrôles, ●: + NPs). La ligne pleine correspond à la courbe des cellules contrôles obtenue par l'expérience. La courbe en pointillée est la prédiction par le modèle LEM pour la réponse cellulaire à l'irradiation en présence de NPs d'or. Figure issue de la référence <sup>139</sup>.

En résumé, l'ensemble des travaux basés sur ces modélisations numériques et dosimétriques proposent des arguments permettant d'expliquer l'impact des NPs sur le dépôt de dose après irradiation et les résultats expérimentaux observés. Ces arguments, au nombre de trois, sont <sup>157</sup> :

- (i) **une accumulation des NPs proche des cibles subcellulaires au sein de la tumeur (exemple, le noyau cellulaire) ;**
- (ii) **une augmentation, principalement *via* effet photoélectrique, de l'absorption des photons dans le tissu *via* leur interaction avec les NPs ;**
- (iii) **la création de nombreux électrons secondaires de faible énergie (principalement Auger ou photoélectrons), responsables d'un dépôt de dose inhomogène à l'origine de lésions complexes menant à une augmentation de la létalité cellulaire.**

La prise en compte de cette suite d'événement et l'intégration d'une approche « microscopique » dans les données de modélisations dosimétriques montrent un meilleur accord entre simulations et données expérimentales (une approche macroscopique négligeant les inhomogénéités de dépôt de dose). Néanmoins, cette approche microscopique soulève encore quelques questions car elle présente certaines limites.

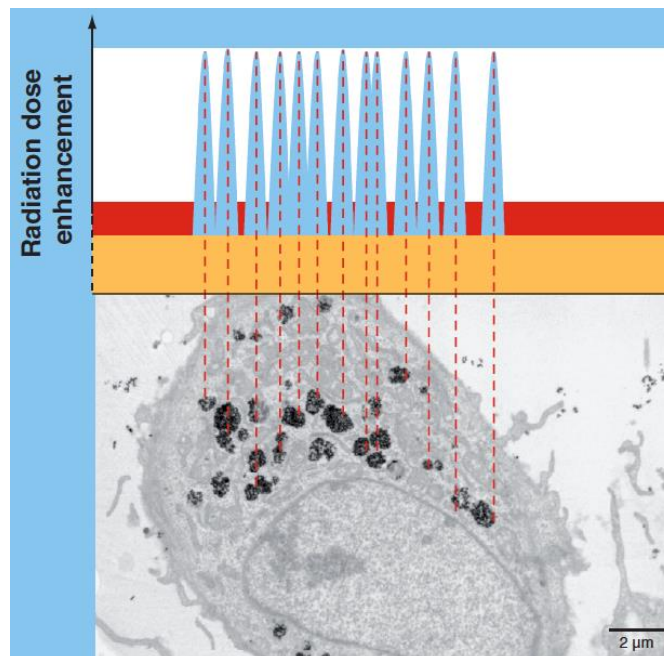
**La première limite** concerne la définition de la localisation intracellulaire des NPs. Les modèles utilisés assument que l'ADN est la cible principale pour mener à une inactivation cellulaire. Du fait du profil du dépôt de dose dans la proximité immédiate de la NPs, ce postulat impose que pour montrer une efficacité anti-tumorale, les NPs doivent se trouver à proximité immédiate de l'ADN nucléaire afin d'y induire des dommages complexes. Apparaît donc la notion de « **nanoparticule efficace** » ou « **inefficace** », selon leur localisation respective par rapport au noyau cellulaire<sup>25,27,147</sup>. Ce qui impose deux préalables afin d'affiner au mieux les modélisations : **(i) l'intégration dans les simulations de modèles cellulaires réalistes avec une localisation subcellulaire des NPs basées sur des données expérimentales, et (ii) la détermination de l'importance et de la sensibilité relatives des différents compartiments cellulaires à l'irradiation** (les mitochondries ont été proposées comme pouvant être une cible importante de l'irradiation)<sup>158</sup>.

**Une seconde limite** à l'approche microscopique tient dans les incertitudes inhérentes à ce type de modélisation, notamment du fait des incertitudes concernant les sections efficaces des différents processus physiques à basse énergie, ou encore le manque de modélisations prenant en compte la formation et le transport de radicaux libres. De même, la création de modèles cellulaires complexes et réalistes, prenant en compte les variations de composition chimiques des différents compartiments subcellulaires ou encore les différents états de condensation de l'ADN nucléaire, reste un défi<sup>103</sup>. Une fois ces modélisations théoriques effectuées, reste encore la difficulté de les confronter aux données expérimentales, ce qui nécessiterait le développement de nano-détecteurs et de nano-dosimètres<sup>22</sup>.

Enfin, pour une simulation complète de l'effet des NPs, **la prise en compte de leurs possibles effets intrinsèques**, comme un effet chimique ou biologique, assumant une activité propre des NPs, est une étape qu'il reste à réaliser<sup>140,147</sup>.

La figure 32 résume la différence entre les approches macroscopique et microscopique *via* le LEM et illustre une expérience où une cellule exposée en condition *in vitro* à de NPs d'oxyde d'hafnium (*NBTR3*<sup>®</sup>) a été analysée en microscopie électronique (coupe ultrafine). La répartition hétérogène des NPs est clairement identifiée avec la présence d'agrégats et d'amas de NPs dans le compartiment cytoplasmique. Les NPs sont clairement exclus du compartiment nucléaire. La différence du dépôt de dose selon les deux approches est également illustrée<sup>138</sup>.





**Figure 32** : Image de microscopie électronique d'une coupe cellulaire (lignée HT1080) exposée à des NPs d'oxyde d'Hafnium (*NTBRX3*<sup>®</sup>) révélant l'hétérogénéité de leur répartition. Comparaison de l'estimation de la dose selon les approches macroscopique ou microscopique. En orange, estimation d'une dose délivrée en absence de NPs, homogène à l'échelle cellulaire. En rouge, estimation de la dose délivrée en présence de NPs *via* le modèle macroscopique : l'augmentation de dose est peu importante et considérée homogène sur le volume de calcul. En bleu, estimation de la dose délivrée en présence de NPs *via* le modèle microscopique : la dose est calculée dans plusieurs sous-volumes sub-cellulaires, permettant de mettre en évidence une augmentation importante de dose dans la proximité immédiate des NPs, tenant ainsi compte de leur hétérogénéité de distribution<sup>138</sup>.

### **3.3 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Chimie**

La production de ROS secondaire à l'interaction RI - matière entraîne la création de dommages dits « indirects » en réponse à l'irradiation, comptant pour près des deux-tiers des dommages radio-induits par un faisceau de photons. Le métabolisme cellulaire est lui-même à l'origine de la production de ROS en situation aérobie, notamment *via* la production de radicaux libres par la chaîne respiratoire mitochondriale. Des enzymes anti-oxydantes comme la catalase ou la superoxyde dismutase permettent d'en contrôler les niveaux. Une dérégulation de cet équilibre mène à des situations de stress oxydant, responsable du même type de lésions par surplus de ROS<sup>159</sup>.

De par leurs propriétés de surface, notamment leur forte réactivité chimique à l'origine de leur utilisation comme catalyseurs industriels, les NPs sont suspectées d'avoir également un rôle à jouer dans la production de ROS, que ce soit avec ou sans irradiation<sup>23</sup>. Ce qui va donc en faveur d'une possible toxicité intrinsèque des NPs *via* des modifications de l'équilibre redox cellulaire, et d'une action non purement physique de ces NPs en réponse à l'irradiation<sup>24,27,159</sup>.

Cheng, N. N. *et al.* dans un article paru en 2012 dans la revue « *Journal of the American Chemical Society* », développe en ce sens le concept « *d'augmentation dynamique de la phase chimique* » sous irradiation en présence de NPs<sup>160</sup>. En mesurant par fluorescence l'hydroxylation du 3CCA en 7OHCCA sous irradiation et en présence de NPs d'or de 3 nm à très faible concentration (0.00005 %), Cheng, N. N. *et al* a mesuré des taux de 7OHCCA plus de 2000 fois supérieurs à ce qui était attendu avec une concentration de NPs de près de 1%. Le principe de cette expérience est résumé sur la figure 33. Après radiolyse de l'eau, le 3CCA réagit avec l'espèce radicalaire  $\bullet\text{OH}$  pour former la molécule radicalaire 3CCAOH $\bullet$ , réagissant par la suite avec l'oxygène pour former le 7OHCCA. Les taux de 7OHCCA mesurés en présence de NPs sont expliqués par l'action catalytique qu'exercent ces NPs après avoir réagi avec les ions superoxydes produits par radiolyse de l'eau, augmentant leur réactivité de surface. Cette explication met en avant une augmentation dynamique de la phase chimique par les NPs, dans le sens où ces NPs activées par leur réaction avec des ions superoxydes issus de la radiolyse de l'eau, catalysent les réactions d'hydroxylation des espèces radicalaires<sup>160</sup>. Ainsi, cette expérience remet en question un mode d'action purement physique de ces NPs en réponse à l'irradiation.

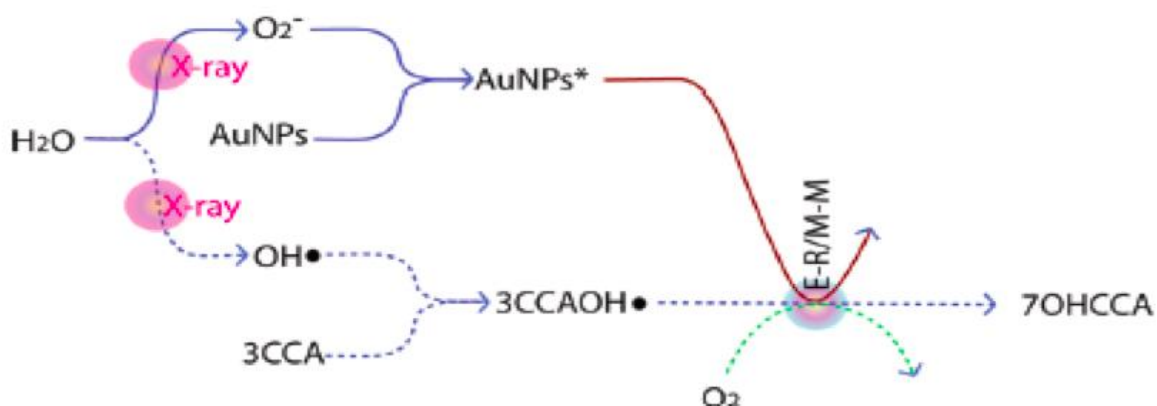


Figure 33 : Proposition de mécanisme pour l'augmentation dynamique de la phase chimique en présence de NPs. La voie en pointillés est la voie établie de transformation de l'acide coumarine-3-carboxylique (3-CCA) en acide 7-hydroxycoumarine-3-carboxylique (7OHCCA, mesurable en fluorescence) sous irradiation. La voie en trait plein est la voie proposée médiée par les NPs d'or (AuNPs) : après activation des AuNPs par l'ion superoxyde issu de la catalyse de l'eau, ceux-ci catalysent la transformation de l'espèce radicalaire 3CCAOH $\bullet$  en 7OHCCA, *via* une combinaison de mécanismes de Michaelis-Menten (M-M) et de Eley-Rideal (E-R). Figure issue de la référence <sup>160</sup>.

### **3.4 Nanoparticules de numéro atomique élevé : Biologie**

Les disparités entre les résultats expérimentaux et les prédictions par les modèles physiques suggèrent un autre mode d'action qu'une simple « radiopotentialisation ». Si une participation à la phase chimique a été évoquée dans la partie précédente, des études concernant les interactions biologiques propres aux NPs, remettent également en question leur supposée « passivité » en milieu biologique<sup>26,27</sup>.

#### **3.4.1 Effets sur la réparation de l'ADN**

Un des effets biologiques proposé pour les NPs est une altération des capacités de réparation de l'ADN, aboutissant en la persistance d'un plus grand nombre de lésions non réparées après irradiation. Les études évaluant cet effet montrent souvent des résultats contradictoires et le mécanisme aboutissant à ce possible défaut de réparation de l'ADN n'est pas clairement établi. Ont été proposés comme mécanismes potentiels des interactions de la NP *via* sa *corona* avec le protéasome à l'origine d'une **altération des voies de réparation de l'ADN, l'induction de voies du stress cellulaire aboutissant à la diminution de protéines de réparation comme Rad51 et Ku70**, ou encore **une atteinte mitochondriale résultant secondairement en un défaut de réparation de l'ADN**<sup>23,24,26,135,149</sup>.

Dans leur étude parue dans la revue « *Radiotherapy and Oncology* » en 2013, Mirjolet C. *et al.* mettent en évidence une accumulation de lésions non réparées en présence de NPs, ce qui est interprété comme une diminution des capacités de réparation de l'ADN, sans pour autant en expliquer le mécanisme. Dans leur étude, des nanofeuillets d'oxyde de titane (TiONts) ont été utilisés en combinaison à l'irradiation pour traiter deux lignées cellulaires humaine de glioblastome (SNB-19 et U87MG). Les cellules ont été exposées à une concentration de  $1\mu\text{g.mL}^{-1}$  de TiONts et irradiées à l'aide d'un accélérateur clinique (Clinac 600) à des doses de 0 et 2 Gy. L'analyse des dommages ADN a été effectuée par immunomarquage dirigé contre la protéine  $\gamma\text{H2AX}$ , 1h et 24h post-irradiation. Les résultats montrent une augmentation précoce de la phosphorylation de la protéine H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ) suggérant la présence de dommages ADN à 1h principalement dans la lignée la plus radiosensible. Cependant, ces expériences mettent surtout en évidence une persistance plus importante de ces dommages à 24h comparativement aux cellules contrôles, comme illustré dans la figure 34. Les auteurs en concluent que les NPs impactent les capacités cellulaires de réparation de l'ADN et sont donc à l'origine de ces dommages non réparés tardivement.

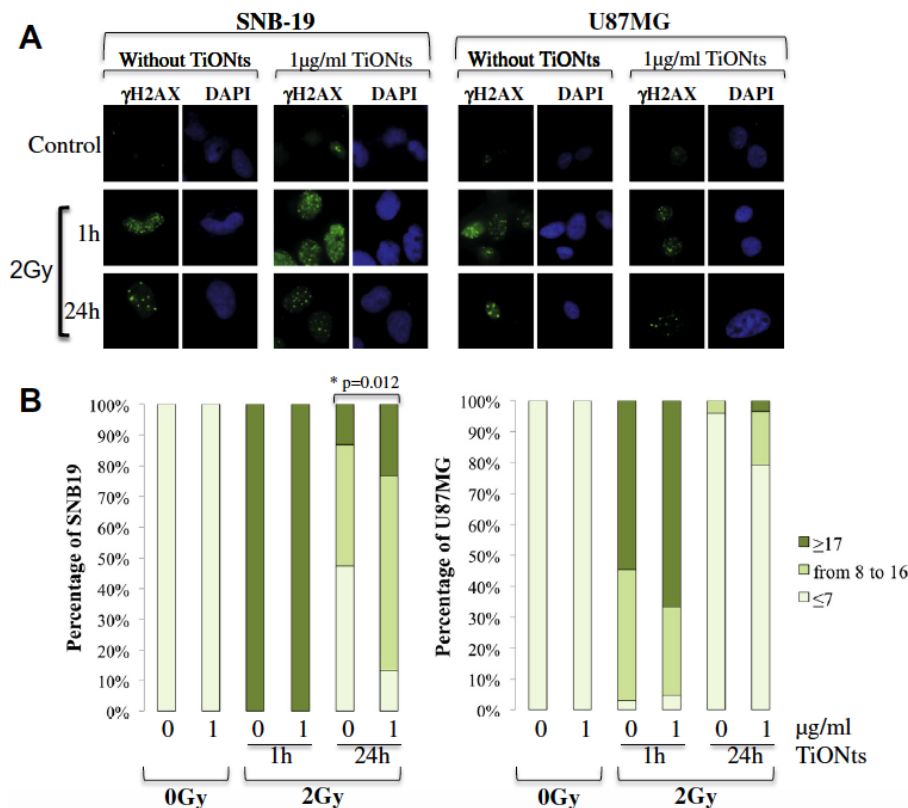


Figure 34 : A) Images en immunofluorescence des foci  $\gamma$ H2AX dans les noyaux des lignées SNB-19 et U87MG (DAPI : marquage nucléaire). B) Pourcentage de cellules stratifiées selon le nombre de foci  $\gamma$ H2AX par noyau. On retrouve dans la lignée SNB-19 une différence significative à 24h ( $p=0.012$ , test du  $\chi^2$  entre cellules contrôles et cellules exposées) pour le nombre de foci, témoignant d'une persistance plus importante des lésions de l'ADN 24h après l'irradiation en cas d'exposition au TiONts. Figure issue de la référence <sup>137</sup>.

### 3.4.2 Nanoparticules de numéro atomique élevé et stress cellulaire

L'homéostasie cellulaire est régulée par plusieurs mécanismes dont l'objectif est de veiller aux dérégulations des équilibres, que ce soit l'équilibre redox, l'équilibre ionique ou encore l'équilibre protéique. Un impact des NPs dans la dérégulation de ces systèmes et dans l'induction de déséquilibres de l'homéostasie cellulaire, témoignant d'une activité biologique – toxique – intrinsèque aux NPs, est de plus en plus mis en avant dans la littérature.

Les NPs peuvent interagir au cours des processus induits lors de la phase radio-chimique de la radiothérapie en catalysant la production de ROS. De par leur réactivité de surface, les NPs peuvent également induire la production de ROS sans irradiation. Le paradigme selon lequel une importante part de la toxicité liée aux NPs est médiée par l'induction de stress oxydant est très présent dans la littérature, bien que la production de ROS après irradiation en présence de NPs ne soit pas détectée par tous les auteurs<sup>24,26,137,144,159</sup>.

Jain S. *et al.* a par exemple mis en évidence dans la lignée de cancer du sein MDA-231-MB, que des NPs d'or de 1.9 nm induisent une « chimio-sensibilisation » à la Bléomycine d'un facteur 1.38, du même ordre que la sensibilisation obtenue par une irradiation en KeV. La

Bléomycine est un composé actif oxydo-réducteur, dont l'action cytotoxique est médiée par la production de ROS (radicaux hydroxyle, superoxyde et peroxyde d'hydrogène), mimant donc les effets indirects d'une irradiation. La sensibilisation par les NPs en présence de Bléomycine et sans irradiation, comme visible sur la figure 35, est une preuve selon les auteurs d'une action biologique des NPs, et suggère que leur implication dans le stress oxydant est un mécanisme clé de leur effet <sup>27,144</sup>.

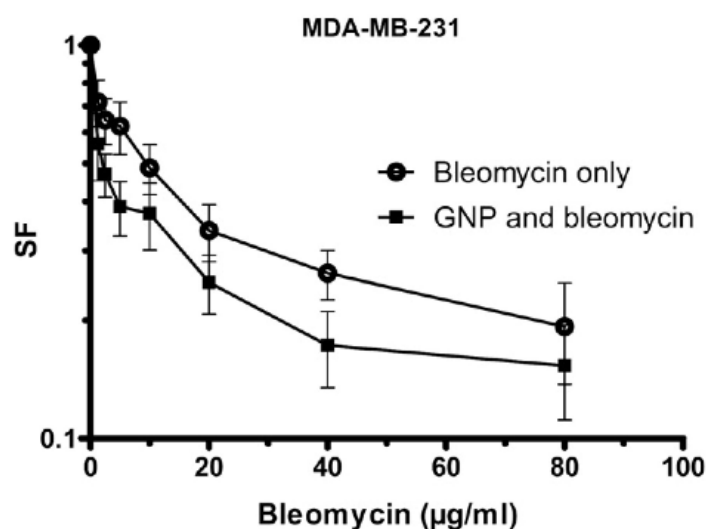
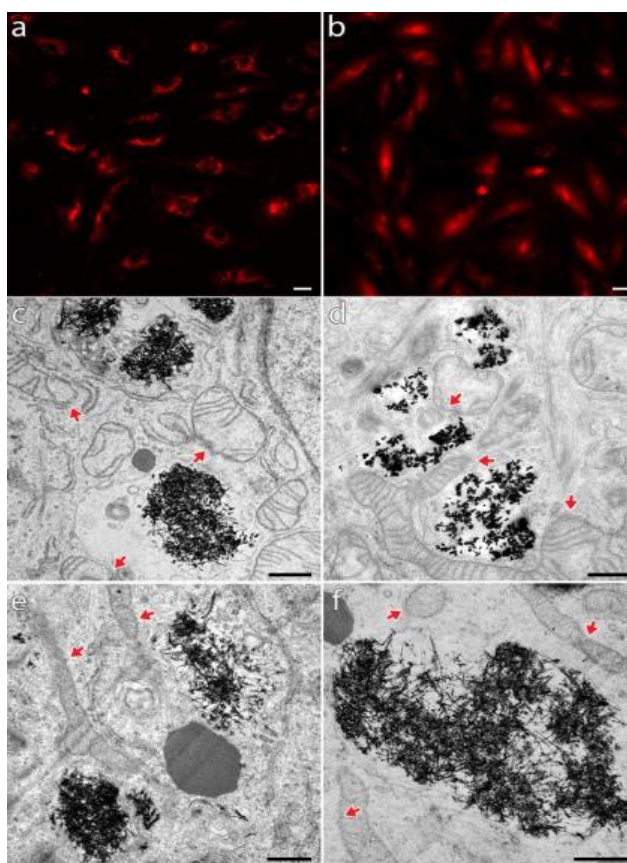


Figure 35: Chimiosensibilisation à la Bléomycine de la lignée MDA-231-MB par des NPs d'or de 1.9 nm. En abscisse, la concentration de Bléomycine. En ordonnée, la fraction de cellules survivantes. (●) Bléomycine seule (contrôles), (■) Bléomycine + AuNPs (concentration de 12 µM, 24h avant exposition à la Bléomycine). La dose moyenne d'inactivation des cellules était de 25 µg.mL<sup>-1</sup> pour la Bléomycine seule et de 18.44 µg.mL<sup>-1</sup> pour la Bléomycine + NPs, soit une chimiosensibilisation (par ratio des deux valeurs précédentes) de 1.38 en faveur de la solution avec NPs. Figure issue de la référence <sup>144</sup>.

Une autre voie étudiée de la toxicité des NPs est l'atteinte de la mitochondrie. Cette organelle est impliquée dans la production énergétique de la cellule mais également dans la régulation de l'équilibre du stress oxydant. La chaîne respiratoire mitochondriale est en effet à l'origine de la production de radicaux libres et de ROS, dont les niveaux sont régulés par des enzymes présentes dans la membrane mitochondriale comme la catalase et la superoxyde dismutase (SOD2, notamment)<sup>159</sup>. Une dysfonction mitochondriale peut mener à l'activation de la voie apoptotique intrinsèque *via* l'induction de caspases. Une mortalité cellulaire apoptotique en présence de NPs est un argument en faveur d'une implication de la mitochondrie<sup>24,26</sup>.

Dans un article paru en 2017 dans la revue *Nanotoxicology*, Simon M. *et al.* met en évidence dans la lignée de cellules endothéliales primaires HUVEC, une altération de la fonction mitochondriale en présence de NPs de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>). En présence de ces NPs, les auteurs observent une diminution des niveaux de la protéine mitochondriale SOD2 (protéine impliquée dans la régulation de l'équilibre redox). Les auteurs proposent que la production de

ROS en présence de NPs peut s'expliquer par une atteinte mitochondriale et un déséquilibre secondaire en faveur de la production de ROS. Pour corroborer leur hypothèse, ils ont étudié l'effet de l'exposition des HUVEC aux NPs de TiO<sub>2</sub> sur la fonction mitochondriale *via* un marquage au TMRM (marqueur du potentiel de membrane mitochondrial) et une analyse en microscopie électronique de l'intégrité de la membrane mitochondriale. Ils mettent ainsi en évidence, comme illustré sur la figure 36, un marquage au TMRM plus faible et diffus en présence de NPs, témoignant d'une dysfonction mitochondriale. Les observations en microscopie électronique sur deux lignées cellulaires (HUVEC et HeLa) mettent en avant des dommages à la membrane mitochondriale et une désorganisation de la matrice en regard des agrégats de NPs. Tous ces arguments suggèrent que la présence des NPs de TiO<sub>2</sub> conduit à une dysfonction mitochondriale<sup>161</sup>.



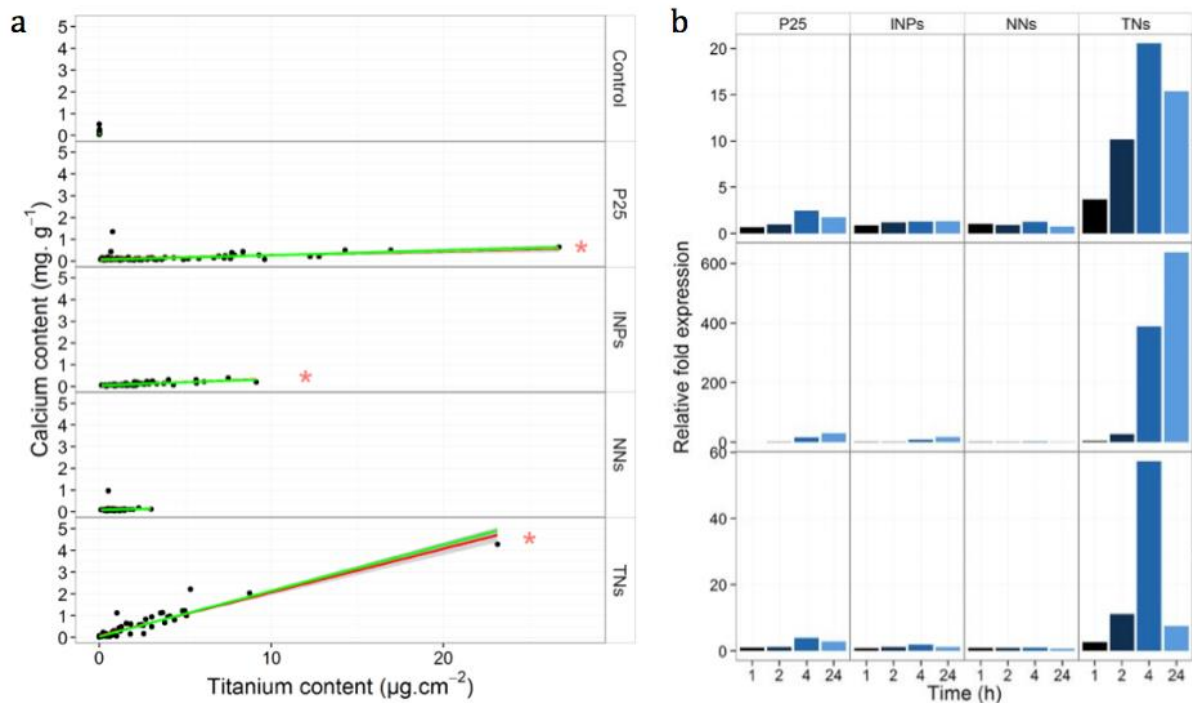
**Figure 36:** TiO<sub>2</sub> NPs et dysfonction mitochondriale. (a-b) : marquage TMRM pour évaluer le potentiel membranaire mitochondrial. (a) cellules HUVEC contrôle, (b) cellules HUVEC exposées aux TiO<sub>2</sub> NPs (Nanofeuillets, 2µg.cm<sup>-2</sup> pendant 6h.) Barre d'échelle : 10µm. Un marquage diffus et hétérogène est observé en présence de NPs témoignant d'une atteinte du potentiel de membrane mitochondrial. (c-f) analyse par microscopie électronique de cellules HUVEC et HeLa exposées à 2 morphologies de TiO<sub>2</sub> NPs à 2µg.cm<sup>-2</sup> pendant 20h. (c-d) cellules HeLa avec Nanofeuillets (c) et P25 (d, NPs 25-35 nm). (e-f) HUVEC exposées aux nanoaiguilles de TiO<sub>2</sub>. Les NPs sont visibles en amas denses et noirs. Les flèches montrent les dommages mitochondriaux. Barre d'échelle : 500 nm. Figure issue de la référence <sup>161</sup>.

Les NPs sont également suspectées d'induire un *stress du réticulum endoplasmique* (stress du RE). Le réticulum endoplasmique est une organelle impliquée dans le repliement et l'assemblage des protéines cellulaires, la synthèse des lipides et des stérols, et l'homéostasie calcique intracellulaire, notamment. Le *stress du réticulum endoplasmique*, encore appelé « *Unfolded Protein Response* » (UPR) est un mécanisme de protection important en cas des stress cellulaire (notamment par accumulation de protéines mal conformées). En cas de situation où cette réponse par UPR ne suffit pas à rétablir l'homéostasie, la cellule peut être amenée vers une mort cellulaire programmée<sup>162</sup>.

Dans un article paru en 2017 dans la revue « *Nanotoxicology* », Simon M. *et al.* a analysé par une technique de micro-analyse chimique quantitative multi-élémentaire (micro-PIXE) l'internalisation de NPs de TiO<sub>2</sub> de différents types (P25, nanoaiguilles, nanofeuillets) et les modifications ioniques induites au sein de la lignée cellulaire HUVEC. Les auteurs ont en parallèle, mesuré par RT-PCR quantitative l'expression des gènes impliqués dans les voies de régulation du stress du réticulum endoplasmique. Ils mettent en évidence que l'internalisation de TiO<sub>2</sub> NPs, variable et hétérogène selon le type de NPs considéré, s'accompagne d'une augmentation du calcium intracellulaire dont l'amplitude est directement reliée à la quantité de TiO<sub>2</sub> présent dans la cellule. L'analyse des voies du stress du RE montre également que celles-ci sont activées de façon significativement plus importante en cas d'internalisation des NPs de TiO<sub>2</sub>, et donc en parallèle de la dérégulation de l'homéostasie calcique. Ces données sont résumées sur la figure 37<sup>161</sup>.

Le calcium est un élément clé de processus métaboliques majeurs, tels que la prolifération ou la différenciation. En tant que messenger impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, une dérégulation de l'équilibre calcique, possiblement médiée par une atteinte des fonctions du RE, peut avoir de nombreuses conséquences sur le devenir de la cellule. Dans un article publié dans *Nanotoxicology* en 2011, Simon M *et al.* met en évidence dans une lignée de kératinocytes humains (PHFK) que l'internalisation de NPs de TiO<sub>2</sub> s'accompagne d'une augmentation du calcium intracellulaire et induit une différenciation précoce des kératinocytes primaires. Ceci met en avant non seulement une action biologique des NPs sur le devenir de la cellule, mais également l'implication du calcium dans diverses voies de signalisation<sup>163</sup>.





**Figure 37 :** Conséquences de l'internalisation de plusieurs types de TiO<sub>2</sub> NPs dans la lignée HUVEC sur le taux de calcium intracellulaire et les voies du stress du réticulum endoplasmique. (a) Analyse quantitative cellule par cellule du contenu en Titane (en  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) en abscisse et des concentrations de calcium (en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en ordonnée mesurée par micro-PIXE dans les HUVEC exposées à  $2\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de différentes morphologies de TiO<sub>2</sub> NPs (P25, INPs/isotropiques, NNS/nano-aiguilles, TNS/nanofeuillets). Un point noir correspond à une cellule. Les relations entre les contenus en titane et en calcium ont été analysées par un modèle de régression linéaire (rouge) ou de régression robuste (vert). Les astérisques indiquent des pentes positives significatives ( $p < 0,05$ ) pour le modèle linéaire. (b) Induction selon le temps de marqueurs de stress du RE relié à l'exposition de HUVEC aux différents TiO<sub>2</sub> NPs. Analyse par RTPCR quantitative des niveaux de transcrits de Erdj4, CHOP et Herpud1 (marqueurs du stress du RE) après exposition à  $2\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  aux différents types de TiO<sub>2</sub> NPs. Résultats moyens de trois expériences différentes,  $p < 0,01$  comparativement au contrôle. Figures issues et adaptées de la référence 161.

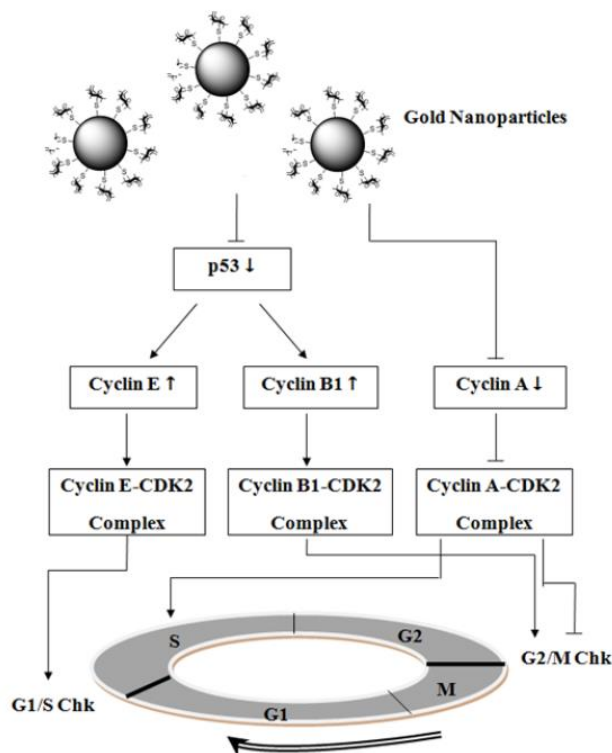
### **3.4.3 Effets sur le cycle cellulaire**

Les différentes phases du cycle cellulaire ne présentent pas la même radiosensibilité. Les phases G2 et M sont les plus radiosensibles, alors que les phases G1 et S sont moins radiosensibles voir radorésistantes. Par les dommages ADN qu'elle induit, et *via* l'activation de checkpoints du cycle cellulaire, la radiothérapie provoque une redistribution des cellules irradiées, amenant à une synchronisation globale du tissu cible dans les différentes phases du cycle. Cette redistribution est un des facteurs à l'origine de l'effet radiosensibilisant du fractionnement. De même, des agents ciblant spécifiquement certaines phases du cycle ou amenant à une resynchronisation en phase radiosensible, comme les taxanes, ont montré une efficacité clinique avec la radiothérapie<sup>23</sup>.



Le potentiel des NPs d'induire une redistribution des cellules dans le cycle cellulaire est sujet à controverse. Mirjolet C. *et al.* mettent en avant une redistribution des cellules exposées aux NPs après irradiation favorisant les phases G2/M, les plus radiosensibles<sup>137</sup>. D'autres auteurs comme Roa W. *et al.*, en 2009 retrouvent les mêmes effets avec des NPs d'or sur des lignées de cancer de la prostate. Les auteurs retrouvent une diminution des taux de p53 et de cycline A. Ils proposent comme mécanisme une accélération des phases G0/G1 via une activation des CDK kinases par les NPs, puis une accumulation secondaire en G2/M menant à une radiosensibilisation (schématisé sur la figure 38)<sup>164</sup>.

A contrario, la littérature montre également des exemples d'accumulation en phase S plus radorésistante, voir l'absence d'effet sur le cycle cellulaire des NPs. Du fait de cette grande variabilité de résultats entre des études n'utilisant pas les mêmes lignées ni le même type de NPs, une conclusion générale sur l'effet des NPs sur le cycle cellulaire ne peut être encore clairement établie<sup>23,24,26,135,149</sup>.



**Figure 38 :** Dérégulation du cycle cellulaire induite par des nanoparticules d'or sur une lignée de cellules de cancer de la prostate (DU-145). Les NPs induisent une diminution de p53 et de la Cycline A, et une augmentation de la Cycline E et de la Cycline B1, molécules impliquées dans les checkpoints (Chk) du cycle cellulaire (notamment G2/M et G1/S). La conséquence est une accélération des phases G0/G1 (plus radorésistantes) et une accumulation en phases G2/M (plus radiosensibles). Figure issue de la référence <sup>164</sup>.

### **3.4.4 Modulation de l'expression génique**

La modulation par les NPs de voies de signalisation, notamment par des dérégulations de l'homéostasie cellulaire comme l'équilibre calcique, peut conduire à des modifications du protéasome *via* des modifications de l'expression génique globale ou de l'activation de la voie « UPR ». Cet effet général sur la « production protéique cellulaire » n'a pas été encore bien quantifié<sup>26,149</sup>.

### **3.5 Mode d'action des Nanoparticules de numéro atomique élevé : conclusion**

En conclusion, les différents modes d'action possibles des NPs de numéro atomique élevé, qu'ils soient physique, chimique ou biologique, montrent que ces NPs ne sont pas aussi « inertes » qu'initialement supposé. Leur action est bien plus complexe et vaste qu'une « simple » radiopotentialisation, elle-même encore non complètement comprise. Rentrent ainsi en jeu leur taille, composition, forme, capacités d'internalisation cellulaire, localisation subcellulaire, leur potentiel d'induction du stress du RE ou de dysfonction mitochondriale, leurs propriétés de surface pour la production de ROS et les liaisons à d'autres protéines... rendant difficile la compréhension exacte de leurs effets à l'échelle cellulaire. De plus, les différents effets observés dépendent non seulement du type de NPs étudiés, mais également des lignées cellulaires et des conditions d'expérimentation – souvent bien différentes d'un article à l'autre – rajoutant encore de la complexité à l'établissement d'un consensus.

Se dégagent de ces enseignements deux principes importants avant d'envisager une translation clinique d'un type particulier de NP : l'importance de comprendre précisément les mécanismes amenant aux effets biologiques observés avec ce type de NPs, et la potentielle toxicité d'un matériel dont l'absence d'inertie biologique ou chimique pose forcément des questions de biocompatibilité à l'échelle du corps humain<sup>23,26,27,144</sup>.

La figure 39 résume la complexité des différents modes d'action possibles d'une nanoparticule de Z élevé après irradiation.

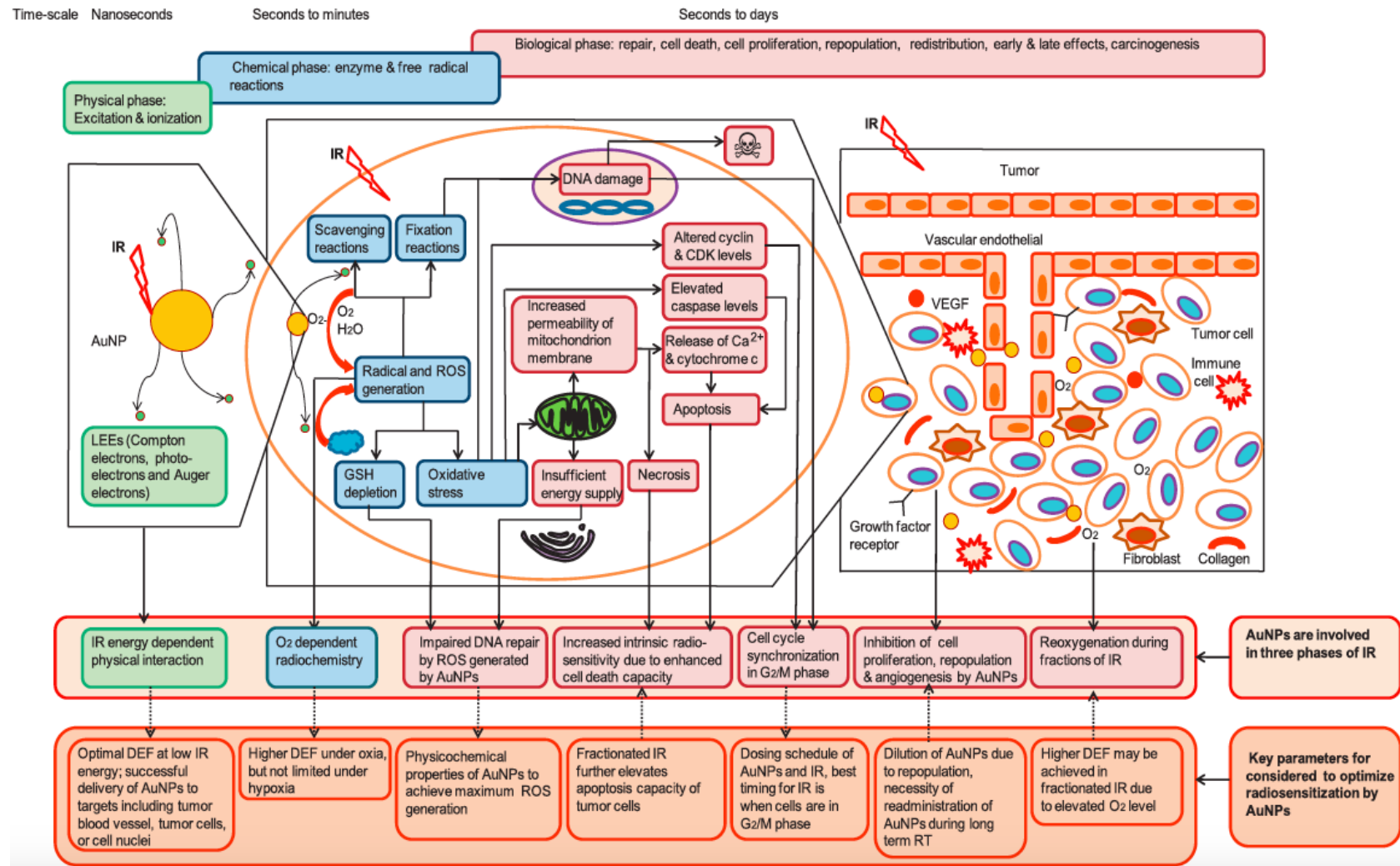


Figure 39 : mécanismes et paramètres clés de la radiosensibilisation par NPs de Z élevé. Ici, schématisation de différents modes d'action physique, chimique et biologique possibles de cette radiosensibilisation suivant l'irradiation d'une nanoparticule d'or, et paramètres possibles pour optimiser leurs effets. Figure issue de la référence <sup>23</sup>.

## **3.6 Notions de nanotoxicologie**

### **3.6.1 Introduction à la nanotoxicologie**

De par leurs effets chimiques et biologiques intrinsèques, les nanoparticules ne peuvent pas être considérées comme biologiquement inertes. Elles se différencient des matériaux macroscopiques par le fait qu'à l'échelle nanométrique, ces mêmes matériaux peuvent présenter une toxicité de par leurs nouvelles propriétés. L'utilisation de nanomatériaux en médecine a comme objectif de réduire la toxicité de certains traitements. Une telle approche ne peut ainsi se concevoir que si les NPs en elle-même ne rajoutent pas un risque pour la santé. Ce risque est néanmoins globalement peu évalué. Par ailleurs, la persistance dans le corps pour un temps parfois prolongé de NPs de Z élevé, constituées de matériaux lourds, rajoute des incertitudes quant à la sécurité de ces traitements, notamment à long terme. Les NPs pourraient ainsi présenter les deux faces de Janus : un potentiel thérapeutique intéressant mais également une toxicité peu connue qui risque de contrebalancer les bénéfices attendus<sup>13,27,77,78,96,165,166</sup>.

Le risque peut se définir comme une combinaison d'une exposition et d'un hasard. Une augmentation de l'exposition entraîne donc une augmentation du risque. Le développement exponentiel des Nanotechnologies contraste ainsi avec l'insuffisance d'évaluation des risques qu'elles engendrent pour la santé humaine et l'environnement. Leur impact étant estimé pouvoir dépasser celui de la révolution industrielle, il est nécessaire de développer une approche rationnelle afin d'évaluer leur biocompatibilité et leur toxicité potentielle<sup>75,96</sup>.

La toxicité se définit comme les effets nocifs, non spécifiques et non voulus pouvant survenir à l'échelle cellulaire, organique ou du patient comme système multi-organique. La biocompatibilité se définit, selon la conférence de consensus de l'« *European Society for Biomaterials* » de 1986, comme « *la capacité d'un matériau d'être utilisé avec une réponse adaptée de l'hôte dans une application spécifique* ». Elle considère donc le matériau du point de vue de ses effets positifs et négatifs (toxicité) sur le corps, mais également le potentiel négatif ou positif de l'environnement physiologique sur la performance de ce matériau. Dans le contexte d'un médicament, le terme de toxicité paraît plus adapté, mais du fait de la spécificité des NPs et de leurs propriétés particulières, l'étude de leur biocompatibilité et notamment l'étude de leur stabilité en milieu organique – que ce soit vis à vis de leurs performances ou de la toxicité que leur dénaturation pourrait induire – est également nécessaire<sup>77,167</sup>.

Devant la spécificité des nanomatériaux et leurs risques potentiels, une nouvelle branche de la toxicologie a émergé : la **nanotoxicologie**. Son objectif est d'étudier les impacts toxiques potentiels des nanomatériaux sur les systèmes biologiques et écologiques, afin de participer au développement des nanotechnologies en améliorant la sécurité. Son rôle ne se limite ainsi pas seulement à l'étude des effets indésirables, mais également à leur prévention et à leur

limitation. Partant d'exemples déjà connus de la toxicité atmosphérique des particules fines ou des risques de l'amiante et de l'asbestose, cette nouvelle spécialité a donc la lourde tâche de conjurer le spectre d'un nouveau scandale sanitaire<sup>71,90,97,168-171</sup>.

### **3.6.2 Études de la nanotoxicité**

Les études de nanotoxicité doivent comporter 3 familles d'analyses clés pour la caractérisation du profil toxicologique des nanomatériaux : **(i)** une caractérisation physico-chimique minutieuse des nanomatériaux, **(ii)** des tests *in-vitro* cellulaires et non cellulaires, et **(iii)** des tests *in-vivo*<sup>75</sup>. **La caractérisation physico-chimique** s'attache à connaître précisément les propriétés du nanomatériau étudié. Elle doit être faite avant, pendant et après une exposition *in vitro* afin d'en évaluer d'éventuels changements, et notamment le possible relargage d'ions toxiques en cas de dénaturation. Ces propriétés sont notamment la distribution en taille, la forme, les propriétés de surface (aire, charge, réactivité, chimie de surface, propriétés électroniques), la composition chimique précise (pureté, cristallinité), l'état d'agrégation et de dispersion ou encore la solubilité dans divers milieux<sup>75,90,171</sup>.

**L'analyse *in-vitro*** s'attache à analyser le comportement des nanomatériaux dans un environnement biologique contrôlé, d'en évaluer la toxicité et les mécanismes impliqués. Ces essais peuvent être réalisés sur des milieux cellulaires (le choix des lignées – lignées de tissus sains ou pathologiques – dépendant notamment des tissus pouvant être en contact avec le nanomatériau) ou non cellulaires (pour étudier plus spécifiquement les interactions protéiques ou d'autres propriétés particulières)<sup>75,90</sup>.

Parmi les types d'analyses *in vitro* peuvent être citer la mesure et les modes d'internalisation cellulaire par différents moyens d'imagerie (microscopie de fluorescence avec des NPs marquées à l'aide un fluorophore, microscopie électronique, micro-analyse chimique...), des tests de prolifération (tests de formation de colonies, comptage par cytométrie de flux) ou de viabilité cellulaire (tests au MTT, de relargage de LDH...), l'étude des dommages ADN, des modifications de l'expression génique (notamment *via* des méthodes de criblage à haut débit), la mesure du stress oxydant (par mesures directes ou indirectes de la production de ROS *via* leurs effets), des tests d'immunogénicité...<sup>22,75,90</sup> Ces analyses posent par ailleurs des questions propres à l'études des nanomatériaux : notamment, l'évaluation d'une relation dose-réponse nécessite un consensus sur le mode de mesure des nanoparticules. Actuellement le débat n'est pas clos, la dose pouvant être mesurée en nombre de NPs par unité de volume ou de masse, en aire de surface, en mole, en masse par unité de surface... rendant difficiles les comparaisons entre les études. Les doses d'exposition actuellement employées sont par ailleurs souvent très supérieures aux doses d'expositions applicables *in vivo*, compliquant l'analyse des données. Le développement d'outils capables d'analyser et de détecter efficacement les nanomatériaux au

sein de structures biologiques est également un challenge du fait de leur taille et de leurs propriétés particulières<sup>75,97</sup>.

**Les études *in-vivo*** sont adaptées pour analyser l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des nanomatériaux, mais également leur toxicité systémique (réponse immunitaire, toxicité organique, analyse histologique notamment hépatique, rénale ou tumorale...). L'analyse de la toxicité à long terme et des principaux tissus cibles impliqués bénéficie également de ces études *in vivo*<sup>22,75,90</sup>. L'objectif de ces analyses est au final de pouvoir classer les nanomatériaux selon leur niveau de risque pour la santé et l'environnement. Du fait de la grande variabilité des nanomatériaux et de la diversité des milieux biologiques potentiellement rencontrés, le développement d'outils prédictifs de la nanotoxicité est d'un grand intérêt. On peut citer les études de nanotoxicologie *in silico*, modèles informatiques se nourrissant des données obtenues lors des expériences *in vitro* et *in vivo* afin d'estimer le niveau de risque présenté par un nanomatériau particulier. L'évaluations de biomarqueurs de toxicité, comme l'analyse à haut débit des modifications d'expression génique ou protéique induites par les NPs (la toxicogénomique) peuvent également permettre de prédire le potentiel toxique d'un nanomatériau<sup>75,90,172</sup>.

### **3.6.3 Nanotoxicité des nanoparticules de numéro atomique élevé : état des lieux**

La toxicité des NPs de Z élevé est un domaine encore sujet à controverse. Plusieurs types de NPs comme les NPs d'or sont considérées comme peu ou pas toxiques, mais ces considérations découlent la plupart du temps de l'expérience de ces matériaux dans leur forme macroscopique. La multiplicité d'études contradictoires empêche de dégager un consensus et plaide en faveur d'une uniformisation des pratiques pour réaliser ces tests de toxicité<sup>26,173</sup>.

Les données les plus communément retrouvées dans la littérature mettent en avant une toxicité médiée à l'échelle cellulaire par la production de ROS, des défauts de dégradation lysosomale entraînant une mortalité cellulaire, une modification de l'équilibres calcique, une induction du stress du RE et des altérations de la fonction mitochondriale. En cas d'endocytose des NPs, le relargage d'ions métalliques secondaires à une dégradation lysosomale partielle de la NPs inorganique peut également être à l'origine d'une toxicité, réalisant un véritable « cheval de Troie lysosomal »<sup>22,71,74,75,105,161,163,165,174-176</sup>.

Ces différents mécanismes sont dépendants des caractéristiques physico-chimiques des NPs impliquées, celles-ci modulant les interactions des NPs avec leur environnement, notamment via la formation d'une *corona* protéique, et influent directement sur le mode d'internalisation cellulaire et la toxicité secondaire. Cette dépendance à l'environnement pour les effets médiés fait de l'analyse de la biocompatibilité des NPs un sujet clé de leur développement, et du caractère « contexte dépendant » de cette toxicité une particularité à prendre en compte<sup>96,108,165</sup>.

Au niveau systémique, l'injection de NPs de Z élevé peut être à l'origine de réponses inflammatoires ou immunogéniques, notamment via l'activation du complément. Ces réponses semblent là aussi être en partie médiées par la *corona* protéique se formant autour de la nanoparticule<sup>77,108,165</sup>.

Peu de données existent sur la toxicité à long terme. De par leur biodistribution particulière, les NPs peuvent s'accumuler dans les organes du système réticulo-endothéliale comme le foie ou la rate, ou encore dans les glomérules rénaux. Selon le type et la taille des NPs analysées, certaines études retrouvent la persistance de NPs dans ces organes plusieurs mois après une injection systémique<sup>78,105</sup>. Si Hainfeld JF *et al.*, dans son étude princeps, ne retrouvent pas de toxicité particulière chez les souris 1 an après l'injection de NPs d'or, les auteurs mettent cependant en évidence une dose létale à ne pas dépasser<sup>26,123</sup>. D'autres études retrouvent quant à elles, toujours avec des NPs d'or, des dommages tissulaires au niveau hépatique, pulmonaire ou médullaire associés à la présence de NPs<sup>22</sup>.

Une inquiétude particulière concerne le potentiel carcinogénique de ces NPs en cas de persistance dans l'organisme. Les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> ont par exemple été classées en 2006 par l'« *International Agency for Research on Cancer* » comme potentiellement carcinogènes (groupe 2B)<sup>96</sup>. Dans leur étude parue en 2016 dans la revue « *Scientific Reports* », Bettini S. *et al.* met en évidence une altération de l'homéostasie immunitaire intestinale, un potentiel pro-inflammatoire systémique et l'apparition de lésions coliques préneoplasiques après administration per os de NPs de TiO<sub>2</sub> à des rats. Ces NPs, présentes dans l'alimentation (E171, notamment), ont également été montré comme pouvant induire des lésions pulmonaires cancéreuses chez le rat en cas d'administration par aérosols<sup>177</sup>.

Chez l'homme, aucune étude de nanotoxicité n'a pour le moment apporté de réponse définitive concernant les NPs de Z élevé. La description en 1998 de lésions de myofasciite à macrophages en relation avec la persistance à long terme de nanocristaux de sels d'aluminium au sein de macrophages présents au point d'injection vaccinal montre que la dégradation de ce type de composés inorganiques n'est pas totale<sup>178,179</sup>. Si aucune corrélation significative n'a été démontrée entre la persistance de faibles quantités d'aluminium et une quelconque pathologie, l'utilisation clinique de NPs de Z élevé à des quantités possiblement bien plus importantes soulève des questions concernant la sécurité de cette pratique.

### **3.6.4 Nanotoxicologie : conclusion**

Du fait de la grande variabilité des effets cellulaires et systémiques, à court et long terme, des NPs, des études poussées de nanotoxicologie doivent être réalisées afin de mener une éventuelle translation clinique dans les meilleures conditions de sécurité. L'analyse de la biocompatibilité

des NPs dans l'environnement biologique doit être la pierre angulaire de la nanotoxicologie, les modifications induites par le milieu sur les nanomatériaux influençant directement leurs propriétés. La mise en place de stratégies prédictives de toxicité, comme les études *in-silico* ou la recherche de biomarqueurs, sont souhaitables. Enfin, les nanoparticules doivent être analysées comme de nouveaux matériaux à part entière, sans tenir compte d'une éventuelle innocuité du même matériau sous sa forme macroscopique.

### **3.7 Challenges en vue d'une translation clinique**

La translation clinique d'une molécule, à savoir son passage de la paillasse du chercheur au chevet du patient (le fameux « *from bench to bedside* »), est un chemin long et difficile. Beaucoup d'étapes doivent être franchies, depuis la preuve de concept aux tests réglementaires de mise sur le marché, en passant par les analyses *in vitro* et *in vivo*, la maîtrise de la synthèse industrielle de la molécule en question ou encore la sélection d'une population cible. Afin de maximiser les chances de réussite, le développement d'un nouveau produit doit se faire en ayant déjà à l'esprit son mode d'utilisation clinique et le type de patients auxquels il s'adresse<sup>180</sup>. Nous allons dans cette partie faire un rapide résumé des étapes clés que devra franchir une NP de Z élevée avant son utilisation en radiothérapie clinique.

#### **3.7.1 Phase Pré-clinique : étapes clés**

La première étape dans le développement d'un nouveau traitement est la preuve de concept. La mise en évidence d'un effet anti tumoral et la connaissance la plus exhaustive possible des mécanismes par lesquels cet effet prend place sont les préalables à tout développements ultérieurs : c'est le concept de la « *preuve par les faits* » (ou « *evidence-based* ») qui soutiendra tout l'édifice. Dans le cadre des NPs, la difficulté d'un consensus sur leur mode d'action émane en partie du fait que ces NPs se situent à la croisée de plusieurs spécialités scientifiques (biologie, chimie, physique), faisant de l'interdisciplinarité un challenge et un impératif<sup>22,23</sup>.

Le préalable à cette « *preuve par les faits* » est aussi l'établissement d'un langage commun permettant de comparer les expériences. La recherche sur les NPs souffre d'un défaut d'uniformisation dans les protocoles expérimentaux, les NPs et les lignées cellulaires employées, rendant difficile l'établissement de consensus sur leur mode d'action ou leur toxicité. Les difficultés d'établissement du mode d'action précis des NPs – radiopotentialisation, radiosensibilisation, un peu des deux – en est l'exemple type : l'établissement de standards dans les protocoles et les définitions pour la recherche sur les nanoparticules reste encore un challenge à relever<sup>93,181</sup>.

L'établissement des connaissances nécessaires passe par la réalisation d'études pré-cliniques longues, de modèles *in-vitro* aux modèles *in-vivo* comme les modèles murins, voir plus



complexes comme les primates<sup>13</sup>. Ces modèles pré-cliniques devront répondre à plusieurs questions : **(i)** l'établissement des modes d'actions précis des NPs, **(ii)** leur comportement en milieu biologique, **(iii)** des données *in-vivo* de pharmacocinétique (que ce soit à l'échelle cellulaire, tumorale ou d'un organisme sur un modèle animal), de toxicité (notamment à long terme) et de biocompatibilité, et enfin d'efficacité, avec l'établissement de protocoles thérapeutiques. Les modèles précliniques doivent être appropriés aux questions posées, par l'utilisation de lignées cellulaires d'intérêt (tissus sains potentiellement en contact, tissus tumoraux issus de pathologies d'intérêt en cas de translation clinique) et de modèles *in vivo* les plus adaptés (xénogreffes ectopiques ou orthoptiques, modèles de carcinogenèse induite ou tumeurs humaines greffées...). Enfin, l'obtention de données anatomopathologiques sur les modèles *in-vivo* doit être systématique, tant sur les tissus sains que sur la tumeur<sup>22,23,29,77,105</sup>.

Une des particularités des NPs est la grande dépendance de leurs actions biologiques avec leurs propriétés physico-chimiques. Ce qui impose lors de la réalisation des études précliniques une caractérisation complète des NPs employées : leur structure, composition, taille (et distribution de taille), forme, charge et propriétés de surface, capacités de dispersion ou d'agrégation, fonctionnalisation... doivent être parfaitement connues et contrôlées. Ce qui nécessite également, pour assurer la reproductibilité des expériences et plus tard du traitement, d'en contrôler la synthèse à grande échelle tout en assurant une uniformité et une reproductibilité des lots. La question du coût de production aura également son importance en cas de translation clinique : pour exemple, la production d'1 g de NPs d'or coûte actuellement de l'ordre de 10.000 \$<sup>15,22,77,107,182,183</sup>.

C'est à l'issue de toutes ces étapes précliniques que le choix d'une NP spécifique et bien caractérisée peut être fait pour monter un essai clinique. La NP choisie doit non seulement avoir fait la preuve de son efficacité et de son innocuité, mais également présenter des caractéristiques pharmacocinétiques rendant plausible son utilisation chez l'homme avec le mode d'administration envisagé (intra-veineux, intra-tumoral, ou encore intra-péritonéal)<sup>23,103</sup>.

Selon C.N. Coleman, dans son éditorial du *JCO* paru en 1999, certains points sont particulièrement importants à considérer lors de l'évaluation d'un traitement pouvant modifier l'efficacité de la radiothérapie<sup>54</sup>. Ces concepts, qui doivent être évalués également pour les NPs, résument bien ce qui a été dit précédemment : l'identification de la ou des cibles, la stabilité de ces cibles au cours du traitement, la possibilité de les atteindre par la molécule thérapeutique, le protocole thérapeutique optimal, la stabilité de la molécule thérapeutique et sa distribution lors d'un traitement de radiothérapie fractionné, enfin la relativité de l'augmentation de la toxicité de la radiothérapie pour la tumeur vis à vis des tissus sains. Toutes ces informations permettant par la suite de choisir la NP la plus adaptée pour un essai clinique.

### **3.7.2 Mise en essais clinique : étapes clés**

La translation clinique passe tout d'abord par la réalisation d'essais cliniques chez l'homme. Leur réalisation est soumise à de nombreux impératifs, notamment éthiques et législatifs. Ces impératifs éthiques suivent les 4 grands principes érigés par James F. Childress et Tom L. Beauchamp, à savoir : **(i) la bénéficience** : un nouveau traitement ne doit être testé qu'en cas de perspective utilitaire pour maximiser le bénéfice de la communauté et de l'individu ; **(ii) la non-malfaisance** : ne pas nuire, qui se retrouve dans le *primum non nocere*, pilier de tout acte médical. On retrouve ici la notion de toxicité qui doit donc être parfaitement évaluée ; **(iii) le respect de l'autonomie** : à savoir le choix du patient, qui doit pouvoir décider de façon libre et éclairée de sa prise en charge<sup>89 89</sup>. L'information apportée doit donc être complète, ce qui nécessite des connaissances exhaustives sur le sujet ; **(iv) enfin la justice**, à savoir l'accès à l'offre de soin pour tous.

Du point de vue législatif, la première étape consiste à définir clairement ce qu'est un nanomatériau. La définition de 2011 adoptée par l'Union Européenne et le « *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* » (SCENIHR) tend à trouver un équilibre entre la liberté laissée à l'innovation et les nécessités imposées par la sécurité sanitaire. Elle définit les nanomatériaux comme « des matériaux naturels, accidentels ou manufacturés contenant des particules, dans un état libre, comme agrégats ou agglomérats et où, pour 50% ou plus de ces particules, la distribution de taille d'une ou plusieurs dimensions externes est dans l'échelle de 1 à 100 nm ». Cette définition est encore sujette à débat, notamment du fait des propriétés particulières des nanomatériaux et de la limite de taille imposée. Maynard AD estime notamment dans un article paru dans *Nature* en 2011 qu'une définition par la seule taille peut être dangereuse dans la mesure où elle ne peut pas rendre compte de l'ensemble des risques associés à une grande diversité de nanomatériaux<sup>184</sup>. Ainsi, la définition des nanomatériaux et les régulations qui en découlent devrait être basée sur un ensemble d'attributs spécifiques définis scientifiquement, ouvrant la voie à une régulation adaptative devant prendre en compte à la fois les modifications de propriétés des nanomatériaux selon leur environnement et l'évolution des connaissances scientifiques sur le sujet<sup>183,184</sup>.

Avant l'étape de *translation* chez l'être humain, un nouveau produit est soumis à la législation du pays où l'étude clinique est proposée. Notamment, sa classification comme une drogue ou un dispositif médical. De cette classification dépendront tout un ensemble de tests précliniques et de conditions à remplir avant de pouvoir envisager un essai humain. Les définitions de ces deux classes de produits varient quelque peu entre les USA et l'Europe<sup>22</sup>. Aux USA, un dispositif médical « *ne réalise aucune de ses actions attendues via une action chimique dans ou sur le corps et ne nécessite pas d'être métabolisé pour pouvoir exercer ses actions* ». Pour

l'UE, un dispositif médical « *ne réalise pas ses actions principales dans ou sur le corps par des moyens pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques, mais peut être assisté dans ses fonctions par de tels moyens* ».

La question se pose donc pour les NPs, dont le mode d'action doit être clairement établi afin de pouvoir les classer dans l'une ou l'autre de ces catégories. Ainsi, si au niveau européen, les *NBTR3*<sup>®</sup> (NPs d'oxyde d'hafnium de la société Nanobiotix) ont été classées comme dispositif médical, elles ont été initialement classées comme drogue aux USA. Une fois les différents tests précliniques validés, et un programme d'assurance qualité pour la fabrication des NPs mis en place, le nouveau produit peut obtenir une autorisation de mise en étude clinique<sup>22</sup>.

Cette étape franchie, se pose la question de la population cible de l'étude. Ce qui nécessite de définir les situations présentant un besoin d'amélioration des résultats cliniques pouvant bénéficier de l'apport des NPs, notamment d'une théorique augmentation de la dose absorbée. C'est le cas des tumeurs traitées par radiothérapie définitive ou en situation pré opératoire, dont le bénéfice d'une escalade de dose est prouvé, mais non faisable habituellement du fait des organes à risque avoisinant, et dont les résultats cliniques nécessitent des améliorations. Schuemann J. *et al.*, citent comme cibles potentielles certaines tumeurs cérébrales, les sarcomes, les cancers du pancréas, du poumon, de la prostate et les cancers de la tête et du cou<sup>103</sup>. Le contexte clinique (radiothérapie seule ou associée à de la chimiothérapie, chirurgie ou non) nécessite également d'adapter le protocole expérimental pour tenir compte des spécificités de chaque traitement. Enfin, la sélection des patients à l'aide de biomarqueurs, potentiellement recherchés en phase préclinique, peut permettre d'améliorer les résultats attendus en identifiant les patients pouvant répondre le plus à ce traitement. Une définition précise de la population cible avant le début de l'essai est ainsi fondamentale : près de 90% des drogues entrant en essais clinique échouant, la réduction des biais de sélection est nécessaire afin de débiter dans les meilleures conditions (« Le bon traitement pour le bon patient au bon moment »)<sup>77,103,167,180</sup>.

La translation clinique s'accompagne également de challenges propres au NPs : on peut citer notamment la voie d'administration (intraveineuse, intra-tumorale...) à définir, les analyses pharmacocinétiques nécessitant de développer des outils fiables de mesure des taux de NPs dans différentes conditions, l'obtention de prélèvements anatomopathologiques et leur analyse pour évaluer la localisation précise des NPs au sein de la tumeur... L'analyse de la biodistribution et de la biocompatibilité à long terme doivent être parmi les questions principales investiguées par ces études. Il est notamment nécessaire de quantifier le niveau d'accumulation des NPs au sein de la tumeur, sa variation dans le temps (notamment au cours de la radiothérapie) et sa relation avec l'efficacité du traitement, mais également au niveau des tissus sains<sup>23,86</sup>. L'évaluation dosimétrique de l'augmentation de dose induite par les NPs, que

ce soit au sein des tissus sains ou de la tumeur, est également un défi à relever, puisqu'il nécessite tout d'abord une évaluation radiologique fiable de la localisation et de la quantité des NPs, puis une estimation *via* les TPS utilisés en clinique de l'augmentation de dose ainsi produite. Du fait des caractéristiques particulières du dépôt de dose induit par les NPs, une évolution des TPS cliniques est nécessaire afin de réaliser ces analyses dosimétriques dans les bonnes conditions<sup>15,153,185</sup>.

### **3.7.3 Essais cliniques : état des lieux**

Peu d'essais cliniques sur les NPs de Z élevés ont été menés ou sont en cours. Dans cette partie, nous allons les résumer brièvement. La principale NP de Z élevé investiguée à l'heure actuelle en association à de la radiothérapie est une nanoparticule d'oxyde d'hafnium *NBTR3*<sup>®</sup>. On note aussi des études sur des NPs de d'oxyde de gadolinium (*AGuIX*<sup>®</sup>). Une autre nanoparticule d'oxyde de fer (*MagForce*<sup>®</sup>) a été étudiée dans le cadre de traitement par thermo thérapie chez des patients atteints de glioblastome<sup>186</sup>. Ce type de traitement sort du cadre de la radiopotentialisation et ne sera pas développé dans ce manuscrit.

#### **- *NBTR3*<sup>®</sup> :**

Le *NBTR3*<sup>®</sup> est une nanoparticule de 50 nm composée d'un cœur d'oxyde d'hafnium (Hf, Z = 72) sous forme cristalline et de groupements phosphate. Ce traitement est développé par la société Nanobiotix, qui le définit comme « *un nanomatériau inerte d'un point de vue biologique et chimique* »<sup>138,187</sup>. Le *NBTR3*<sup>®</sup> a déjà fait l'objet d'un essai clinique de phase I pour le traitement de sarcomes et est actuellement en cours d'essais dans d'autres localisations :

#### **(i) Sarcomes :**

Un premier essai de phase I a été mené de novembre 2011 à avril 2014 chez des patients présentant des sarcomes des tissus mous des extrémités et du tronc. Cet essai a été réalisé dans deux centres français, l'Institut Bergonié à Bordeaux et l'Institut Gustave Roussy à Paris. Les objectifs étaient de déterminer la sécurité et la faisabilité de l'injection intra-tumorale d'une solution de *NBTR3*<sup>®</sup> de 53.3 g.L<sup>-1</sup>, de déterminer la dose maximale tolérée (en faisant varier les volumes d'injection) et ainsi de définir la dose recommandée. L'injection par voie intra-tumorale a été réalisée sous contrôle échographique et du chirurgien en une seule injection, puis contrôlée à 24h et à 10 semaines par scanner. Les volumes d'injection étaient croissants, définissant 4 groupes de patients afin de déterminer le volume maximal (2.5, 5, 10 ou 20 % du volume tumoral macroscopique, respectivement). La radiothérapie était planifiée 24h après

l'injection et consistait en 50 Gy en 25 séances de 2 Gy. Une chirurgie d'exérèse était planifiée 5 à 7 semaines après la radiothérapie.

Au total, 22 patients ont été inclus. Un patient a présenté une toxicité de grade 3 dans le groupe 4 (20 % du volume tumoral macroscopique), définissant le volume à injecter comme étant de 10% du volume tumoral. Tous les patients ont pu compléter la séquence thérapeutique. On note comme principaux effets secondaires notables une toxicité de grade 3 pour la douleur au site d'injection et un défaut de cicatrisation post-opératoire, et des toxicités hépatiques de grade 3 sur les tests biologiques, réversibles à chaque fois. Une analyse sanguine par spectrométrie de masse a montré un passage systémique des NPs juste après l'injection. Les analyses d'urine n'ont pas retrouvé de NPs.

Les analyses scannographiques ont montré ce qui est caractérisé comme une bonne diffusion intra-tumorale selon les auteurs. Les coupes thoraciques n'ont pas mise en évidence de dépôts pulmonaires de NPs. Néanmoins l'absence de coupes abdominales et notamment hépatiques sont notées. En post-opératoire, les auteurs notaient chez 5 patients sur 22, moins de 10% de cellules viables après le traitement, dont deux en réponse complète histologique (moins de 5% de cellules viables). Aucune analyse de la localisation cellulaire ou subcellulaire des NPs au sein de la tumeur n'a été effectuée. De cette étude, la première chez l'humain pour *NBTXR3*<sup>®</sup>, les auteurs concluent à la faisabilité de leur approche. La figure 40, issue de cet article, montre la procédure d'injection ainsi que les coupes scannographiques à 24h et juste avant la chirurgie<sup>188</sup>.

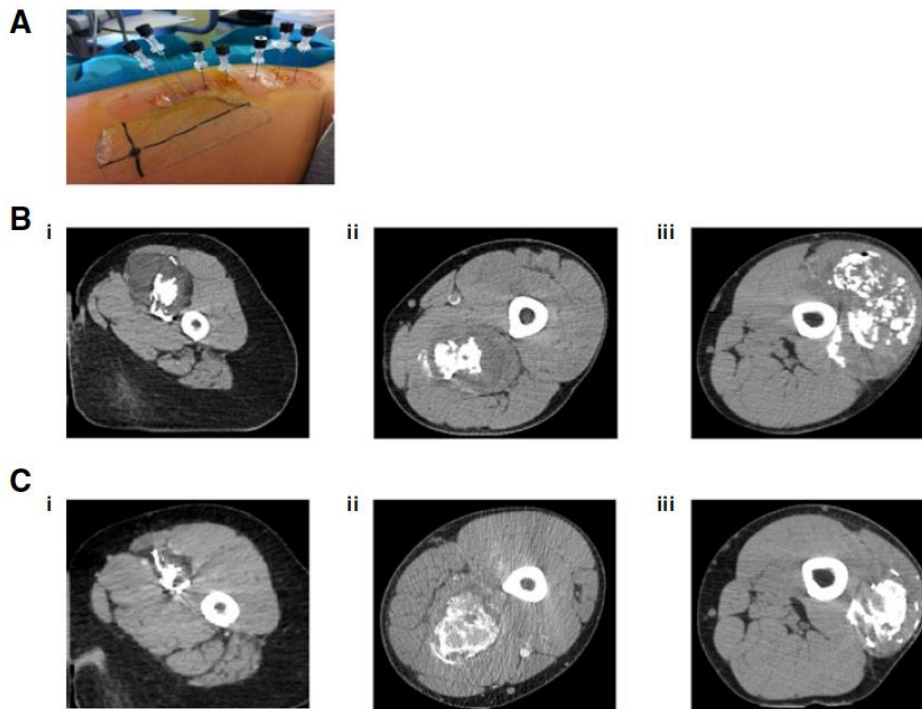


Figure 40 : Injection de *NBTXR3*<sup>®</sup> chez un patient présentant un sarcome des tissus mous de la jambe, et coupes scannographiques. A) procédure d'injection sous contrôle échographique ; B) Scanner montrant la localisation intra-tumorale des *NBTXR3*<sup>®</sup> 24h après l'injection (patients i, ii et iii) ; C) Scanner réalisé juste après la radiothérapie pour les mêmes patients i, ii et iii. Figure issue de la référence <sup>188</sup>.

Un autre essai sur les sarcomes est actuellement en cours (NCT02379845). Il s'agit d'un essai de phase II/III, prospectif et randomisé, faisant suite à l'essai précédent. Débuté en février 2015, cet essai cherche à comparer l'efficacité d'une injection intra-tumorale de *NBTXR3*<sup>®</sup> avec de la radiothérapie contre de la radiothérapie seule chez des patients présentant des sarcomes des tissus mous localement avancés des extrémités et de la paroi thoracique. L'objectif primaire est le taux de réponse complète histologique. Un des objectifs secondaires est le taux de résections R0, R1 ou R2. 180 patients ont été inclus pour cette étude multicentrique prenant place dans 43 centres répartis en Europe, Afrique du Sud, Asie et Australie. Un abstract, publié en octobre 2018 et faisant suite à une présentation orale au congrès de l'ESMO, fait état d'une augmentation significative du taux de réponse complète pathologique chez les patients traités par *NBTXR3*<sup>®</sup> (16,1 % versus 7,9 %,  $p=0,0448$ ) ainsi qu'une amélioration du taux de chirurgies R0 (77,0 % versus 64,0 %,  $p=0,0424$ ). L'article définitif est attendu<sup>189-191</sup>.

### (ii) Cancers du foie :

L'étude NCT02721056, ouverte depuis novembre 2015, est une étude de phase I/II évaluant l'efficacité des *NBTXR3*<sup>®</sup> en combinaison à de la radiothérapie stéréotaxique dans le traitement des cancers du foie. Il s'agit d'une étude prospective, ouverte, non comparative et non randomisée, conduite en deux phases : (i) une première phase d'escalade de dose afin de déterminer la dose recommandée de *NBTXR3*<sup>®</sup>, et (ii) une seconde phase évaluant l'efficacité et la tolérance de cette dose dans une cohorte de patients. Les cancers investigués sont les cancers primaires hépatiques ou les lésions secondaires. L'injection de *NBTXR3*<sup>®</sup> se fait soit par voie intra-lésionnelle à 4 niveaux de dose (10, 15, 22 ou 33 % du volume tumoral), soit par voie intra-artérielle sélective à 5 niveaux de dose (les 4 niveaux précédents et 45% du volume tumoral). La radiothérapie stéréotaxique s'effectue 24h après l'injection à 45 Gy en 3 fractions de 15 Gy sur 5-7 jours. Les objectifs primaires sont la détermination de la dose limitante toxique et de la dose recommandée, les objectifs secondaires sont la mesure du taux d'effets secondaires et du taux de réponse. 200 patients sont prévus pour cette étude prenant place dans 7 centres de 6 villes françaises (Lyon, Nancy, Nantes, Bordeaux, Rennes et Villejuif). La fin de l'étude est prévue pour décembre 2018<sup>192</sup>.

### (iii) Cancers de la tête et du cou :

L'étude NCT01946867 est une étude de phase I évaluant la combinaison de *NBTXR3*<sup>®</sup> et de radiothérapie pour des carcinomes épidermoïdes localement avancés de la cavité buccale ou de l'oropharynx. Elle se compose de deux groupes : l'un recevant une injection intra-tumorale de *NBTXR3*<sup>®</sup>, et l'autre une injection intra-artérielle. Les deux groupes reçoivent 24h après l'injection une radiothérapie de 70 Gy en 35 fractions de 2 Gy. L'objectif principal est la détermination des doses recommandées et des doses limitantes toxiques, les objectifs secondaires comprenant l'évaluation de la sécurité et de la tolérance de l'administration de *NBTXR3*<sup>®</sup>, des taux de réponse radiologiques, de la survie sans progression locale et générale, de la pharmacocinétique du produit, et de la faisabilité des administrations intra-tumorale et intra-artérielle. Cette étude est ouverte depuis Août 2013 et doit inclure 48 patients. Les centres participants sont situés en France (Lille, Paris, Rennes) et en Espagne (Madrid)<sup>193</sup>.

Une autre étude, NCT02901483, est en cours depuis octobre 2016 à Taïwan. Elle est menée par PharmaEngine, filiale partenaire de Nanobiotix en Asie. La nanoparticule testée est *PEP503*<sup>®</sup> (autre nom de *NBTXR3*<sup>®</sup>). Elle étudie la combinaison du traitement standard, radiothérapie avec chimiothérapie (Cisplatine), avec le *PEP503*<sup>®</sup> en injection intra-tumorale pour des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale localement avancés et/ou non opérables. Il s'agit d'une phase I/II dont les objectifs primaires sont l'évaluation de la dose limitante toxique et de la dose recommandée de *PEP503*<sup>®</sup> (phase I), ainsi que l'évaluation de l'activité anti-tumorale en

termes de contrôle locorégional et des effets secondaires (phase II). Les objectifs secondaires sont l'évaluation du profil pharmacocinétique de *PEP503*<sup>®</sup> et le taux de réponse radiologique et pathologique. L'étude doit inclure 42 patients<sup>194</sup>.

**(iv) Cancer de la prostate :**

L'étude NCT02805894 est une étude de phase I/II débutée en novembre 2016 et étudiant l'adjonction de *NBTXR3*<sup>®</sup> à un traitement par radiothérapie externe seule ou associée à un « boost » en curiethérapie à haut débit de dose (2 groupes). L'injection de *NBTXR3*<sup>®</sup> se fait par voie intra-prostatique, le traitement débutant dans les deux groupes 10 jours après. Les objectifs primaires sont la dose maximale tolérée et la dose limitante toxique de *NBTXR3*<sup>®</sup>, ainsi que l'établissement de la dose recommandée. Les patients doivent présenter un cancer de la prostate de haut risque ou de risque intermédiaire. 96 patients sont prévus pour cette étude, qui se déroule dans 3 centres aux USA (Los Angeles, Boston, Philadelphie)<sup>195</sup>.

**(v) Association à de l'immunothérapie :**

L'étude NCT035889339 est une étude de phase I/II non encore débutée. Elle cherche à évaluer l'ajout de *NBTXR3*<sup>®</sup> à un traitement de radiothérapie stéréotaxique pour des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou en rechute, déjà irradiés et non opérables, des lésions pulmonaires primaires ou secondaires de la tête et du cou, et des tumeurs hépatiques primaires ou secondaires de la tête et du cou. Le traitement se fait en concomitance d'un traitement par anti-PD1. Les objectifs primaires sont l'évaluation de la dose maximale tolérée, de la dose limitante toxique et de la dose recommandée (phase I), puis des taux de réponse complète radiologique et des effets secondaires (phase II). L'étude cherche à inclure 125 patients et est mise en place dans deux centres américains (Chicago et en Caroline du Nord)<sup>196</sup>.

**(vi) Cancer rectal :**

L'étude NCT02465593 est une étude de phase I/II évaluant l'association du *PEP503*<sup>®</sup> à un traitement par radiochimiothérapie pré-opératoire (5-FU/Capecitabine<sup>®</sup>) chez des patients suivis pour un adénocarcinome rectal localement avancé. Les objectifs principaux sont l'évaluation de la dose limitante toxique et du volume d'injection recommandé (phase I), et de l'activité anti-tumorale radiologique (phase II). L'injection de *PEP503*<sup>®</sup> se fait par injection par voie intra-tumorale. L'étude est ouverte depuis juin 2015, cherche à inclure 42 patients et se déroule à Taïwan<sup>197</sup>.



- **AGuIX<sup>®</sup>** :

Les *AGuIX<sup>®</sup>* sont des NPs basées sur du gadolinium et composées d'un cœur de polysiloxane. Leur diamètre hydrodynamique est de l'ordre de 3 nm. De par leurs propriétés, elles peuvent également servir comme agent de contraste pour l'IRM, faisant de ces NPs un bon exemple de traitement théranostique<sup>198</sup>.

(i) Métastases cérébrales :

L'étude NCT02820454 (NANO-RAD) est une étude de phase I débutée en juillet 2016 au CHU de Grenoble. Elle évalue l'adjonction de *AGuIX<sup>®</sup>* en injection par voie intra-veineuse unique à un traitement par radiothérapie encéphalique chez des patients suivis pour des métastases cérébrales. L'objectif principal est la détermination de la dose maximale tolérée. Les objectifs secondaires sont la mesure de la pharmacocinétique, l'évaluation de la distribution de *AGuIX<sup>®</sup>* par IRM cérébrale, la survie sans progression cérébrale et la survie globale. L'étude doit inclure 15 patients<sup>199</sup>.

(ii) Cancer du col de l'utérus :

L'étude NCT03308604 est une étude de phase I ouverte depuis octobre 2017 et étudiant l'association d'*AGuIX<sup>®</sup>* à un traitement par radiochimiothérapie (45 Gy en 5 semaines, Cisplatine hebdomadaire) et curiethérapie utérovaginale (15 Gy) chez des patientes suivies pour un cancer du col de l'utérus stade IB2-IVA. 3 injections par voie intra-veineuse d'*AGuIX<sup>®</sup>* sont prévues (J1 et J11 de la radiothérapie, puis le jour de la curiethérapie). Les objectifs principaux sont l'évaluation de la dose maximale tolérée et de la dose recommandée pour une future phase II. L'étude doit inclure 18 patientes, et se déroule à l'Institut Gustave Roussy<sup>200</sup>.



« La lutte elle-même vers les sommets suffit à remplir un cœur d'homme.

Il faut imaginer Sisyphe heureux. »

*Le mythe de Sisyphe*, Albert Camus.

## Partie III :

### Partie expérimentale : Évaluation *in-cellulo* du potentiel radiosensibilisant de Nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur des lignées cellulaires humaines de sarcome

Cette partie expérimentale s'appuie sur les résultats des expériences menées lors de mon master 2 au sein de l'équipe iRiBio au CENBG (Centre d'Études Nucléaires Bordeaux-Gradignan). Son objectif est de participer à l'amélioration des connaissances et de la compréhension de l'interaction des NPs avec leur environnement et, plus particulièrement, avec les rayonnements ionisants. Ce projet s'inscrit dans une démarche interdisciplinaire rassemblant biologistes, physiciens, chimistes et médecins impliqués au sein d'une même équipe dans le développement d'outils d'analyse et de protocoles d'étude *in-cellulo* des effets radio et nano-induit<sup>154,155,161,163,201-205</sup>. Ces études nécessitent une approche : **(i) chimique** avec la synthèse et caractérisation des NPs d'oxydes métalliques, **(ii) physique**, afin de modéliser les interactions des rayonnements ionisants avec les NPs, et **(iii) biologique**, avec la mise en place de protocoles d'exposition à l'étude des effets *in-cellulo* observés.

<b>Partie III :</b> .....	<b>147</b>
<b>Partie expérimentale : Évaluation <i>in-cellulo</i> du potentiel radiosensibilisant de Nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sur des lignées cellulaires humaines de sarcome.....</b>	<b>147</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>149</b>
1.1 Nanoparticules de TiO <sub>2</sub> .....	150
1.2 Lignée cellulaire IB115 et IB106 .....	150
1.3 Analyse par microfaisceaux d'ions (ou « <i>ion beam analysis</i> » - IBA).....	151
1.4 Questions et objectifs du travail .....	152
2. Résultats expérimentaux.....	153
<b>3. Discussion et Perspectives</b> .....	<b>161</b>
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>162</b>
<b>5. Manuscrit</b> .....	<b>163</b>



## 1. Introduction

Les voies de recherches actuelles en radiothérapie tendent à trouver un équilibre entre une meilleure efficacité anti-tumorale – en cherchant à augmenter la dose délivrée à la tumeur ou au travers d’associations thérapeutiques – et une diminution des effets secondaires – en cherchant à diminuer la dose délivrée aux tissus sains adjacents. La place des nanoparticules dans cette stratégie thérapeutique peut ainsi se retrouver à différents niveaux : en améliorant le transport de drogues dans le cas d’associations thérapeutiques, en augmentant la sensibilité ou la spécificité des moyens d’imagerie actuels, en permettant une meilleure classification des patients par des biomarqueurs, ou encore via de nouveaux modes de traitements comme le *Magnetic Drug Targeting* ou la thérapie photothermale.

Le développement des NPs de Z élevé se base quant à lui sur un postulat initial prévoyant une augmentation de la dose physique déposée dans le milieu en cas d’interaction avec les RI. Combiné aux propriétés de biodistribution spécifiques des NPs et à leur potentiel de fonctionnalisation, ce traitement permet théoriquement l’émergence d’une nouvelle thérapie délivrée *au bon endroit* et active *au bon moment*, c’est à dire sous irradiation.

Néanmoins, le mode d’action purement physique des NPs sous rayonnements ionisants est remis en cause, et leur toxicité potentielle pose des questions dans le cadre d’une utilisation clinique. Une meilleure compréhension de leur mode d’action *in vitro* et *in vivo*, intrinsèque et sous irradiation, est ainsi nécessaire. De plus, la mise en place d’analyses à haut débit permettant de définir des biomarqueurs prédictifs de réponse aux NPs est un prérequis utile pour faciliter une translation clinique dans une population plus à même de pouvoir en profiter. L’objectif de cette partie est d’analyser le comportement biologique de NPs de TiO<sub>2</sub> sur un modèle tumoral adapté, à savoir une lignée cellulaire humaine de sarcome dont la génétique et la réponse aux rayonnements ionisants ont été caractérisées, sans et avec une irradiation par photons à des doses et des énergies utilisées en clinique. Une approche d’analyse à haut débit de la réponse cellulaire aux NPs a été également développée.

Cette partie est divisée ici en trois sous-parties : **(i)** une introduction concernant les NPs de TiO<sub>2</sub>, la lignée cellulaire de sarcome étudiée et les techniques d’analyse utilisées ; **(ii)** une seconde partie résumant les résultats expérimentaux obtenus ; enfin **(iii)** une partie Discussion et Perspectives compare les résultats à la littérature et définit les suites potentielles de ce travail. Un premier manuscrit, intitulé « *Multiparametric analysis of radiation sensitivity of two sarcoma cell lines derived from patients after both electron and proton irradiations* » synthétise les résultats de l’équipe sur la caractérisation de la radiosensibilité des lignées de sarcomes. Un second manuscrit en cours de préparation fera la synthèse de mes travaux et de ceux de l’équipe iRiBio concernant l’impact des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> et le rôle du stress du réticulum

endoplasmique dans la réponse radio-induite. Je présente ici les résultats préliminaires que j'ai obtenu lors de mon année recherche passée au CENBG.

## **1.1 Nanoparticules de TiO<sub>2</sub>**

Les nanoparticules de dioxyde de Titane sont utilisées dans de nombreuses applications, médicales ou non. Leurs propriétés optiques en font un colorant particulièrement utilisé (peinture, aliments, dentifrice...), et leurs propriétés photo-catalytiques sont appréciées notamment pour des surfaces autonettoyantes ou pour purifier différents milieux liquides ou gazeux. Leur production mondiale est estimée à près de 4,7 millions de tonnes en 2009<sup>206</sup>.

Le TiO<sub>2</sub> existe sous trois formes cristallines principales : rutile, anastase et brookite. Les nanoparticules peuvent être synthétisées sous différentes formes aux propriétés différentes : sphériques (AEROXIDE P25), nanotubes, nano-aiguilles, nano-feuillets... Considéré initialement inerte, il est aujourd'hui démontré qu'il présente un profil de toxicité *via* différentes voies possibles de pénétration (cutanée, gastro-intestinale, pulmonaire)<sup>177,207</sup>.

Son potentiel radiosensibilisant a été mis en avant par Mirjolet C *et al*, qui ont montré en 2013 une radiosensibilisation de lignées humaines de glioblastome par des nanofeuillets d'oxyde de titane de 10 nm de diamètre, associée à une redistribution dans le cycle cellulaire et une diminution des processus de réparation de l'ADN<sup>137</sup>. Néanmoins, les mécanismes précis de cette radiosensibilisation ne sont pas encore clairement identifiés.

De par leur importance dans la production mondiale de NPs, la variété de leurs applications et leur possible rôle de radiosensibilisant, l'analyse de leur toxicité et des mécanismes précis à l'origine de leur potentiel radiosensibilisant est une nécessité.

## **1.2 Lignée cellulaire IB115 et IB106**

Les sarcomes sont un groupe hétérogène de tumeurs, tant par leur histologie, leur localisation, et leur réponse aux traitements. Leur prise en charge est pluridisciplinaire, impliquant souvent de la chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Du fait de leur nature souvent radio-résistante, ils font un bon groupe d'étude pour des thérapies à visée radiosensibilisantes, comme les NPs de numéro atomique élevé, et sont ainsi l'objet d'essais cliniques en ce sens<sup>188</sup>.

Dans ce contexte, l'équipe iRiBio a eu accès à des lignées cellulaires de sarcomes humains analysées et caractérisées par l'équipe du Dr Chibon à l'Institut Bergonié. Les lignées IB115 et IB106, issues respectivement un liposarcome dédifférencié présentant un profil génétique simple avec des amplifications des gènes MDM2/CDK4 sur le chromosome 12q15 et d'un sarcome hétérogène indifférencié présentant un profil génétique complexe, ont été préalablement étudiées par l'équipe du Dr Chibon (INSERM/Vinco). Giovanna Muggiolu, lors

de son travail de thèse, et Marina Simon, ont analysé et comparé leur radiosensibilité suite à des irradiations par proton (microfaisceau de la plateforme AIFIRA) et par irradiation par faisceaux cliniques d'électrons/photons à l'Institut Bergonié. Les résultats montrent une plus grande radiosensibilité d'IB115 versus IB106.

### **1.3 Analyse par microfaisceaux d'ions (ou « ion beam analysis » - IBA)**

La plateforme AIFIRA (Application Interdisciplinaire des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine), présente au CENBG permet d'analyser les caractéristiques physico-chimiques de différents matériaux à l'échelle micrométrique à l'aide de microfaisceau d'ions.

Le principe consiste à analyser un matériel en mesurant et quantifiant les émissions nées des interactions entre les composants du matériel analysé et les particules émises par un microfaisceau de particules chargées (proton de quelques MeV). L'analyse de ces interactions fournit des informations qualitatives et quantitatives sur la composition du matériel analysé, et permet de reconstituer une carte bi-dimensionnelle des éléments chimiques (à partir du Na jusqu'aux éléments les plus lourds) présents dans ce matériel, donnant ainsi leur distribution spatiale. Il s'agit donc d'une méthode d'analyse sensible, non-destructive, quantitative et multi-élémentaire, permettant d'analyser la composition chimique d'un objet à l'échelle micrométrique : la mesure de l'homéostasie intracellulaire, la détection, la quantification et la localisation de NPs métalliques et d'oxydes métalliques sont donc possibles.

La plateforme AIFIRA possède une microsonde nucléaire composée d'un faisceau focalisé alimenté par un accélérateur de particules de 3,5 MeV Singletron<sup>TM</sup> (HVEE, The Netherlands) et d'un système de balayage à haute résolution. Les techniques d'analyse employées sont la micro-analyse par PIXE (ou « *Particule-Induced X-Ray Emission* »), l'analyse RBS (ou « *Rutherford Backscattering Retrodiffusion* ») et la STIM (ou « *Scanning Transmission Ion Microscopy* »), via l'utilisation d'un microfaisceau de protons de 1.5 MeV (avec une résolution de l'ordre de 700 nm de diamètre).

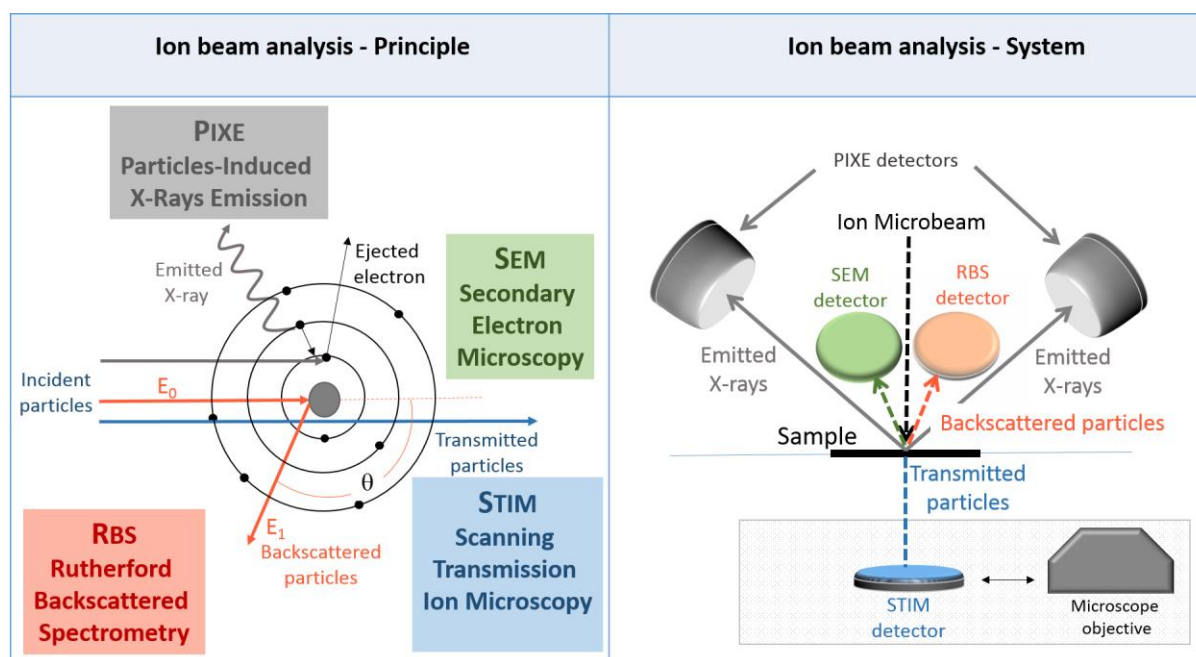
La micro-analyse PIXE mesure l'émission de photons X nées de la collision d'un proton incident avec les électrons de la couche interne (couche K) des atomes rencontrés. La composition atomique est alors déterminée en analysant le spectre de photons émis, et leur localisation bidimensionnelle est également accessible.

La RBS mesure quant à elle l'énergie de protons rétrodiffusés après collision élastique avec les noyaux des atomes cibles. La distribution énergétique des protons rétrodiffusés est analysée et permet de déterminer la masse de composés organiques, ainsi que leur composition en éléments de bas numéro atomique comme l'oxygène, le carbone ou l'azote.



La STIM mesure l'énergie perdue par un faisceau de particules après sa traversée du matériel à analyser. Le principe est similaire à une radiographie standard : l'atténuation énergétique dépendant de l'épaisseur, de la densité et de la masse des éléments traversés, on peut déduire de ces mesures les changements locaux de densité cellulaires ou de structures intracellulaires, et également mesurer l'épaisseur du matériel analysé.

Ces techniques combinées permettent ainsi d'analyser la présence de NPs inorganiques comme les NPs de  $\text{TiO}_2$  au sein de structures cellulaires, mais également de les quantifier et les localiser. Elles permettent également d'étudier leur influence sur l'homéostasie cellulaire en analysant la composition mutli-élémentaire des cellules exposées.



**Figure 41 :** Principes de l'analyse par faisceaux d'ions et système pour les échantillons biologiques. La STIM est utilisée pour cartographier les aires de densité cellulaire par mesure de la perte d'énergie du faisceau incident. Les analyses par PIXE et RBS permettent d'obtenir la distribution spatiale et la quantification des éléments chimiques à l'échelle de la cellule unique.

### 1.4 Questions et objectifs du travail

Le développement des NPs de Z élevé à visée de radiosensibilisation en combinaison à la radiothérapie pose plusieurs questions, notamment les questions du mécanisme précis impliqué et les éventuelles voies cellulaires nano-induites (toxicité). Le comportement des NPs en milieu cellulaire, notamment leur internalisation et leur localisation, doit également être précisé. L'utilisation de modèles cellulaires d'intérêt, représentant un groupe de pathologie qui bénéficierait potentiellement d'une translation clinique, doit être privilégié. La détermination de biomarqueurs prédictifs d'efficacité et l'implémentation de méthodes d'analyses à haut débit doit être également conduit de façon parallèle.

Dans ce contexte, le travail proposé ici s'inscrit dans la continuité des travaux précédents du groupe iRiBio portant sur les NPs de TiO<sub>2</sub>, la lignée cellulaire humaine de sarcome IB115 et son comportement sous irradiation. Les objectifs posés sont donc : **(i)** d'étudier les interactions entre IB115 et des NPs de TiO<sub>2</sub>, en étudiant leur localisation intracellulaire et en quantifiant cette internalisation, en combinant des analyses par microscopie de fluorescence et par IBA ; **(ii)** d'analyser l'impact de ces NPs sur le métabolisme cellulaire et plus précisément les voies cellulaires en lien avec l'homéostasie calcique (apoptose, intégrité mitochondriale, niveau d'expression des voies du stress du Réticulum Endoplasmique et des défenses antioxydantes) ; **(iii)** d'analyser l'impact des RI au niveau moléculaire et transcriptionnel, en présence ou non de NPs de TiO<sub>2</sub> sur ces mêmes voies ; **(iv)** de participer au développement d'une technique d'analyse à haut débit des voies moléculaires impliquées dans la réponse cellulaire à l'irradiation et à l'exposition aux NPs, par l'utilisation de gènes dits « rapporteurs » transcriptionnels luminescents (en collaboration avec la plateforme BMYScreen de l'Institut Bergonié).

## **2. Résultats expérimentaux**

Afin de répondre aux objectifs fixés, une approche interdisciplinaire est nécessaire afin de prendre en compte les aspects biologiques, physiques et médicaux impliqués. L'approche biologique a été permise par l'expertise de l'équipe iRiBio, sous la direction de Hervé Seznec, concernant les analyses par IBA, par immunofluorescence et par RTqPCR. Un partenariat avec le service de radiothérapie de l'Institut Bergonié, notamment avec le Pr Guy Kantor et le physicien médical Mikael Antoine, a permis de développer des protocoles d'irradiation des cultures cellulaires par photons de 6 MeV sur un accélérateur linéaire utilisé en clinique (CLINAC, *Varian Medical System*). Un partenariat avec la plateforme BMYScreen (Nicolas Dejeans, Institut Bergonié) a permis la mise en place d'un protocole d'analyse à haut débit de voies moléculaires d'intérêt au niveau transcriptionnel par une méthode de rapporteurs transcriptionnels luminescents. Enfin, un partenariat avec le laboratoire du Dr Chibon à l'Institut Bergonié (INSERM/Vinco) a permis de réaliser sur place la préparation des lignées cellulaires avant et après irradiation par photons, ainsi que l'utilisation de lignées cellulaires d'intérêt (IB115). La méthodologie employée pour les différentes analyses menées sont développées dans le manuscrit.

La localisation et la quantification des NPs de TiO<sub>2</sub> (nanofeuillets de 178 x 9 nm) après exposition des IB115 ont été analysées par immunofluorescence *via* un immunomarquage des NPs par du TRITC, et par micro-analyse chimique sur la plateforme AIFIRA. Les résultats

montrent une internalisation cytoplasmique et périnucléaire des NPs, dose dépendante, et de quantité hétérogène au sein de la population cellulaire étudiée (figure 42).

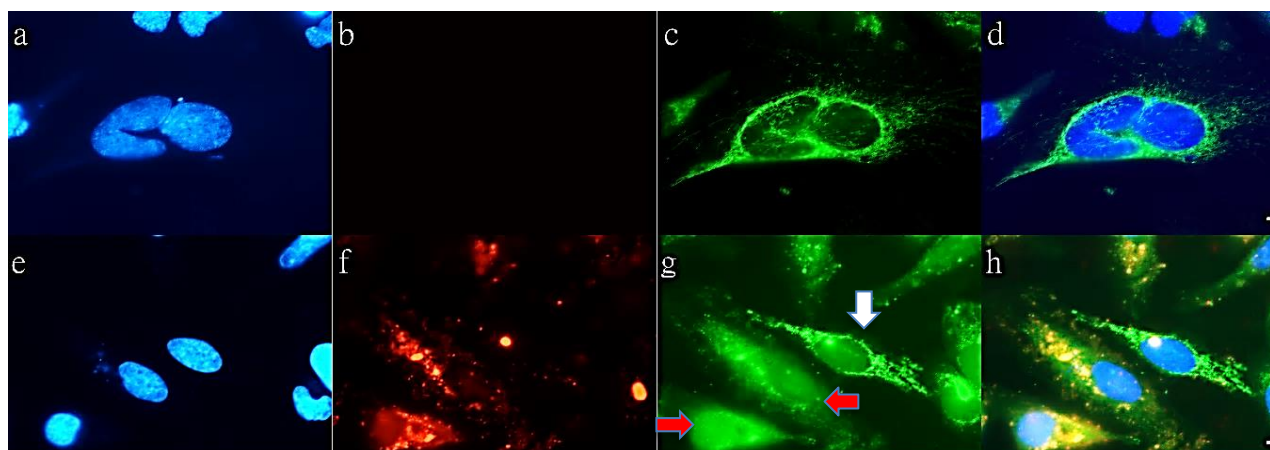


Figure 42 : La présence des NPs de TiO<sub>2</sub> induit la libération cytosolique du cytochrome C. Cellules IB115 exposées 24h à 2 μg.cm<sup>-2</sup> de NPs TiO<sub>2</sub> fixées et observées en microscopie en épifluorescence après immunodétection du cytochrome C. (a-d) cellules IB115, (e-h) cellules IB115 exposées. (a, e) Noyaux cellulaires révélés par marquage Hoechst<sup>33342</sup> (bleu), (b, f) NPs TiO<sub>2</sub> visualisées grâce à leur greffage Rhodamine (TRITC, rouge). (c, g) cytochrome C révélé par immunodétection et couplage d'un anticorps secondaire fluorescent *AlexFluor*<sup>488</sup> (vert) (d, h) *merge*.. Échelle 10 μm, grossissement 63 X.

Leur internalisation s'accompagne par une libération cytosolique du cytochrome C et une activation de la voie apoptotique mitochondriale, mise en évidence par immunofluorescence. Ces effets dépendent de la quantité de NPs internalisés, et mettent en évidence une altération du métabolisme mitochondrial par les NPs. La figure 42 montre la libération cytosolique du cytochrome c en présence de NPs de TiO<sub>2</sub>, mise en évidence par immunofluorescence (f-g-h). On remarque que la quantité internalisée de NPs à un impact sur sa libération (g, flèche blanche : peu d'internalisation et peu de libération ; flèches rouge : internalisation et libération importantes).

L'analyse par microfaisceau d'ions a été conduite afin d'étudier l'internalisation des NPs ainsi que les altérations de l'homéostasie cellulaire après exposition à des NPs de TiO<sub>2</sub>, avec ou sans irradiation. Les cellules ont été exposées ou non à des de NPs de TiO<sub>2</sub> (2μg.cm<sup>-2</sup>), et irradiées à des doses croissantes de photons sur un accélérateur linéaire clinique (0, 1, 2 et 6 Gy). Les résultats préliminaires, comme mis en évidence sur la figure 43, montrent une hétérogénéité de l'internalisation cellulaire des NPs, confirmant les observations précédentes (figure 43-panel de gauche). Cette analyse met également en évidence que l'internalisation de NPs de TiO<sub>2</sub> induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, soulignant le rôle de la voie calcique dans leur toxicité. Par ailleurs, l'irradiation cellulaire conduit également à une

augmentation du taux de calcium intracellulaire, et de façon remarquable une augmentation plus marquée de la concentration calcique est obtenue lors de la combinaison RI-NPs, comme mis en évidence sur la figure 43-panel de droite). Ces résultats mettent ainsi en avant le rôle de l'homéostasie calcique dans les effets biologiques intrinsèques des NPs de TiO<sub>2</sub>, mais également dans leurs mécanismes de radiosensibilisation.

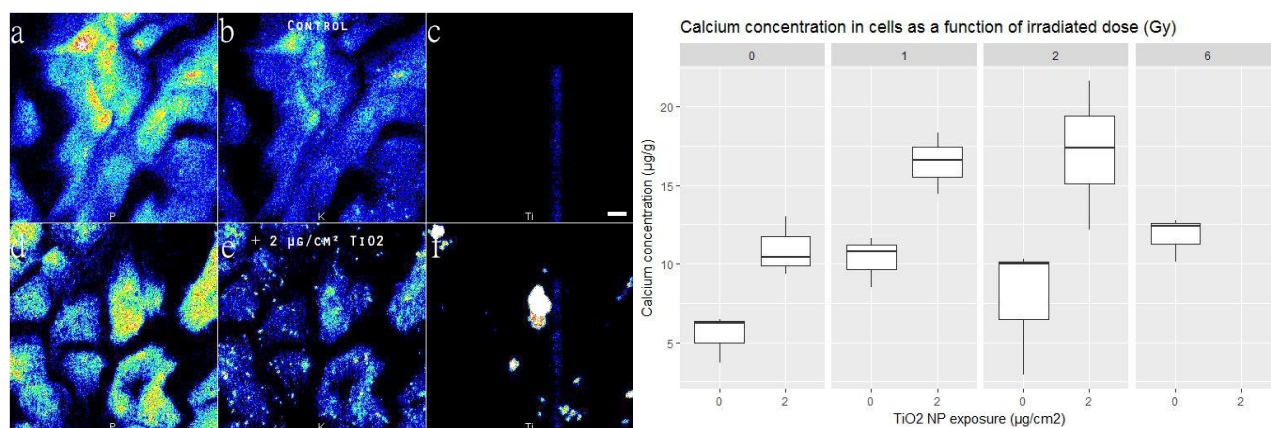


Figure 43 : 1. Cartographie multi-élémentaire par IBA pour des IB115 exposées pendant 24h à  $2\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de NPs de TiO<sub>2</sub> (d-f) ou non (contrôles, a-c). Distribution du Phosphore (a, d), du potassium (b, e), du Titane (c,f). Échelle :10 µm. 2. Concentrations calciques intracellulaires en fonction de la dose d'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> et de la dose d'irradiation. Une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire est observée lors de l'exposition à  $2\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , équivalente à celle obtenue par une exposition à 1Gy seule. A 1 Gy et  $2\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , importante augmentation de la concentration du calcium intracellulaire. A 6 Gy, l'analyse de l'exposition aux NPs est impossible du fait d'une mortalité cellulaire trop importante.

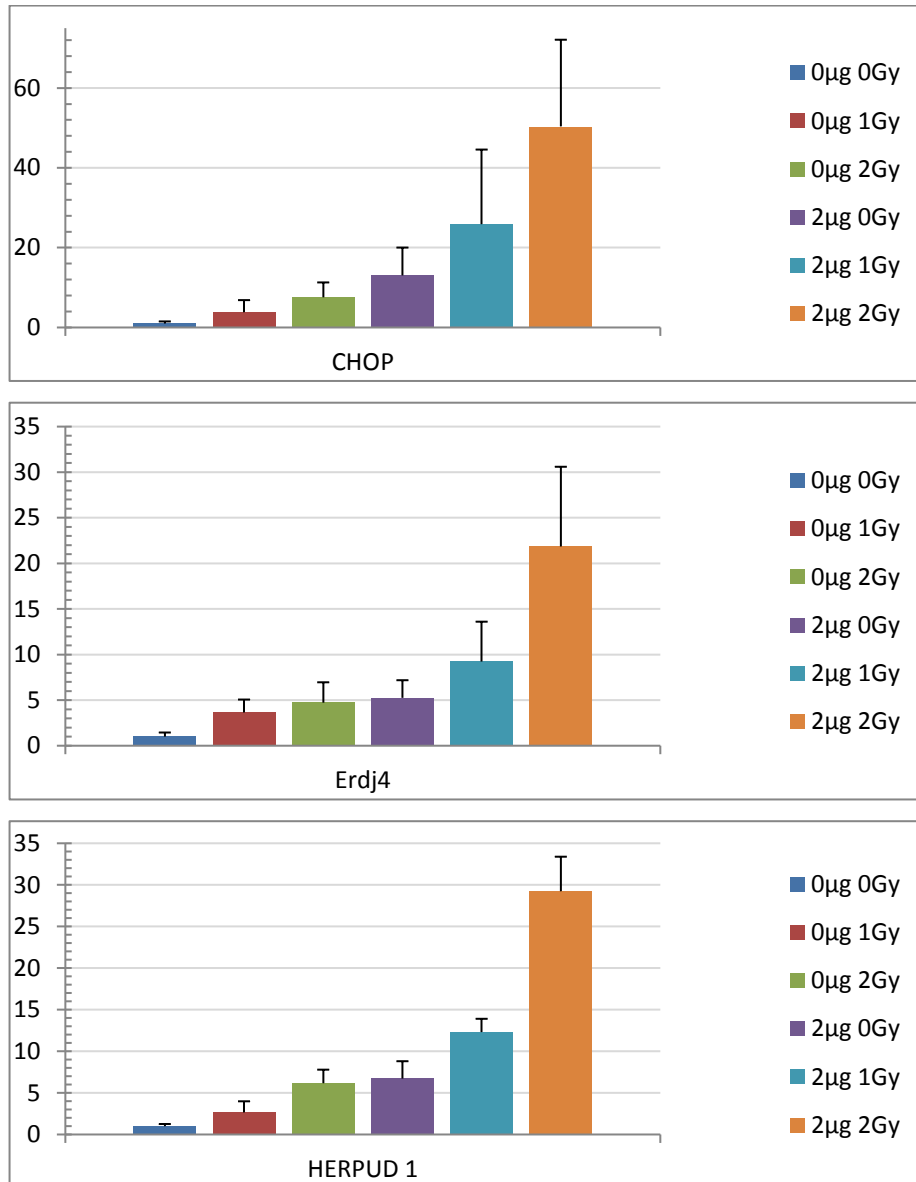
Ces premières analyses ont ainsi pu mettre en évidence que **(i) les NPs sont internalisées et induisent une altération de l'homéostasie calcique fonction de la quantité de NPs internalisées ; (ii) les NPs activent la voie apoptotique mitochondriale ; (iii) les NPs et les RI induisent des augmentations de concentration intracellulaire du calcium d'amplitudes similaires. Ces dernières données sont en cours d'analyses et ont été réalisées sur les 2 lignées cellulaires IB115 et IB106. Une différence de réponse a été observée entre les 2 lignées et la quantification précise de cette réponse est actuellement en cours.**

Afin de compléter ces données, ont été étudiées l'induction de voies de stress cellulaire en réponse à l'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> et à l'irradiation. Les voies du stress du réticulum endoplasmique et du stress oxydant ont été analysées par une approche « gène candidat » par RTqPCR, après exposition à des doses croissantes de NPs de TiO<sub>2</sub> (0, 2 ou  $4\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) et de rayonnements ionisants (0, 1 et 2 Gy). Les résultats mettent en évidence que la présence de NPs de TiO<sub>2</sub> induit une expression marquée de la voie du stress du RE, *via* une augmentation de l'expression des transcrits des gènes CHOP, Herpud1 et Erdj4. Le Réticulum Endoplasmique

étant un élément clé de l'homéostasie calcique intracellulaire, ces résultats et les précédents vont dans le sens de l'importance de cette organelle dans la toxicité médiée par les NPs de TiO<sub>2</sub>. L'analyse des voies du stress oxydant, au travers la mesure de l'expression de protéines de la défense anti-oxydante, retrouve une diminution de l'expression de SOD2 en présence de NPs de TiO<sub>2</sub>, allant dans le sens d'une diminution des défenses anti-oxydantes. Cette protéine étant mitochondriale, ceci renforce l'hypothèse précédente d'une toxicité mitochondriale des NPs de TiO<sub>2</sub> chez IB115.

L'irradiation par photon induit également une activation de la voie du stress du RE, et ceci de façon dose-dépendante. Le niveau d'activation de cette voie semble ainsi équivalent entre une irradiation de 2 Gy et une dose d'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub> de 2 µg.cm<sup>-2</sup>. De façon remarquable, la combinaison NPs et rayonnements ionisants potentialise fortement l'activation de la voie du stress du réticulum endoplasmique, comme mis en évidence sur la figure 44.

Ces observations mettent en avant l'importance de la voie du stress du RE dans la réponse cellulaire à l'irradiation, et permettent d'avancer une hypothèse de **radiosensibilisation** par les NPs de TiO<sub>2</sub> médiée par cette voie. Le **réticulum endoplasmique** étant un organelle clé de la régulation de l'homéostasie calcique, ces résultats permettent, avec les résultats précédents montrant une augmentation calcique fonction de l'exposition aux NPs et aux rayonnements ionisants (figure 43 panel de droite), de le considérer non seulement comme un **élément central du processus de radiosensibilisation par les NPs**, mais également comme un **élément important de la réponse cellulaire à l'irradiation**, dont le rôle précis et l'importance relative dans la radiosensibilité de différentes lignées cellulaires doit être précisé.

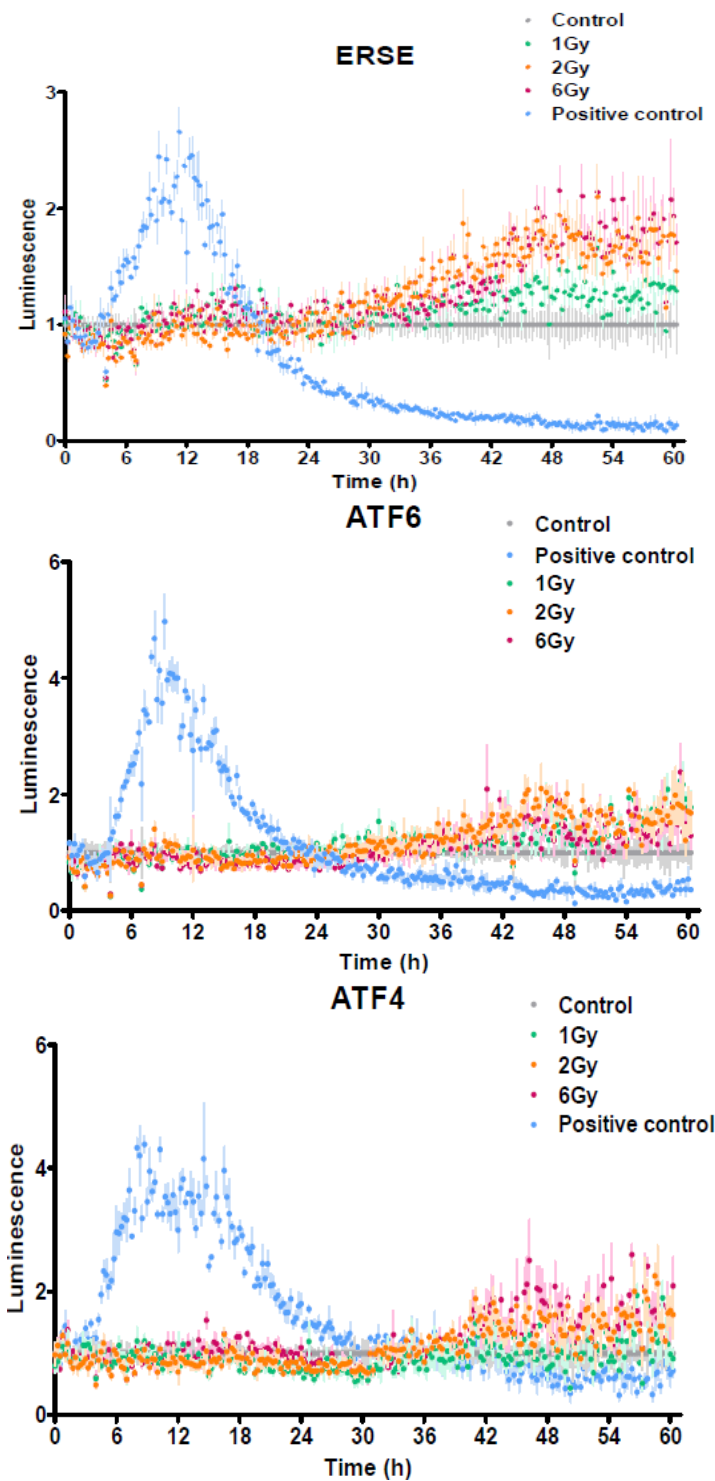


**Figure 44:** Les NPs potentialisent la réponse des voies du stress du RE à l'irradiation. Les ARN de cellules IB115 exposées 24 h à 0 ou 2  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de NPs de  $\text{TiO}_2$  et irradiées à 0, 1 ou 2 Gy ont été rétro-transcrits et analysés par PCR quantitative. Résultats normalisés sur 18S. Diagramme représentant l'expression des gènes CHOP, ERDJ4, HERPUD1.

La mise en place de façon parallèle d'une méthode d'analyse à haut débit de voies moléculaires d'intérêt, afin de préparer le terrain d'éventuels tests diagnostiques, est une nécessité pour le développement clinique des NPs : cette méthode a pour objectif de multiplier simultanément les conditions d'analyses et de tester ainsi de nombreuses lignées cellulaires et différents types de NPs, afin de tendre vers un test « pré-clinique » de sensibilité cellulaire qui pourrait être transposé en recherche clinique. Du fait de leurs propriétés spécifiques, l'élaboration de protocoles adaptés est un défi.

La plateforme BMYScreen, cellule de transfert située à l'Institut Bergonié (U Bordeaux-INSERM-ADERA) et développée par Nicolas Dejeans, développe des stratégies de mesure de l'activation de voies moléculaires d'intérêt au niveau transcriptionnel *via* un système de rapporteurs luminescents (Luciférase) dans une approche de screening à haut débit. L'objectif était donc de mettre au point un protocole d'analyse permettant d'étudier *via* cette approche, les conséquences transcriptionnelles de l'exposition d'IB115 aux rayonnements ionisants et aux NPs de TiO<sub>2</sub>. L'analyse portait notamment sur la voie du stress du Réticulum Endoplasmique (ATF4, ATF6, ERSE).

Comme mis en évidence précédemment, l'exposition d'IB115 à des doses croissantes de rayonnements ionisants (1, 2 et 6 Gy) induit une activation des voies du stress du RE, significative pour les conditions 2 et 6 GY à partir de la 36<sup>ème</sup> heure (figure 45). Ces données confirment donc les résultats obtenus précédemment, et appuient le rôle que semble jouer le stress du Réticulum Endoplasmique dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants.



**Figure 45:** Analyse de l'activation de la transcription des voies ERSE, ATF6 et ATF4 (voies du stress du RE) mesurée par un test à la Luciférase sur la plateforme BMYScreen. Cellules IB115 transfectées pour les gènes rapporteurs ERSE, ATF6 et ATF4 et irradiées aux doses de 0, 1, 2 ou 6 Gy (photons 6 MV). 1 Gy (courbe verte), 2 Gy (courbe orange), 6 Gy (courbe rose), contrôle positif par de la Tunicamycine (courbe bleue), contrôle non irradié (courbe grise). Une augmentation de la transcription des différentes voies du stress du RE est observée à partir de 36h, pour 2 et 6 Gy concernant ATF6, ATF4 et ERSE, et également à 1 Gy pour ERSE.



Néanmoins, l'exposition cellulaire à des doses croissantes de NPs ne retrouvent aucune activation transcriptionnelle des voies étudiées par rapport à l'échantillon contrôle. Ces données n'étant pas en accord avec les résultats de la RTqPCR, se pose la question d'un problème d'exposition aux NPs et donc d'un déficit d'internalisation lors de l'analyse sur la plateforme BMYScreen. Le protocole nécessite en effet une exposition au passage en plaque 384 puits, à la différence des analyses précédentes réalisées en plaque 6 puits. Les conditions d'expositions aux NPs étant très sensibles aux paramètres physico-chimiques (température, pH, tension de surface...), des modifications de ces paramètres peuvent induire une absence de contact entre les cellules et les NPs. La réalisation d'un contrôle positif (gène transfecté constitutionnellement actif, et exprimant donc la Luciférase à taux constant) exposé à la Tunicamycine (inducteur du stress du Réticulum Endoplasmique et toxique cellulaire) ou à différentes doses de NPs, va dans le sens d'une absence d'interaction des NPs avec les cellules : alors que la luminescence mesurée pour la tunicamycine baisse progressivement du fait de la toxicité cellulaire induite, aucune diminution de luminescence n'est retrouvée pour les conditions NPs. Ces résultats peuvent être en faveur d'une absence d'interaction entre les NPs et les cellules dans ces conditions d'analyse, et mettent en avant la difficulté d'établir un protocole adapté d'analyse à haut débit en présence de NPs, du fait de leurs propriétés spécifiques. Ceci témoigne de la complexité d'établir des protocoles d'analyses répondant aux spécificités des interactions des NPs avec leur milieu biologique, et confirme la nécessité de l'interdisciplinarité des nanosciences.

L'ensemble de ces analyses permet donc de mettre en avant que la réponse cellulaire d'IB115 aux NPs de  $\text{TiO}_2$  s'exprime à travers une modification de l'homéostasie calcique, *via* l'activation de la voie du stress du réticulum endoplasmique, et une apoptose médiée par une réponse mitochondriale. Ces NPs présentent ainsi, de façon intrinsèque, une action biologique importante. Par ailleurs, la réponse cellulaire à l'irradiation passe également par une activation de la voie du stress du réticulum endoplasmique, et l'utilisation combinée de rayonnements ionisants et de NPs potentialise l'activation de cette voie. Les effets médiés par les NPs sont par ailleurs dépendant de leur dose d'internalisation cellulaire, hétérogène au sein d'une population cellulaire, mettant en avant l'importance d'étudier les mécanismes d'internalisation.

### **3. Discussion et Perspectives**

Les méthodes d'analyses utilisées dans ce travail, notamment la micro-analyse par faisceau d'ions, permettent de mettre en avant des résultats originaux. La mise en évidence d'une altération de l'homéostasie calcique intracellulaire en réponse à l'exposition aux NPs de TiO<sub>2</sub>, dépendant de leur taux d'internalisation, est une première dans une lignée cellulaire tumorale humaine. Ces résultats corroborent ceux obtenus par l'équipe iRiBio chez des lignées cellulaires primaires (PHFK et HUVEC)<sup>161,163</sup> et confirment le rôle prépondérant de l'équilibre calcique dans la réponse aux NPs. De la même façon, la mise en évidence de l'implication de la voie du stress du Réticulum Endoplasmique en réponse aux NPs de TiO<sub>2</sub> vient confirmer les résultats du même groupe, qui mettaient également en évidence une activation de cette voie chez la lignée HUVEC<sup>161</sup>.

L'originalité de ce travail est la mise en évidence d'une activation de la voie du stress du RE dans la réponse aux rayonnements ionisants, et sa potentialisation par la présence de NPs. D'une part, cela met en avant l'importance de cette voie de stress cellulaire dans les mécanismes de réponse cellulaire à l'irradiation, et confirme que l'ADN n'est pas la seule cible des RI. L'induction du stress du RE par les RI est également retrouvée dans la littérature<sup>208</sup>, et son rôle dans la radiosensibilité ou la radiorésistance de certaines lignées, notamment en modulant les processus de réparation de l'ADN, a été évoqué en 2013 par T.Yamamori *et al*<sup>209</sup>, confirmant l'intérêt que peut représenter l'étude de cette voie pour analyser les radiosensibilités de lignées différentes ou développer une nouvelle méthode de radiosensibilisation. Le rôle du réticulum endoplasmique dans l'oncogenèse semble en faire par ailleurs une cible privilégiée pour le développement de nouveaux traitements ciblés<sup>210</sup>. L'analyse comparative de l'induction de la voie du stress du RE par une irradiation chez une lignée cellulaire plus radiorésistante qu'IB115, comme IB106, serait dans ce cadre intéressante à mener.

Par ailleurs, la mise en évidence d'une potentialisation de la voie du stress du Réticulum Endoplasmique par le co-traitement NPs-rayonnements ionisants est non seulement une première, mais fournit également un mécanisme permettant d'expliquer en partie la sensibilisation par les NPs de TiO<sub>2</sub> *via* l'existence de cette voie d'action commune. Si le processus précis de l'altération de cette voie par l'un ou l'autre des traitements n'est pas spécifiquement élucidé, cette potentialisation met en avant l'effet biologique intrinsèque des NPs, et leur rôle dans la phase biologique du temps radiobiologique. Ainsi, ce travail permet non seulement de montrer que ces NPs de TiO<sub>2</sub> ne sont pas inertes – présentant donc potentiellement un profil de toxicité à définir -, et que leurs mécanismes de sensibilisation aux RI s'apparentent, du moins en partie, à une radiosensibilisation, remettant en question le

postulat initial de radiopotentialisation « pure » des NPs de numéro atomique élevé, de façon concordante avec les données de la littérature<sup>26,27,137</sup>.

La mise en évidence d'un effet cellulaire dépendant de la dose de NPs internalisée, et de l'hétérogénéité de l'internalisation des NPs au sein d'une même population cellulaire dans des conditions *in vitro*, posent également des questions. Dans le cadre d'une utilisation clinique, l'analyse précise de la localisation des NPs au sein du volume tumoral et au sein des cellules – tumorales ou normales – devra être réalisée de façon précise, et la recherche d'une dose minimale internalisée, voire d'une localisation sub-cellulaire particulière (notions de « dose minimale efficace » et de « localisation efficace »), devront être déterminées. Les NPs pouvant être fonctionnalisées, la connaissance précise de ces paramètres, ainsi que leur distribution biologique dans des modèles *in vivo*, est cruciale pour leur développement. Les analyses par IBA, comme exposées dans ce travail, peuvent de ce fait constituer un puissant outil afin d'investiguer ces questions.

Enfin, notre travail a pu mettre en évidence la difficulté de développer des protocoles d'analyse à haut débit adaptés aux spécificités des NPs. L'intérêt du screening à haut débit est de pouvoir déterminer, en analysant simultanément plusieurs lignées cellulaires, lesquelles sont sensibles ou non à un traitement spécifique, permettant le développement de marqueurs prédictifs utiles non seulement pour la décision thérapeutique mais également pour la construction d'essais cliniques. Poursuivre les recherches en ce sens, de façon parallèle au développement de nouvelles thérapeutiques, est donc crucial.

#### **4. Conclusion**

Les NPs de numéro atomique élevé sont une voie de recherche intéressante afin d'améliorer le ratio thérapeutique de la radiothérapie. Le postulat physique initial soutenant leur utilisation ne peut expliquer à lui seul les effets observés, et une action biologique propre des NPs, notamment *via* l'induction de voies du stress du Réticulum Endoplasmique, participe à leur efficacité : si la radiopotentialisation des NPs de Z élevé est possible et probable, leur radiosensibilisation est également une réalité qui ne doit pas être ignorée. Leurs effets biologiques intrinsèques amènent ainsi à se poser la question de leur éventuelle toxicité, notamment dans le cadre d'une utilisation clinique, et à en finir avec le mythe de leur supposée inertie biologique. Ces résultats, sans remettre en question leur potentiel thérapeutique, mettent en avant la nécessité d'investiguer de façon plus précise leurs mécanismes d'action - physiques, chimiques ou biologiques - afin de pouvoir envisager une translation clinique dans des conditions de sécurité et d'efficacité optimales.

## 5. Manuscrit

### **Multiparametric analysis of radiation sensitivity of two sarcoma cell lines derived from patients after both electron and proton irradiations.**

Giovanna Muggiolu<sup>1,2</sup>, Marina Simon<sup>1,2</sup>, Florent Vilotte<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Dejeans<sup>3</sup>, Guillaume Devès<sup>1,2</sup>, Mikael Antoine<sup>3</sup>, Guy Kantor<sup>1,3</sup>, Frédéric Chibon<sup>4</sup>, Philippe Barberet<sup>1,2</sup> and Hervé Seznec<sup>1,2,\*</sup>

## **Multiparametric analysis of radiation sensitivity of two sarcoma cell lines derived from patients after both electron and proton irradiations.**

Giovanna Muggioli<sup>1,2</sup>, Marina Simon<sup>1,2</sup>, Florent Vilotte<sup>1,2,3</sup>, Guillaume Devès<sup>1,2</sup>, Mikael Antoine<sup>3</sup>, Guy Kantor<sup>1,3</sup>, Frédéric Chibon<sup>4</sup>, Philippe Barberet<sup>1,2</sup> and Hervé Seznec<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>University of Bordeaux, Centre d'Etudes Nucléaires Bordeaux Gradignan (CENBG), UMR 5797, Gradignan, France; <sup>2</sup>CNRS, IN2P3, CENBG, UMR 5797, Gradignan, France; and <sup>3</sup>Department of Radiotherapy, Institut Bergonié, Bordeaux, France; <sup>4</sup>Genetics and Biology of Sarcomas INSERM U1218, Department of Biopathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

### **Abstract**

*In vitro* radiobiological studies permit to characterize the responses of cancerous cells exposed to ionizing radiations. A better understanding of radiation sensitivity of rare tumors exposed to different ionizing radiations is a today challenge and can be improved by a multi-parametric analysis of radiation induced biological responses.

We report the effects of (i) two types of ionizing radiations (electrons and protons), (ii) two modes of delivery using different dose distributions at the cellular scale (focused beam *versus* broad beam), and (iii) we take in account the genetic characteristics of two patient's derived sarcoma cell lines having a simple or complex genomic profile. First, we establish a method based on Monte Carlo simulations to ensure that the mean delivered dose on a cell monolayer is comparable for different irradiation modalities (electrons and protons). Then, we evaluate the cellular response of two selected sarcoma cell lines to ionizing radiations by investigating three biological endpoints: radiation-induced DNA damage, proliferation and surviving fraction assays. For the endpoints analyzed, we show a higher efficacy of protons with respect to electrons and a marked radiation resistance associated with the complex genetics of one sarcoma cell line.

### **Introduction**

Optimizing the therapeutic benefit of radiation therapy requires the improvement of the beam ballistics and the Relative Biological Efficiency (RBE) of the radiation inside the tumor. The main current developments in radiation therapy are based on these ideas with the final aim to increase the radiation-induced effects in the tumor volume as well as decrease the dose delivered to the surrounding healthy tissues. Several strategies have shown interesting features such as the use of heavy charged particles having an high-LET (Linear Energy Transfer) such as hadrons and protons<sup>1-3</sup>, and nowadays Microbeam Radiation Therapy (MRT) with X-rays or heavy ions is largely studied<sup>4-6</sup>. However, the action mechanisms involved at the cellular scale

and the biological efficacy of protons *versus* low-LET radiations are not completely understood<sup>7</sup>. And less is known about the biological efficacy of a millimeter-sized pencil beam, used in MRT, scanned on a determined area<sup>8</sup>. Additionally, the success of radiation treatments not only depends on the total dose delivered to the tumor and on the protection of healthy tissues surrounding the tumor, but also from the intrinsic properties of the tumor cells<sup>9</sup>.

For a better understanding, it is crucial to carry out experiments on *in vitro* well-characterized biological models and in highly-controlled conditions<sup>10</sup>. Several parameters must be considered to obtain a correct evaluation of the cells radiation sensitivity such as the type of ionizing radiation (IR), the irradiation modalities, the genetic characteristics, and the biological endpoints considered.

In the present study we considered all these parameters together. We compared two ionizing radiations: electrons and protons. Electrons are routinely used to treat patient's superficial tumors at the Institut Bergonié (Bordeaux) and are produced by a medical linear accelerator (Clinac 21EX© from VARIAN<sup>TM</sup>). Protons are delivered by an original irradiation setup based on a charged particle microbeam<sup>11</sup>, allowing to target living cells with a micrometer precise energetic proton beam. This setup permits different energy depositions at the cellular scale, by using a proton microbeam or a proton broad beam. To ensure that the mean delivered dose by these two irradiation systems and by two irradiation modes is equivalent, we performed the dosimetry at the cellular scale using Monte Carlo techniques<sup>12</sup>.

We investigate the biological responses of two patient's derived sarcoma cell lines for different reasons. First, sarcomas are a group of tumors, which heterogeneity is defined by the anatomic sites, the patient's age and the varying histology. Second, they could be radiation-induced and have a very variable radio-responsiveness dependent on histology, genetics and type of radiation<sup>13-15</sup>. Third, radiation sensitivity of soft tissue sarcomas is generally low and requires high levels of dose. Thus, increasing the efficacy of radiation therapy represents a good strategy to improve sarcomas treatment and reduce associated side effects<sup>16</sup>. In addition, during last years, numerous studies are defined different representative group of sarcomas based on their genetic expression profiles<sup>9,17-21</sup>. In particular, Chibon *et al.* described three different genomic profiles recurrent in sarcomas<sup>18</sup>. According to this classification, sarcomas having a simple *amplicon* profile based on few co-amplifications belong to a first group, which is represented almost exclusively to dedifferentiated liposarcomas. A second group includes sarcomas with few alterations that involve a full chromosome arm or entire chromosomal gain or loss. And, a third group is constituted by all other unclassified sarcomas, which are characterized by a high level of chromosomal complexity and tumor aggressiveness. Two sarcoma cell lines were selected from the sarcoma collection of the Institut Bergonié (IB): a dedifferentiated

liposarcoma (IB115) and an unclassified heterogenic sarcoma (IB106), belonging to the first and the third group, respectively<sup>18</sup>.

In this report, we evaluated the *in vitro* radiation sensitivity of these well-characterized sarcoma cell lines considering simultaneously three biological end points: (i) single cell *in situ* quantitative co-localization of phosphorylated H2AX (called  $\gamma$ H2AX) and ATM (called P-ATM) radiation-induced foci, (ii) cellular proliferation, and (iii) the commonly used survival fraction assay (SF).

The survival fraction is considered to be the optimal and well-recognized test for *in vitro* radiation studies<sup>22–26</sup>. However, it is limited by the ability of cells to form colonies, and is less reliable for cells with a low colony-forming capability<sup>27,28</sup>. The estimation of cell growth by cell proliferation assay is a largely used test to evaluate the *in vitro* radiation sensitivity<sup>29,30</sup>. In addition, the analysis of induction and quantification at 2 and 20 h after irradiation of radiation-induced foci (IRIF) can be used as an endpoint to measure the cell radiation sensitivity<sup>27,28,31–37</sup>. In particular, the behavior of both P-ATM and  $\gamma$ H2AX, which are (i) two proteins involved in DNA damage and repair signaling and (ii) phosphorylated on specific and well-characterized residues at DNA Double Strand Break (DSB) sites after ionizing radiation exposure is analyzed (in a time- and dose-dependent manner)<sup>33</sup>.

The performed multi-parametric analysis reveals a different radiation sensitivity of selected cell lines for the analyzed endpoints. In addition, we show that *in vitro* exposure to protons induces marked effects with respect to electrons. No differences are observed after two protons energy distributions at the cellular scale. It remains a challenge to explain the mechanisms that induce their respective responses. However, this work underlined the importance of *in vitro* radiation biological studies for investigation the effects induced by different particles on rare characterized tumors to develop and optimize therapeutic approaches.

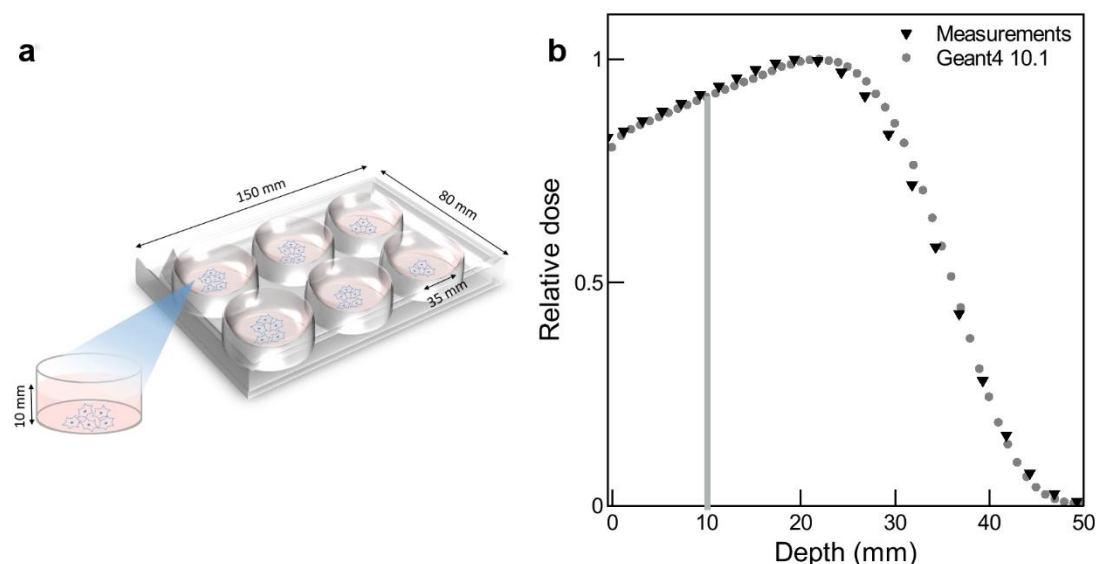
## Results

### Irradiation, calibration and dosimetry

#### *Electron dosimetry*

Irradiation protocols using standard cell culture supports (6-well plate) and a medical facility (electron, 9 MeV, Clinac) were optimized by measuring the percentage of absorbed dose at a given depth (PDD) along the beam axis. Monte Carlo simulations (Geant4 10.1) describing the radiation sources (spectra and angular distributions of electrons and photons)<sup>38</sup> are in agreement with routine measurements performed by the medical physicists in according to IAEA TRS 398 protocols.

The PDD shows that the maximum relative dose is delivered at 22 mm in depth. As illustrated in Fig. 1, standard cell culture well (6-well plate) allows one to grow cells at 10 mm depth when covered with 9.6 ml of culture medium. By consequence, at this depth we reached 93% of the maximum relative dose as shown by experimental measurements and Monte Carlo simulations (Fig. 1).



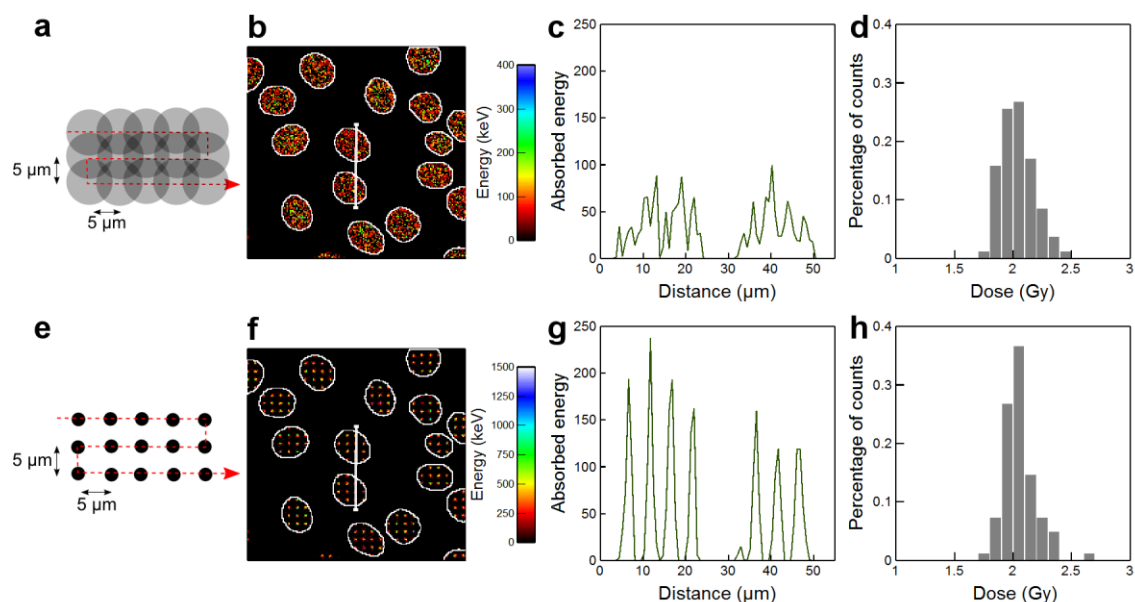
**Fig. 1. 9 MeV electrons relative dose measured at increasing depth.** (a) Representation of a 6-well plate used during electron irradiations with *zoom* on one cell dish at whose bottom were seeded cells. To achieve a 10 mm depth, 9.6 ml of culture medium were added in each well during whole irradiation time. (b) Absorbed relative dose as a function of depth. Experimental measurements and Geant4 10.1 Monte Carlo simulations showed that cells positioned at 10 mm under culture medium receive 93% of the maximum relative dose, as indicated by the gray line.

#### *Proton dosimetry*

3 MeV proton irradiations (Linear Energy Transfer =  $11.8 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ) are performed on the AIFIRA facility using a microbeam line. To ensure an homogeneous dose distribution, we calculated by Geant4 10.1 Monte Carlo simulation<sup>12</sup>, that a mean absorbed dose of 2 Gy is achieved when the beam is scanned every  $5 \mu\text{m}$  in a regular pattern and 26 protons are delivered per beam position (Fig. 2). To obtain 1 and 6 Gy the mean number of protons delivered per



beam position was 13 and 78, respectively. The beam can be either unfocused to obtain “broad beam” irradiations or focused down to the micrometer size (Fig. 2a and b). Using the method reported in a previous work<sup>39</sup>, we estimated the absorbed energy per pixel in cell nuclei, and we calculated the mean dose absorbed per nucleus for both unfocused and focused beams. Figure 2 shows that despite a mean dose of 2 Gy is delivered per nucleus, the absorbed energy at each beam spot after proton microbeam varies from 1 to 3 times the absorbed dose after proton broad beam.



**Fig. 2. Micro dosimetry at the cellular scale ensure the same mean dose of two proton irradiation modalities.** (a and e) The broad and micro beams are scanned every 5 μm in regular pattern to obtain the desired dose. (b and f) Cell nuclei are delimited by white circles. Absorbed energies in cell nuclei were estimated by Monte Carlo simulations, and depicted with keV calibration bars. (c and g) Profiles of the absorbed energies plotted along sides the white line drawn on cell nuclei. The absorbed energy after microbeam irradiation is 1 to 3 times higher than after broad beam irradiation. (d and h) Histograms represent the percentage of cells that received from 1.5 to 2.5 Gy when 26 protons per point are delivered.

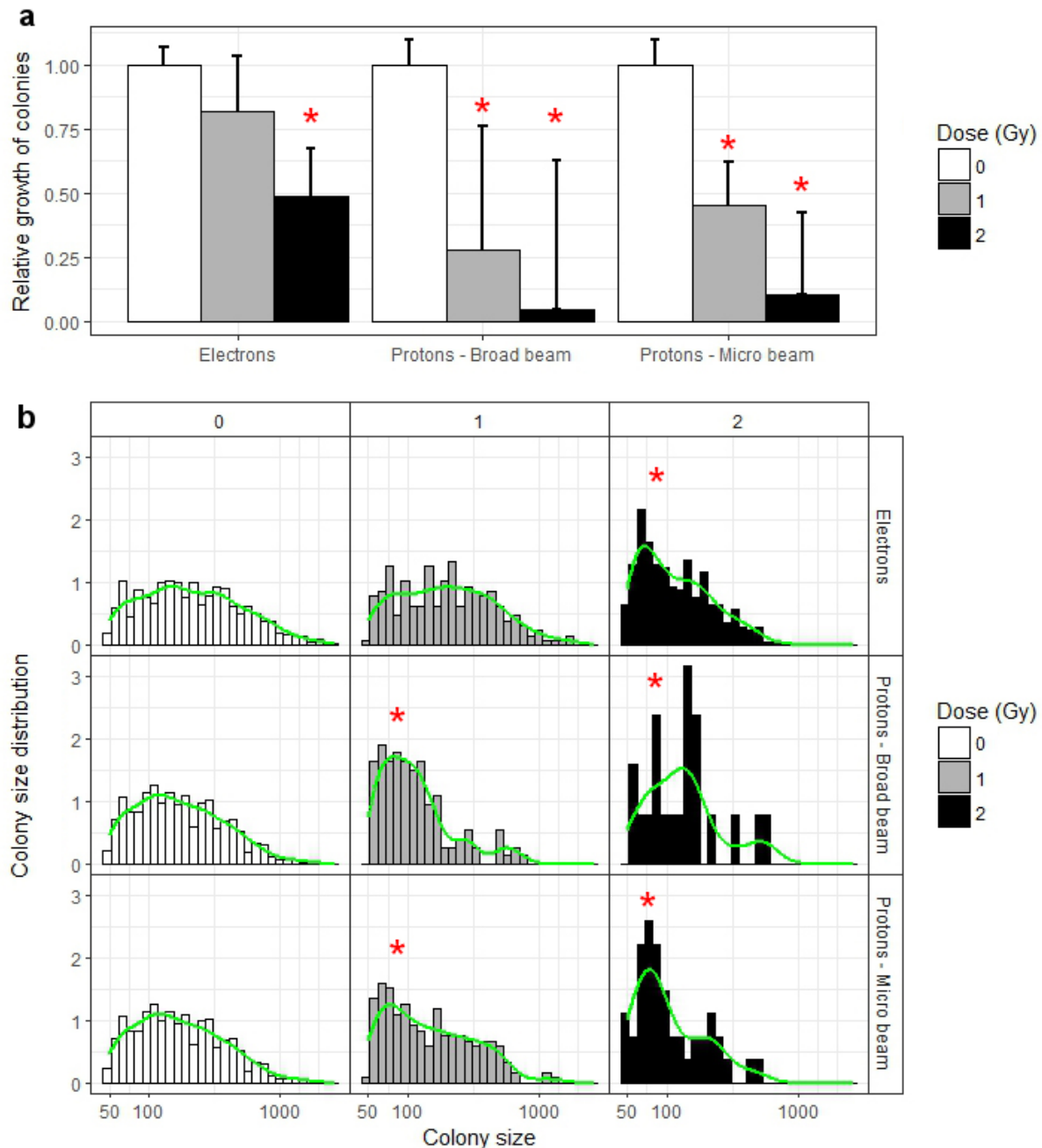
### **IB115 surviving fraction is dose- and IR-dependent.**

The strength of clonogenic assay relies on the independence of the Plating Efficiency that is assumed to be the same when different numbers of cells are inoculated in each experiment<sup>40</sup>.

First, we tested the IB115 plating efficiency (PE) by seeding different numbers of cells, from 200 to 1000 cells per well. The relative PE was calculated after 10 days in normal culture condition (Supplementary Table S3). The PE of IB115 varies from 12.4 to 16 for 500 and 200 plated cells, respectively. Whatever the PE variation, the number of colonies remains sufficiently elevated for the correct analysis of IB115 surviving fraction.

Second, we developed and validated a routine based on numerical acquisition of paraformaldehyde-fixed cell population. Nucleus staining using intercalating agent allows us to determine the number of colonies having more than 50 cells and also the number of cells per colony (see Supplementary Materials S3 for complete description). This methodology allowed us to measure the standard SF (Supplementary Fig. S3), the number of colonies with more than 50 cells (Fig. 3a) and the colony size distribution which takes in accounts the number of cells per colony (Fig. 3b).

The number of colonies of IB115 decreases as the dose increases, for both electron and proton irradiations. In addition, it is almost 20% lower when cells are irradiated with protons compared to electrons for both doses. No differences were observed after protons broad beam and proton microbeam irradiations. The colony size distribution is also significantly reduced in a dose- and IR-dependent manner except for 1 Gy electron irradiation where the number of cells per colony does not significantly change.



**Fig. 3. IB115 colonies number and colonies size distribution is dose- and IR-dependent except for 1 Gy electron irradiations.** (a) Relative growth of colonies above 50 cells *versus* incoming particles and irradiation doses. Significant change (\*,  $p < 0.05$ ) of the number of colonies was evaluated using multiple t-tests with Bonferroni correction. (b) Distribution of colony sizes (n cells per colony) *versus* incoming particle and irradiation doses. Significant changes of size distribution (\*,  $p < 0.05$ ) were compared using Kolmogorov-Smirnov test with Bonferroni correction.

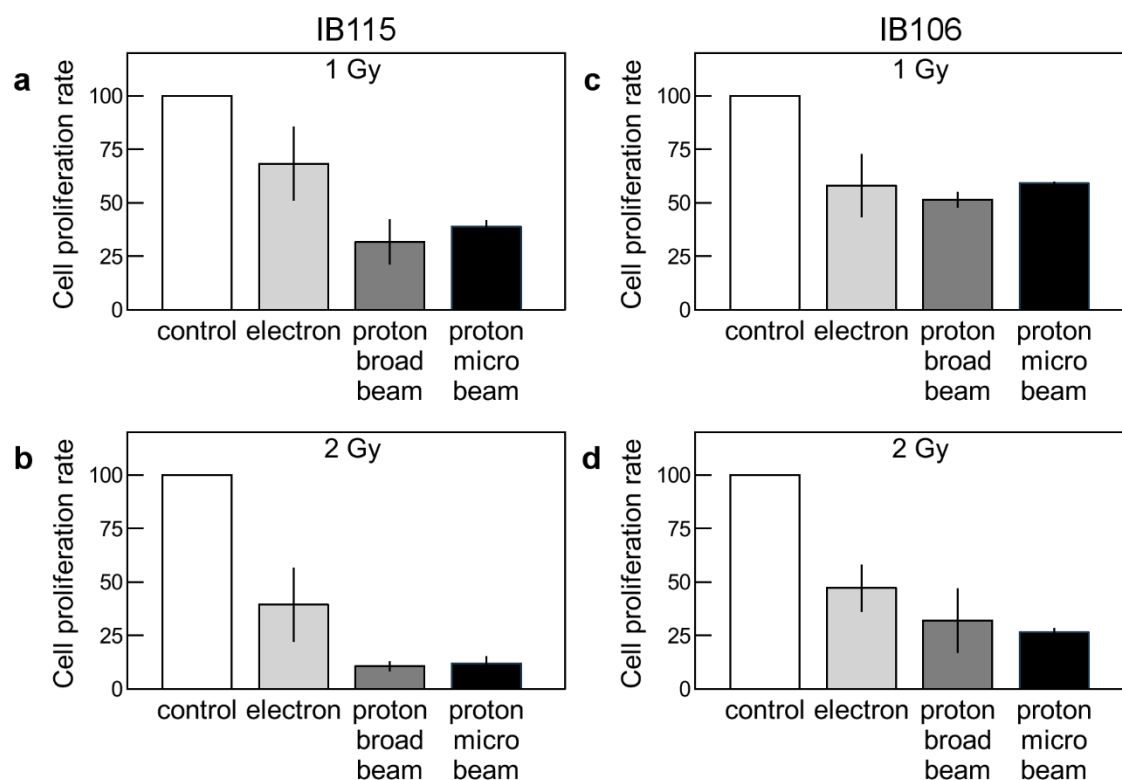
As already done for IB115, we estimated the IB106 PE by plating from 200 to 1000 cells and showed that IB106 PE decreases from 10 to 2 when 1000 and 600 cells are seeded, respectively (Supplementary Table S3). These data illustrate that the ability of IB106 to grow in colonies is drastically impaired and highlight the fact that the Colony Forming Assay may not be a suitable test for evaluating their radiation sensitivity.

**Proliferation rate is dose- and IR-dependent and highlights a first difference between IB115 and IB106.**

As shown in Fig. 4a and b, the proliferation rate of IB115 exposed to 1 and 2 Gy with electrons decreases by 1.4 to 3.3-fold with respect to controls, respectively. The proliferation rate of IB115 exposed to 1 and 2 Gy with protons decreases by 3.3 to 10-fold with respect to controls, respectively. Moreover, the proliferation rate was not considerably modified by focusing the proton beam to micrometer dimension.

The analysis of cell proliferation highlights a difference between IB106 and IB115. For both doses of electrons, the IB106 proliferation rate decreases by 2-fold with respect to controls. For proton irradiations, the proliferation rate of IB106 exposed to 1 and 2 Gy decreases by 2 to 3-fold with respect to controls, respectively. The proliferation rate was not considerably modified between broad and focused proton irradiations for the tested doses (Fig. 4c and d).

However, we can observe a marked decrease in cell proliferation of IB115 in comparison to IB106, revealing a higher resistance to radiation of IB106.



**Fig. 4. Proliferation rate reveals radiation sensitivity differences between IB115 and IB106.** IB115 proliferation not only depends on doses (a: 1 Gy and b: 2 Gy) but also on types of ionizing radiation. A higher decrease after 2 Gy with respect to 1 Gy, and after proton in comparison to electron irradiations is observed. (c) IB106 proliferation after 1 Gy exposure is decreased 2 fold with respect to controls, but no differences are observed between electron and proton irradiations. (d) Following 2 Gy irradiation exposure, the IB106 proliferation rate is decreased 2 fold after electrons, and 3 fold after protons. Error bars represent mean  $\pm$  SD of three replicates from two independent experiments normalized to untreated controls.

## **Radiation-induced $\gamma$ H2AX and P-ATM foci number is dose-, IR-, time- and IR distribution-dependent.**

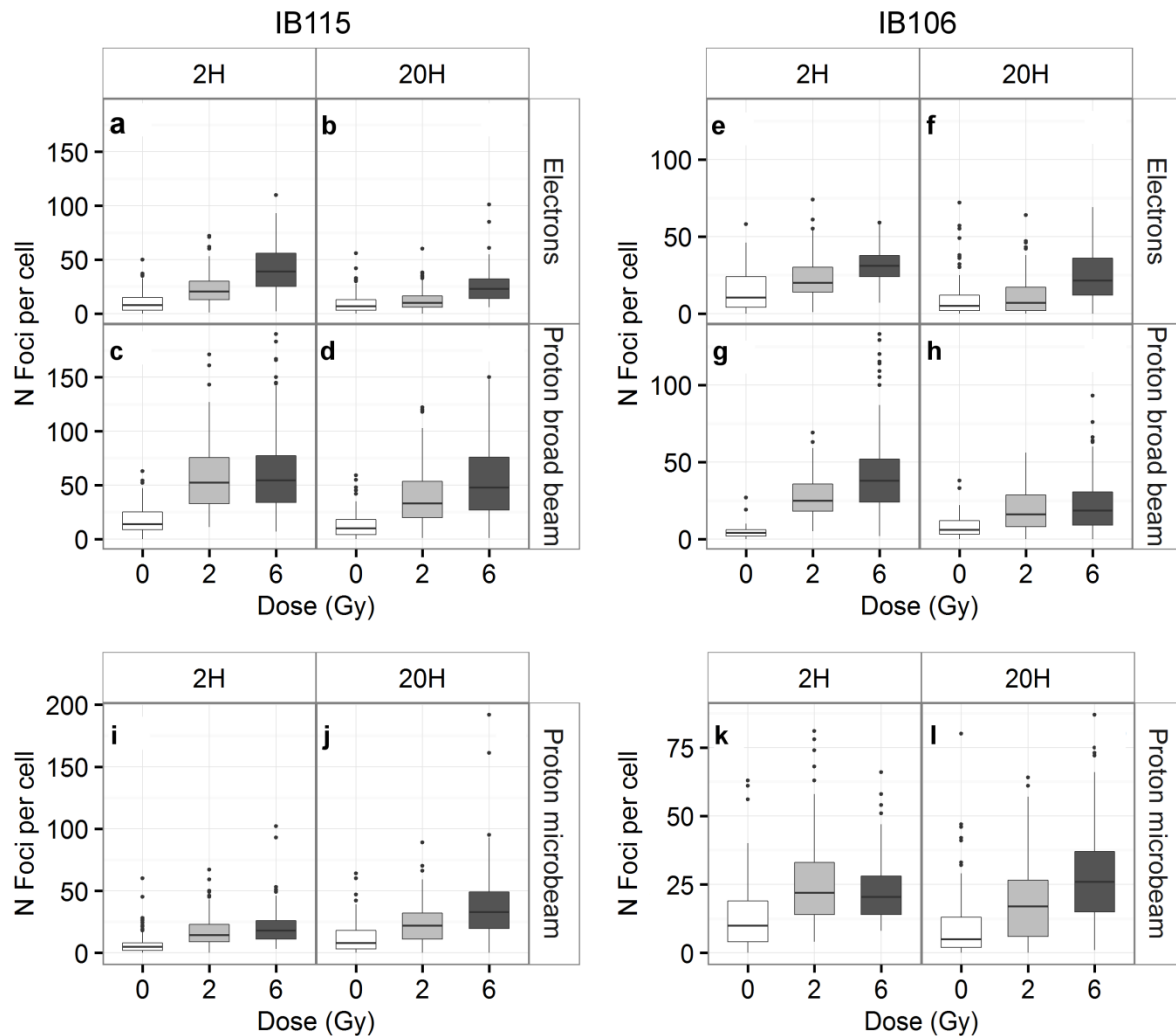
We detected and quantified the induction and persistence of both  $\gamma$ H2AX and P-ATM IRIF over time, as shown in previous studies<sup>33,41–43</sup> (Supplementary Fig. S4, S5 and S6). Box plots in Fig. 5 show the  $\gamma$ H2AX IRIF quantification per nucleus as a function of (i) the delivered dose, (ii) the ionizing radiation and (iii) the time post-irradiation.

For electron irradiations, the number of IRIF in IB115 increases in a dose-dependent manner, 2 h after irradiation (Fig. 5a). Then, it decreases to reach the controls baseline 20 h after irradiation (Fig. 5b).

For proton broad beam irradiations, the number of  $\gamma$ H2AX IRIF increases with respect to control cells after both doses, but no differences between 2 Gy and 6 Gy irradiated cells are observed (Fig. 5c). The number of  $\gamma$ H2AX IRIF at 6 Gy is probably underestimated. This could be due to the limit of optical microscopy resolution and the overlapping of DNA damages in the same area, as a consequence an high number of IRIF can appear as a single focus, as already showed by Costes *et al.*<sup>44</sup>. Persistence of  $\gamma$ H2AX IRIF is observed 20 h after proton broad beam irradiations; indeed, there is 3-fold increase of  $\gamma$ H2AX IRIF compared to control cells (Fig. 5d). For all conditions, a higher number of  $\gamma$ H2AX IRIF is observed in irradiated cells with proton broad beam compared to electrons, whatever the dose and the time after irradiation. These results highlight both the higher number and the duration persistence of protons induced-DNA damages compared to electrons as a function of the dose and time post-irradiation in IB115.

As for IB115, we detected and quantified the induction and persistence of both  $\gamma$ H2AX and P-ATM IRIF over time in IB106 (Supplementary Fig. S5 and S6). In IB106, 2 h after irradiations, the IRIF number increases in a dose-dependent manner and as a function of the IR used (Fig. 5e and g). A decrease of the IRIF number is observed for both electron and proton broad beams 20 h after irradiations (Fig. 5f and h). For each condition, the quantification of  $\gamma$ H2AX IRIF in IB106 showed that the number of IRIF per cell is reduced with respect to IB115.

As expected, a distinct distribution of  $\gamma$ H2AX IRIF per cell is observed after irradiation with proton microbeam in both IB115 and IB106. The number of IRIF remains low for both doses 2 h after irradiation reflecting the irradiation pattern (Fig. 5i and k). Twenty hour after proton microbeam irradiation, the IRIF number increases in both cell lines after 2 and 6 Gy irradiation doses (Fig. 5j and l). The increase in radiation-induced  $\gamma$ H2AX foci could be interpreted as a diffusion mechanism at the site of damage where the chromatin relaxes, leading to more phosphorylation of H2AX, as suggested in other studies<sup>44,45</sup>.



**Fig. 5. Radiation induced DNA damages are dose-, time-, IR-dependent and IR distribution-dependent.** (a and b) The number of  $\gamma$ H2AX IRIF observed after 2 h and 20 h after electron irradiations in IB115 is dependent on the dose delivered, with a decrease of the  $\gamma$ H2AX IRIF number at the later time point. (c) In IB115, 2 h after proton broad beam irradiations the number of IRIF is increased with respect to non-irradiated cells, and (d) 20 h after irradiation, IRIF number remains more elevated with respect to control and electron irradiated cells. (e and g) The number of  $\gamma$ H2AX IRIF observed in IB106, 2 h after electron and proton broad beam irradiations is dose-dependent but not differences are observed between the two ionizing radiations. (f and h) A decrease of the IRIF number 20 h after irradiation is observed for both electrons and proton broad beams. (i) In IB115, the number of  $\gamma$ H2AX IRIF observed 2 h after microbeam irradiation reflects the irradiation pattern hence not differences are observed between 2 and 6 Gy irradiated cells. (k) The same behavior is observed in IB106. (j and l) 20 h after proton microbeam irradiation the number of IRIF observed increase in a dose-dependent manner, in both IB115 and IB106. In all cases, the IRIF number observed in IB115 is higher than the IRIF number observed in IB106.

## Discussion

Understanding radiation-induced biological effects underlying the cellular radiation sensitivity can improve the radiation therapy benefits. Different ionizing radiations (photons, electrons, protons and carbon ions) are used today in radiation therapy. Thus, deciphering the *in vitro* biological impacts of these different ionizing radiations improve our knowledge and could enhance the personalized radiotherapy treatments.

We investigated the radiation-induced biological differences between electrons and protons homogeneously distributed, and proton focused to a micrometer-size beam spot and scanned over a cellular monolayer. To compare the delivered doses from a Clinac producing electrons and a Singletron Accelerator producing 3 MeV protons, we developed protocols based on the dosimetry at the cellular level obtained by Monte Carlo simulations, in agreement with the measurements at the Institut Bergonié, and to the electron beam characterization performed by Gobet and colleagues<sup>38</sup>.

In a previous work Williams *et al.* explains that “for a complete description of radiation sensitivity at least two parameters are needed and the radiation sensitivity is based on multiple distinct cell response mechanisms” (*sic*)<sup>46</sup>. For these reasons, we performed a multi-parametric analysis by measuring the survival fraction (SF), the number of colonies and the colony size distribution, the proliferation and we quantified  $\gamma$ H2AX IRIF. In addition to  $\gamma$ H2AX, we quantified the P-ATM IRIF which are a highly sensitive biological dosimeter that may use to probe DNA damage response and variations in cellular radiation sensitivity<sup>47</sup>.

The biological efficacy of electrons and protons is assessed firstly in IB115 sarcoma cells with a known amplicon-based genetics. The SF of IB115 is decreased in a dose- and IR-dependent manner and reveals that protons have a greater efficacy with respect to electrons. These results are also confirmed with proliferation assay. And, the number of  $\gamma$ H2AX IRIF (low in control cells, as previously observed by Mac Manus *et al.* in both non-irradiated cancerous and primary human commercial cells, such as Hela and *Indian Muntjac skin* cells<sup>48</sup>) is increased in a dose-dependent manner and cells presented more IRIF 2 h after proton compared to electron irradiations. These data are in accordance to Rothkamm *et al.*, who showed that the IRIF frequency is proportional to the delivered dose<sup>33</sup>. A considerable reduction of the IRIF number in different cervical cancer cell lines, 20 h after irradiation, was previously showed by Banath *et al.*<sup>37</sup>. We found a reduction of the IRIF number after both electron and proton broad beam irradiations, 20 h after irradiation. Nevertheless, the number of IRIF remains higher after proton broad beam than after electron irradiations, in accordance with the higher LET of protons. Our results agreed with other published works showing more severe consequences of proton compared to electron irradiations<sup>49,50</sup>.

As previously mentioned, the ability to deliver the same dose in different patterns within cells is accessible using microbeams<sup>11,51,52</sup>. We compare the dose distribution obtained from focused proton beam, where the energy is deposited in small spots distributed in a regular pattern (microbeam) with unfocused proton beam, where the energy is homogeneously distributed all over the cell monolayer (broad beam) (Supplementary Fig. S3). We observed that beam focusing leads to 3-fold increase of the energy deposited in the beam spot while keeping the mean dose constant. This highly concentrated energy deposit in micrometer size area is expected to produce more complex damage at the cellular level and thus to enhance the radiation-induced biological effects. The focused deposited energy is well-depicted by the  $\gamma$ H2AX IRIF distribution. Indeed, the number of  $\gamma$ H2AX IRIF 2 h after microbeam irradiations does not depend on the delivered dose, but it remains stable reflecting the irradiation pattern (as already explained, to obtain a mean dose of 1, 2 and 6 Gy, 13, 26 and 78 protons were delivered at each beam position, respectively). Twenty hours after irradiation the IRIF number increases in a dose-dependent manner. A change in the IRIF morphology together with an increase in the IRIF number and a decrease in the IRIF total size is observed over time. This phenomenon, demonstrated by other authors, can be due to the chromatin reorganization during which a sub-diffusion of damages can occurs<sup>31,53</sup>. Cell proliferation and SF do not reveal significant differences between proton micro- and broad- distributions. The team of Schmid and co-workers investigated the RBE enhancement after focused and homogenous low-LET proton beams. They demonstrated that focused protons result in an increased relative biological effectiveness for the induction of micronuclei and dicentric chromosomes<sup>54</sup>. This seems not to be the case for our experimental conditions. However, we cannot directly compare our results to their, because cell lines, biological endpoints and proton energy are different.

Once detailed the radiation-induced biological effects in IB115, we analyzed the biological responses of another patient-derived sarcoma cell line (IB106), known to have a complex genetics<sup>18</sup>. The first difference observed is the inability of IB106 to grow in colonies, hence the SF cannot be measured. The relative cell proliferation is dose-dependent after protons but not after electrons. However, we found that the proliferation rate after electron and proton irradiations decreases in the same way after 1 Gy. Regarding the  $\gamma$ H2AX IRIF quantification, we observed a lower IRIF number and a higher rate of disappearance compared to IB115. These two parameters, as already described by other authors<sup>36,55,56</sup>, confirm that IB106 are more radiation resistant than IB115.

We suggested different hypothesis to explain the radiation resistance of IB106. Due to their complex genetics and recurrent chromosome rearrangements, the lower number of IRIF in IB106 could be associated to a lack of phosphorylation mechanisms of H2AX and ATM. Another feature that could influence the different response to ionizing radiations is the cell



cycle duration<sup>57</sup>. Indeed, the IB106 cell cycle is 10-times slower than the IB115 cell cycle. And, in agreement with our data, another study confirmed that liposarcoma (corresponding to our IB115 cell line) are known to belong to the more sensitive varieties of soft tissue sarcoma<sup>13</sup>.

In conclusion, we show that for radiation sensitivity assessment of cells derived from patients it is necessary to verify different biological endpoints, such as quantification and persistence over time of DNA damage, proliferation and surviving fraction. These protocols highlighted different biological responses of the two cell lines exposed to ionizing radiations. We observe that protons induce more deleterious effects compared to electrons, independently from the dose distribution at the cellular scale. Our results lead to the conclusion that IB115 are more sensitive than IB106 for the endpoints analyzed.

## **Methods and Materials**

### **Cells lines culture**

Sarcoma cell lines were characterized, from a genetic point of view, in previous works from F. Chibon laboratory (described in Supplementary Material S1). Cell lines (IB115 and IB106) were maintained in RPMI 1640 GlutaMAX supplemented with Fetal Bovine Serum (10% v/v, FBS) and streptomycin/penicillin (100 µg/ml). Cells were kept in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. For both electron and proton irradiation experiments, 20,000 cells were seeded in a drop in specific cell dishes 20 h before irradiations. As a control, a mock sample was used, which was treated in the same way with the exception of irradiation.

### **Irradiation systems**

Electron irradiations were performed with a Clinical Linear Accelerator (CLINAC 21EX, Varian Medical Systems), used in routine at the Department of Radiotherapy, Institut Bergonié (Bordeaux, France). Cells were irradiated using 9 MeV electron beams with 1, 2 and 6 Gy delivered with a dose-rate of 2 Gy/min. These doses are selected as irradiation doses because 2 Gy is the fractionated dose used during patient treatments; 1 and 6 Gy are lower and higher doses with respect to this standard value. The electron beam was collimated in 15 x 15 cm<sup>2</sup> square field. A Source-Surface Distance (SSD) of 100 cm was applied, and the irradiations were carried out with a single beam oriented at 0° (single vertical beam). Cells were plated in the middle of a 6-well plate or on coverslips. The cell monolayer was covered by 10 mm of medium to achieve electronic equilibrium and reach 93% of the maximum dose. One hour before irradiation 9.6 ml of growth medium were added to achieve this depth.

Proton irradiations were carried out at the AIFIRA microbeam line (Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine)<sup>11</sup>. Cells were grown in a custom

made support dish, described by Bourret *et al.*<sup>11</sup>, designed to keep the cells fully immersed in their culture medium during the irradiation procedure. A beam intensity of about 100,000 protons per second was used to irradiate a sufficient amount of cells in a reasonable time (20 min maximum for 6 Gy). The beam spot was scanned on a surface corresponding to the microscope field of view (690 x 520  $\mu\text{m}^2$ ) by a fast electrostatic deflector. Then, this pattern was repeated on the adjacent microscope fields, following a mosaic of 9 x 12 fields, to cover an area of 6.2 x 6.2 mm (Supplementary Material S2A). The same protocol was applied for either focused (microbeam, Supplementary Material S2B) or unfocused (broad beam, Supplementary Material S2C) beams, to study the impact of the energy deposition at the micrometer scale. The microbeam was focused to the minimum beam spot size (2  $\mu\text{m}$ ). The broad beam was unfocused to obtain a homogenous protons distribution on the cell population. In relation with the stability of the beam count rate over a few tens of minutes, 4% of uncertainties were estimated. The flux stability was checked every two samples for the three doses, by counting the incoming particles with a plastic scintillator (EJ-204, Scionix, The Netherlands) coupled to a photomultiplier tube (Model R9880U, Hamamatsu).

## **Monte Carlo simulations**

### Electron beam

The percentage depth dose (PDD) was measured using standard protocols and cross-checked by Geant4 10.1 simulations<sup>12</sup>. The methodology was described previously by Gobet *et al.*<sup>38</sup>. Briefly, electrons are emitted isotropically in a cone of 4° half opening angle from the effective point source located 1 m above the water phantom surface. A Gaussian energy distribution (mean energy = 9 MeV, FWHM = 800 keV) was assumed from previous measurements<sup>38</sup>. The phantom is a 10x10x10  $\text{cm}^3$  filled with water. Voxels with dimensions of 0.1 x 0.1 x 0.1  $\text{cm}^3$  were defined along the vertical beam axis. The absolute absorbed dose at a given depth of the water phantom was defined by the ratio between the absorbed energy inside the voxel of interest and its mass. The G4EmLivermorePhysics library was used with a 100  $\mu\text{m}$  cut for electrons and photons.

### Proton beam

To ensure that the mean delivered dose with protons was similar to the one obtained with electrons, the proton beam irradiation was simulated using a previously described methodology<sup>39</sup>. Briefly, a 3D confocal image of 82 cell nuclei is imported in Geant4 10.1 as a so-called cellular phantom. 3 MeV protons are delivered on Gaussian distributions of 0.5  $\mu\text{m}$  FWHM or 10  $\mu\text{m}$  FWHM focused and broad beam irradiation respectively. The beam is positioned every 5  $\mu\text{m}$  and 26 protons are delivered. The energy deposit in every nucleus is registered and the dose per nucleus is calculated as the absorbed energy normalized by the

nucleus mass calculated from its volume and a density of  $1 \text{ g.cm}^{-3}$ . The G4EmLivermorePhysics library was used with a 10 nm cut for electrons and photons.

### **Cell surviving fraction**

Cells were harvested with trypsin-EDTA (0.05%, v/v) right away irradiation, and 500 IB115 and 1000 IB106 were seeded in 12-well plate, respectively. After 12 days kept in standard culture conditions, cells were paraformaldehyde fixed (4%, w/v) in phosphate-buffered saline (PBS 1X, pH 7.4) for 15 min at room temperature. Cells nuclei were stained with Hoechst<sup>33342</sup> (1  $\mu\text{M}$ , 10 min, room temperature). Data acquisitions were performed with a Zeiss AxioObserver Z1 microscope (Carl Zeiss MicroImaging, GmbH). Two independent experiments were performed in quadruplicates. Plating efficiency (PE) was determined for each dose and surviving fraction was calculated as the ratio of the PE for the irradiated cells to the control cells, as previously described by Franken<sup>26</sup>. Colonies were counted using an automated custom macro (See supplementary Material S3).

### **Cellular proliferation**

Right away irradiation, cells were harvested with trypsin-EDTA (0.05% v/v), and 300 IB115 or 500 IB106 cells were seeded in 30 wells of 96-well plate, respectively. Every day the culture medium was removed from 3 wells, cells were washed with PBS and harvest with trypsin-EDTA (0.05% v/v for 15 min, 37°C). For re-suspension and counting, FBS (4% v/v) in PBS was added and the totally of cells was counted with a flow cytometer (FACScalibur, BD Bioscience).

6 Gy irradiation inhibits cell division, independently of the ionizing radiations. Therefore data analysis of surviving fraction and proliferation rate was performed only for 1 and 2 Gy. Two independent experiments were performed for each dose of each ionizing radiation used. Each data point represents the average of triplicates. For IB115 cells, the cellular proliferation rate was calculated when the fold was 200 for the control cells number. For IB106 cells, the cellular proliferation rate was calculated when the fold was 20 for the control cells number. These respective folds were obtained 14 days following irradiation and the difference is due to the fact that IB106 cells have a slower population doubling time.

### **Immuno-detection**

The co-immunostaining of  $\gamma$ H2AX and P-ATM was performed following the protocols described by Bennett<sup>58</sup>. Briefly, 2 or 20 h after irradiation, cells were paraformaldehyde fixed (4% w/v) in PBS for 15 min at room temperature. Then, cells were incubated using a blocking buffer (Triton X-100, 0.2% v/v and FBS, 10% v/v in PBS) for 30 min at room temperature. After three washes in PBS for 5 min, samples were incubated overnight, at 4 °C with anti-human  $\gamma$ H2AX rabbit monoclonal antibody (1:1000, 20E3, Cell signaling). After three more washes in PBS, samples were incubated for 3 h at room temperature with goat anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor<sup>488</sup> antibody (1:2000 Molecular Probes, Invitrogen). The same process was repeated with anti-human P-ATM mouse monoclonal antibody (1:1000, 10H11.E12, Cell signaling), and goat anti-Mouse conjugated to Alexa Fluor<sup>594</sup> antibody (1:2000, Molecular Probes, Invitrogen). Nuclei were stained with Hoechst<sup>33342</sup> (1  $\mu$ M, 10 min at room temperature). The images acquisition was performed using a Carl Zeiss fluorescent microscope with a 63X/Oil immersion objective. The number of foci was counted in 40 to 60 cells per condition with a custom Image J macro (Supplementary Material S4).

## References

1. Durante, M. & Loeffler, J. S. Charged particles in radiation oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 37–43 (2010).
2. McGovern, S. L. & Mahajan, A. Progress in Radiotherapy for Pediatric Sarcomas. *Curr. Oncol. Rep.* **14**, 320–326 (2012).
3. DeLaney, T. F. & Haas, R. L. M. Innovative radiotherapy of sarcoma: Proton beam radiation. *Eur. J. Cancer* **62**, 112–123 (2016).
4. Serduc, R. *et al.* Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study. *Phys. Med. Biol.* **53**, 3609–3622 (2008).
5. Bouchet, A., Serduc, R., Laissue, J. A. & Djonov, V. Effects of microbeam radiation therapy on normal and tumoral blood vessels. *Phys. Medica* **31**, 634–641 (2015).
6. Dilmanian, F. A. & Meek, A. G. Heavy ion therapy with microbeams. (2010).
7. Zhang, X. *et al.* Therapy-Resistant Cancer Stem Cells Have Differing Sensitivity to Photon versus Proton Beam Radiation. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1484–1491 (2013).
8. Nikitaki, Z. *et al.* Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new ‘old’ paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin. Cancer Biol.* **37-38**, 77–95 (2016).
9. Barretina, J. *et al.* Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat. Genet.* **42**, 715–721 (2010).
10. Tesei, A. *et al.* In vitro irradiation system for radiobiological experiments. *Radiat. Oncol.* **8**, 257 (2013).
11. Bourret, S. *et al.* Fluorescence time-lapse imaging of single cells targeted with a focused scanning charged-particle microbeam. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **325**, 27–34 (2014).
12. Agostinelli, S. *et al.* GEANT4 - A simulation toolkit. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.* **506**, 250–303 (2003).
13. Rhomberg, W. The Radiation Response of Sarcomas by Histologic Subtypes: A Review With Special Emphasis Given to Results Achieved With Razoxane. *Sarcoma* **2006**, 1–9 (2006).
14. Kim, K. S. *et al.* Radiation-Induced Sarcoma: A 15-Year Experience in a Single Large Tertiary Referral Center. *Cancer Res. Treat.* **48**, 650–657 (2016).
15. Berrington de Gonzalez, A., Kutsenko, A. & Rajaraman, P. Sarcoma risk after radiation exposure. *Clin. Sarcoma Res.* **2**, 18 (2012).
16. Cormier, J. N. & Pollock, R. E. Soft Tissue Sarcomas. *CA. Cancer J. Clin.* **54**, 94–109 (2004).
17. Nielsen, T. O. & West, R. B. Translating gene expression into clinical care: Sarcomas as a paradigm. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1796–1805 (2010).
18. Chibon, F. *et al.* Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat. Med.* **16**, 781–787 (2010).
19. Taylor, B. S. *et al.* Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 541–57 (2011).
20. Chibon, F. Cancer gene expression signatures-The rise and fall? *Eur. J. Cancer* **49**, 2000–2009 (2013).
21. Italiano, A. *et al.* Genetic Profiling Identifies Two Classes of Soft-Tissue Leiomyosarcomas with Distinct Clinical Characteristics. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1190–1196 (2013).
22. Williams, J. R. *et al.* Overview of Radiosensitivity of Human Tumor Cells to Low-Dose-Rate Irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol.* **72**, 909–917 (2008).
23. Mansour, W. Y., Rhein, T. & Dahm-Daphi, J. The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6065–6077 (2010).

24. Constanzo, J. *et al.* Radiograaff, a proton irradiation facility for radiobiological studies at a 4 MV Van de Graaff accelerator. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **334**, 52–58 (2014).
25. Munshi, A., Hobbs, M. & Meyn, R. E. in *Chemosensitivity* **110**, 021–028 (Humana Press, 2005).
26. Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **1**, 2315–2319 (2006).
27. Pauwels, B. *et al.* Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **51**, 221–226 (2003).
28. Buch, K. *et al.* Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiat. Oncol.* **7**, 1 (2012).
29. Luttjeboer, M. *et al.* Strategies for the analysis of in vitro radiation sensitivity and prediction of interaction with potential radiation modifying agents. *Int. J. Radiat. Biol.* **86**, 458–66 (2010).
30. Quick, Q. A. & Gewirtz, D. A. Enhancement of radiation sensitivity, delay of proliferative recovery after radiation and abrogation of MAPK (p44/42) signaling by imatinib in glioblastoma cells. *Int. J. Oncol.* **29**, 407–12 (2006).
31. Costes, S. V., Chiolo, I., Pluth, J. M., Barcellos-Hoff, M. H. & Jakob, B. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **704**, 78–87 (2010).
32. Kiltie, A. E. *et al.* A correlation between residual DNA double-strand breaks and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from preradiotherapy cervix cancer patients. *Int. J. Radiat. Oncol.* **39**, 1137–1144 (1997).
33. Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H. & Lobrich, M. Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5706–5715 (2003).
34. Ibañez, I. L. *et al.* Induction and Rejoining of DNA Double Strand Breaks Assessed by H2AX Phosphorylation in Melanoma Cells Irradiated with Proton and Lithium Beams. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **74**, 1226–1235 (2009).
35. Calugaru, V. *et al.* Involvement of the Artemis Protein in the Relative Biological Efficiency Observed With the 76-MeV Proton Beam Used at the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay. *Int. J. Radiat. Oncol.* **90**, 36–43 (2014).
36. Olive, P. L. & Banáth, J. P. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol.* **58**, 331–335 (2004).
37. Banath, J. P. Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **64**, 7144–7149 (2004).
38. Gobet, F. *et al.* Experimental and Monte Carlo absolute characterization of a medical electron beam using a magnetic spectrometer. *Radiat. Meas.* **86**, 16–23 (2016).
39. Barberet, P. *et al.* Monte-Carlo dosimetry on a realistic cell monolayer geometry exposed to alpha particles. *Phys. Med. Biol.* **57**, 2189–2207 (2012).
40. Pomp, J. *et al.* Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiother. Oncol.* **40**, 121–125 (1996).
41. Petrini, J. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* **13**, 458–462 (2003).
42. Burma, S. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J. Biol. Chem.* **276**, 42462–42467 (2001).
43. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499–506 (2003).
44. Costes, S. V *et al.* Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat. Res.* **165**, 505–515 (2006).
45. Reitsema, T. J., Banáth, J. P., MacPhail, S. H. & Olive, P. L. Hypertonic saline enhances expression of phosphorylated histone H2AX after irradiation. *Radiat. Res.* **161**, 402–408 (2004).

46. Williams, J. R., Zhang, Y., Russell, J., Koch, C. & Little, J. B. Human tumor cells segregate into radiosensitivity groups that associate with ATM and TP53 status. *Acta Oncol. (Madr)*. **46**, 628–638 (2007).
47. Lavaf, A., Kao, J. & Peters, S. ATM Phosphorylation Kinetics as a Biological Reporter of Cellular Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol.* **69**, S65–S66 (2007).
48. McManus, K. J. & Hendzel, M. J. ATM-dependent DNA Damage-independent Mitotic Phosphorylation of H2AX in Normally Growing Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5013–5025 (2005).
49. Grutters, J. P. C. *et al.* Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Radiother. Oncol.* **95**, 32–40 (2010).
50. Green, L. M. *et al.* Response of Thyroid Follicular Cells to Gamma Irradiation Compared to Proton Irradiation. I. Initial Characterization of DNA Damage, Micronucleus Formation, Apoptosis, Cell Survival, and Cell Cycle Phase Redistribution. *Radiat. Res.* **155**, 32–42 (2001).
51. Prise, K. M. & Schettino, G. Microbeams in radiation biology: review and critical comparison. *Radiat. Prot. Dosimetry* **143**, 335–339 (2011).
52. Zlobinskaya, O. *et al.* Reduced side effects by proton microchannel radiotherapy: study in a human skin model. *Radiat. Environ. Biophys.* **52**, 123–133 (2013).
53. Girst, S. *et al.* Subdiffusion supports joining of correct ends during repair of DNA double-strand breaks. *Sci. Rep.* **3**, 2511 (2013).
54. Schmid, T. E. *et al.* Low LET protons focused to submicrometer shows enhanced radiobiological effectiveness. *Phys. Med. Biol.* **57**, 5889–5907 (2012).
55. Taneja, N. *et al.* Histone H2AX Phosphorylation as a Predictor of Radiosensitivity and Target for Radiotherapy. *J. Biol. Chem.* **279**, 2273–2280 (2004).
56. Goodarzi, A. A. & Jeggo, P. A. Irradiation induced foci (IRIF) as a biomarker for radiosensitivity. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **736**, 39–47 (2012).
57. Pawlik, T. M. & Keyomarsi, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* **59**, 928–942 (2004).
58. Bennett, B. T., Bewersdorf, J. & Knight, K. L. Immunofluorescence imaging of DNA damage response proteins: Optimizing protocols for super-resolution microscopy. *Methods* **48**, 63–71 (2009).

### **Acknowledgements**

The AIFIRA facility and the microbeam line have been financially supported by the Region Aquitaine (IOPRA, POPRA). MS is supported by the Region Aquitaine (POPRA). We would kindly thank Frédéric Chibon for its patient's sarcoma cell lines (IB115 and IB106). This work has been partly supported by the European Community as an Integrating Activity "*Support of Public and Industrial Research Using Ion Beam Technology*" (SPIRIT) under the EC contract n° 227012. GM is supported by the European Community as an "*Integrating Activity Supporting Postgraduate Research with Internships in Industry and Training Excellence*" (SPRITE) under EC contract no. 317169. BNCD membrane development was supported by the French national centre for scientific research (CNRS, Mission Interdisciplinaire).

### **Author Contributions**

GM and MS planned, performed the experiments and wrote the manuscript; PB and MA performed irradiations, dosimetry measurements and simulations; HS conceived and supervised this project; GK is POPRA coordinator and permits the access to the Clinac facility; FC provides the IB115 and IB106 cell lines; MG, MS, GD, PB and HS contributed to the data analysis and interpret the results; all authors review the manuscript.

### **Additional information**

Supplementary information accompanies this paper

**Competing financial interests.** The authors declare no competing financial interests.



# Bibliographie

1. Bernier, J., Hall, E. J. & Giaccia, A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 737–747 (2004).
2. Foray, N. Victor Despeignes, the Forgotten Pioneer of Radiation Oncology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **96**, 717–721 (2016).
3. Harrington, K. J. *et al.* Guidelines for preclinical and early phase clinical assessment of novel radiosensitisers. *Br. J. Cancer* **105**, 628–639 (2011).
4. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. & Barton, M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* **104**, 1129–1137 (2005).
5. Scaife, J. E. *et al.* Exploiting biological and physical determinants of radiotherapy toxicity to individualize treatment. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150172 (2015).
6. Ahmad, S. S., Duke, S., Jena, R., Williams, M. V. & Burnet, N. G. Advances in radiotherapy. *BMJ* **345**, e7765 (2012).
7. Ataman, O. U. *et al.* The clinical development of molecularly targeted agents in combination with radiation therapy: a pharmaceutical perspective. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **84**, e447–454 (2012).
8. Yamoah, K., Showalter, T. N. & Ohri, N. Radiation Therapy Intensification for Solid Tumors: A Systematic Review of Randomized Trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **93**, 737–745 (2015).
9. Kim, J. J. & Tannock, I. F. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 516–525 (2005).
10. Begg, A. C., Stewart, F. A. & Vens, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 239–253 (2011).
11. Orth, M. *et al.* Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat. Environ. Biophys.* **53**, 1–29 (2014).
12. Nakamura, K. *et al.* Recent advances in radiation oncology: intensity-modulated radiotherapy, a clinical perspective. *Int. J. Clin. Oncol.* **19**, 564–569 (2014).
13. Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Nanomedicine. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2434–2443 (2010).
14. Wang, A. Z. & Tepper, J. E. Nanotechnology in radiation oncology. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 2879–2885 (2014).
15. King, R. B. *et al.* An overview of current practice in external beam radiation oncology with consideration to potential benefits and challenges for nanotechnology. *Cancer Nanotechnol.* **8**, (2017).
16. Search of: nanoparticles radiotherapy | Cancer - List Results - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Cancer&term=nanoparticles+radiotherapy&cntry1=&state1=&Search=Search#wrapper>. (Accessed: 27th July 2017)
17. Hall, E. J. & Giaccia, A. J. *Radiobiology for the Radiologist*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).
18. Wolters Kluwer - Perez & Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. Available at: <https://www.lww.co.uk/oncology/perez-bradys-principles-and-practice-of-radiation-oncology>. (Accessed: 17th June 2018)
19. IX. Effet Compton. Effet photoélectrique - Claude Giménès. Available at: <http://claude-gimenes.fr/physique/physiques-atomique-moleculaire-et-nucleaire/physique-atomique/-ix-effet-compton-effet-photoelectrique>. (Accessed: 23rd June 2018)
20. Martin, J. E. *Physics for Radiation Protection*. (John Wiley & Sons, 2013).
21. Low-energy electron penetration range in liquid water. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385644>. (Accessed: 23rd June 2018)
22. Cancer Nanotechnology: Principles and Applications in Radiation Oncology. *CRC Press* (2013). Available at: <https://www.crcpress.com/Cancer-Nanotechnology-Principles-and->

Applications-in-Radiation-Oncology/Cho-Krishnan/p/book/9781439878750. (Accessed: 30th March 2018)

23. Cui, L. *et al.* Radiosensitization by gold nanoparticles: Will they ever make it to the clinic? *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **124**, 344–356 (2017).
24. Her, S., Jaffray, D. A. & Allen, C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **109**, 84–101 (2017).
25. McMahon, S. J. *et al.* Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Sci. Rep.* **1**, 18 (2011).
26. Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T. & Prise, K. M. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnol.* **8**, 2 (2017).
27. Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Currell, F. J. & Prise, K. M. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale* **4**, 4830–4838 (2012).
28. Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**, 977–985 (2008).
29. Retif, P. *et al.* Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics* **5**, 1030–1044 (2015).
30. Dearnaley, D. P. *et al.* Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* **353**, 267–272 (1999).
31. Bhide, S. A. & Nutting, C. M. Advances in radiotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.* **46**, 439–441 (2010).
32. Staffurth, J. & Radiotherapy Development Board. A review of the clinical evidence for intensity-modulated radiotherapy. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **22**, 643–657 (2010).
33. Nutting, C. M. *et al.* Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **12**, 127–136 (2011).
34. Tree, A. C., Alexander, E. J., Van As, N. J., Dearnaley, D. P. & Khoo, V. Biological dose escalation and hypofractionation: what is there to be gained and how will it best be done? *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **25**, 483–498 (2013).
35. Vilotte, F. *et al.* Post-Prostatectomy Image-Guided Radiotherapy: The Invisible Target Concept. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
36. Chetty, I. J. *et al.* Technology for Innovation in Radiation Oncology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **93**, 485–492 (2015).
37. Kollar, L. & Rengan, R. Stereotactic body radiotherapy. *Semin. Oncol.* **41**, 776–789 (2014).
38. Cosset, J.-M., Mornex, F. & Eschwège, F. Hypofractionnement en radiothérapie : l'éternel retour. *Cancer/Radiothérapie* **17**, 355–362 (2013).
39. Fowler, J. F. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **62**, 679–694 (1989).
40. Joiner, M. C. & Kogel, A. van der. *Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition.* (CRC Press, 2009).
41. Brown, J. M., Carlson, D. J. & Brenner, D. J. The tumor radiobiology of SRS and SBRT: are more than the 5 Rs involved? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 254–262 (2014).
42. Dupin, C., Vilotte, F., Lagarde, P., Petit, A. & Breton-Callu, C. [Practice evolution of hypofractionation in breast radiation therapy and medical impact]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **20**, 299–303 (2016).
43. Baujat, B. *et al.* Hyperfractionated or accelerated radiotherapy for head and neck cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002026 (2010). doi:10.1002/14651858.CD002026
44. Bourhis, J. *et al.* Status of accelerated fractionation radiotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Curr. Opin. Oncol.* **9**, 262–266 (1997).
45. Bourhis, J. *et al.* Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer:

- a meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* **368**, 843–854 (2006).
46. DeLaney, T. F. Proton therapy in the clinic. *Front. Radiat. Ther. Oncol.* **43**, 465–485 (2011).
  47. Allen, A. M. *et al.* An evidence based review of proton beam therapy: the report of ASTRO’s emerging technology committee. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **103**, 8–11 (2012).
  48. Favaudon, V., Fouillade, C. & Vozenin, M.-C. [Ultrahigh dose-rate, ‘flash’ irradiation minimizes the side-effects of radiotherapy]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **19**, 526–531 (2015).
  49. Favaudon, V. *et al.* Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci. Transl. Med.* **6**, 245ra93 (2014).
  50. Harrington, K. J. Ultrahigh dose-rate radiotherapy: Next steps for FLASH-RT. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2018). doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1796
  51. Montay-Gruel, P. *et al.* Irradiation in a flash: Unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100Gy/s. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **124**, 365–369 (2017).
  52. Vozenin, M.-C. *et al.* The advantage of Flash radiotherapy confirmed in mini-pig and cat-cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2018). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3375
  53. Magné, N., Chargari, C., Soria, J.-C. & Deutsch, E. Concomitant chemo-radiotherapy in clinical trials: to promote step by step rational development. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **70**, 206–215 (2009).
  54. Coleman, C. N. & Mitchell, J. B. Clinical radiosensitization: why it does and does not work. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **17**, 1–3 (1999).
  55. Vokes, E. E., Brizel, D. M. & Lawrence, T. S. Concomitant Chemoradiotherapy. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4031–4032 (2007).
  56. Steel, G. G. & Peckham, M. J. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **5**, 85–91 (1979).
  57. Steel, G. G. Terminology in the description of drug-radiation interactions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **5**, 1145–1150 (1979).
  58. Seiwert, T. Y., Salama, J. K. & Vokes, E. E. The concurrent chemoradiation paradigm-general principles. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 86–100 (2007).
  59. Chargari, C., Soria, J.-C. & Deutsch, E. Controversies and challenges regarding the impact of radiation therapy on survival. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **24**, 38–46 (2013).
  60. Lawrence, T. S., Haffty, B. G. & Harris, J. R. Milestones in the use of combined-modality radiation therapy and chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 1173–1179 (2014).
  61. Bonner, J. A. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* **11**, 21–28 (2010).
  62. Hiniker, S. M., Chen, D. S. & Knox, S. J. Abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2035; author reply 2035–2036 (2012).
  63. Postow, M. A. *et al.* Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med.* **366**, 925–931 (2012).
  64. Antoni, D., Bockel, S., Deutsch, E. & Mornex, F. [Radiotherapy and targeted therapy/immunotherapy]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **20**, 434–441 (2016).
  65. Alonzi, R. Functional Radiotherapy Targeting using Focused Dose Escalation. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **27**, 601–617 (2015).
  66. Wallner, P. E. *et al.* Current status and recommendations for the future of research, teaching, and testing in the biological sciences of radiation oncology: report of the American Society for Radiation Oncology Cancer Biology/Radiation Biology Task Force, executive

- summary. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 11–17 (2014).
67. Thorwarth, D. Functional imaging for radiotherapy treatment planning: current status and future directions-a review. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150056 (2015).
  68. Chan, I. S. & Ginsburg, G. S. Personalized medicine: progress and promise. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **12**, 217–244 (2011).
  69. Hallahan, D. E. & Freeman, M. L. Thoughts on the future of research, teaching, and testing in the biological sciences of radiation oncology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 1–2 (2014).
  70. Krause, M. & Supiot, S. Advances in radiotherapy special feature. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150412 (2015).
  71. Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17–71 (2007).
  72. Singh, S. & Nalwa, H. S. Nanotechnology and health safety--toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 3048–3070 (2007).
  73. Nanotechnology 101 | Nano. Available at: <https://www.nano.gov/nanotech-101>. (Accessed: 14th September 2017)
  74. Djurišić, A. B. *et al.* Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **11**, 26–44 (2015).
  75. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* **311**, 622–627 (2006).
  76. Krug, H. F. & Wick, P. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **50**, 1260–1278 (2011).
  77. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **8**, 2101–2141 (2011).
  78. Etheridge, M. L. *et al.* THE BIG PICTURE ON SMALL MEDICINE: THE STATE OF NANOMEDICINE PRODUCTS APPROVED FOR USE OR IN CLINICAL TRIALS. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 1–14 (2013).
  79. Weissig, V., Pettinger, T. K. & Murdock, N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4357–4373 (2014).
  80. Loo, C. *et al.* Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3**, 33–40 (2004).
  81. This is nanotechnology – one of the fastest growing markets in the world. Available at: <http://www.gaeu.com/item/this-is-nanotechnology-one-of-the-fastest-growing-markets-in-the-world>. (Accessed: 2nd April 2018)
  82. Chang, E. H. *et al.* Nanomedicine: Past, present and future – A global perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 511–517 (2015).
  83. Langer, R. & Weissleder, R. Nanotechnology. *JAMA* **313**, 135–136 (2015).
  84. Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 161–171 (2005).
  85. Revannasiddaiah, S. & Susheela, S. P. Chemically enhanced radiotherapy: visions for the future. *Ann. Transl. Med.* **4**, 52 (2016).
  86. Lammers, T., Rizzo, L. Y., Storm, G. & Kiessling, F. Personalized nanomedicine. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 4889–4894 (2012).
  87. Sanna, V., Pala, N. & Sechi, M. Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 467–483 (2014).
  88. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. & Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 20–37 (2017).
  89. Ferrari, M., Philibert, M. A. & Sanhai, W. R. Nanomedicine and society. *Clin. Pharmacol. Ther.* **85**, 466–467 (2009).
  90. De Matteis, V. & Rinaldi, R. Toxicity Assessment in the Nanoparticle Era. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1048**, 1–19 (2018).

91. Abou, D. S., Pickett, J. E. & Thorek, D. L. J. Nuclear molecular imaging with nanoparticles: radiochemistry, applications and translation. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150185 (2015).
92. Wang, A. Z., Langer, R. & Farokhzad, O. C. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu. Rev. Med.* **63**, 185–198 (2012).
93. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. & Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **33**, 2373–2387 (2016).
94. Akhter, S. *et al.* Nanomedicines as cancer therapeutics: current status. *Curr. Cancer Drug Targets* **13**, 362–378 (2013).
95. Akhter, S. *et al.* Nanomedicines as cancer therapeutics: current status. *Curr. Cancer Drug Targets* **13**, 362–378 (2013).
96. Louro, H. Relevance of Physicochemical Characterization of Nanomaterials for Understanding Nano-cellular Interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1048**, 123–142 (2018).
97. Oberdörster, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J. Intern. Med.* **267**, 89–105 (2010).
98. Yu, M. & Zheng, J. Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles. *ACS Nano* **9**, 6655–6674 (2015).
99. Jain, R. K. & Stylianopoulos, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 653–664 (2010).
100. Au, J. L.-S., Yeung, B. Z., Wientjes, M. G., Lu, Z. & Wientjes, M. G. Delivery of cancer therapeutics to extracellular and intracellular targets: Determinants, barriers, challenges and opportunities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 280–301 (2016).
101. Li, Y., Wang, J., Wientjes, M. G. & Au, J. L.-S. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 29–39 (2012).
102. Minchinton, A. I. & Tannock, I. F. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 583–592 (2006).
103. Schuemann, J. *et al.* Roadmap to Clinical Use of Gold Nanoparticles for Radiation Sensitization. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **94**, 189–205 (2016).
104. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **200**, 138–157 (2015).
105. Kunz-Schughart, L. A. *et al.* Nanoparticles for radiooncology: Mission, vision, challenges. *Biomaterials* **120**, 155–184 (2017).
106. Doane, T. L. & Burda, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2885–2911 (2012).
107. Baetke, S. C., Lammers, T. & Kiessling, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150207 (2015).
108. Ahsan, S. M., Rao, C. M. & Ahmad, M. F. Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1048**, 175–198 (2018).
109. Hobbs, S. K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4607–4612 (1998).
110. Greish, K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. Drug Target.* **15**, 457–464 (2007).
111. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **65**, 271–284 (2000).
112. Wong, A. D., Ye, M., Ulmschneider, M. B. & Searson, P. C. Quantitative Analysis of the Enhanced Permeation and Retention (EPR) Effect. *PLoS One* **10**, e0123461 (2015).
113. Kunjachan, S., Ehling, J., Storm, G., Kiessling, F. & Lammers, T. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chem. Rev.* **115**, 10907–10937 (2015).

114. Miller, S. M. & Wang, A. Z. Nanomedicine in chemoradiation. *Ther. Deliv.* **4**, 239–250 (2013).
115. Chatterjee, D. K., Diagaradjane, P. & Krishnan, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther. Deliv.* **2**, 1001–1014 (2011).
116. Weissig, V. & Guzman-Villanueva, D. Nanopharmaceuticals (part 2): products in the pipeline. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 1245–1257 (2015).
117. Luo, G. *et al.* Quantum dots in cancer therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 47–58 (2012).
118. Le, T. Q., Seznec, H. & Delville, M.-H. Functionalized nanomaterials: their use as contrast agents in bioimaging: mono- and multimodal approaches. *Nanotechnol. Rev.* **2**, 125–169 (2013).
119. Harisinghani, M. G. *et al.* Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2491–2499 (2003).
120. Fortuin, A. S., Smeenk, R. J., Meijer, H. J. M., Witjes, A. J. & Barentsz, J. O. Lymphotropic nanoparticle-enhanced MRI in prostate cancer: value and therapeutic potential. *Curr. Urol. Rep.* **15**, 389 (2014).
121. Thaxton, C. S. *et al.* Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines ‘undetectable’ PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18437–18442 (2009).
122. Spiers, F. W. The influence of energy absorption and electron range on dosage in irradiated bone. *Br. J. Radiol.* **22**, 521–533 (1949).
123. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* **49**, N309–315 (2004).
124. Adams, F. H., Norman, A., Mello, R. S. & Bass, D. Effect of radiation and contrast media on chromosomes. Preliminary report. *Radiology* **124**, 823–826 (1977).
125. Matsudaira, H., Ueno, A. M. & Furuno, I. Iodine contrast medium sensitizes cultured mammalian cells to X rays but not to gamma rays. *Radiat. Res.* **84**, 144–148 (1980).
126. Herold, D. M., Das, I. J., Stobbe, C. C., Iyer, R. V. & Chapman, J. D. Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 1357–1364 (2000).
127. Prise, K. M. & Martin, S. G. Editorial-nanoparticles for diagnostic imaging and radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150692 (2015).
128. Strigari, L. *et al.* Targeted dose enhancement in radiotherapy for breast cancer using gold nanoparticles, part 2: A treatment planning study. *Med. Phys.* **44**, 1993–2001 (2017).
129. Lacombe, S., Porcel, E. & Scifoni, E. Particle therapy and nanomedicine: state of art and research perspectives. *Cancer Nanotechnol.* **8**, 9 (2017).
130. Pottier, A., Borghi, E. & Levy, L. The future of nanosized radiation enhancers. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150171 (2015).
131. Marill, J. *et al.* Hafnium oxide nanoparticles: toward an in vitro predictive biological effect? *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* **9**, 150 (2014).
132. Coulter, J. A., Butterworth, K. T. & Jain, S. Prostate cancer radiotherapy: potential applications of metal nanoparticles for imaging and therapy. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150256 (2015).
133. Roeske, J. C., Nunez, L., Hoggarth, M., Labay, E. & Weichselbaum, R. R. Characterization of the theoretical radiation dose enhancement from nanoparticles. *Technol. Cancer Res. Treat.* **6**, 395–401 (2007).
134. Botchway, S. W., Coulter, J. A. & Currell, F. J. Imaging intracellular and systemic in vivo gold nanoparticles to enhance radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150170 (2015).
135. Liu, Y. *et al.* Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells. *Theranostics* **8**, 1824–1849 (2018).
136. Babaei, M. & Ganjalikhani, M. The potential effectiveness of nanoparticles as radio sensitizers for radiotherapy. *BioImpacts BI* **4**, 15–20 (2014).
137. Mirjolet, C. *et al.* The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in

- radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **108**, 136–142 (2013).
138. Maggiorella, L. *et al.* Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol. Lond. Engl.* **8**, 1167–1181 (2012).
  139. McMahon, S. J. *et al.* Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **100**, 412–416 (2011).
  140. McMahon, S. J., Prise, K. M. & Currell, F. J. Comment on ‘implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regard to photon energy, nanoparticle size, concentration and location’. *Phys. Med. Biol.* **57**, 287–290; discussion 291–295 (2012).
  141. Yamada, M., Foote, M. & Prow, T. W. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **7**, 428–445 (2015).
  142. Lechtman, E. *et al.* Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location. *Phys. Med. Biol.* **56**, 4631–4647 (2011).
  143. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 16014 (2016).
  144. Jain, S. *et al.* Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **79**, 531–539 (2011).
  145. Coulter, J. A., Hyland, W. B., Nicol, J. & Currell, F. J. Radiosensitising nanoparticles as novel cancer therapeutics--pipe dream or realistic prospect? *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* **25**, 593–603 (2013).
  146. Chithrani, D. B. *et al.* Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat. Res.* **173**, 719–728 (2010).
  147. Ferrero, V. *et al.* Targeted dose enhancement in radiotherapy for breast cancer using gold nanoparticles, part 1: A radiobiological model study. *Med. Phys.* **44**, 1983–1992 (2017).
  148. Ando, K. & Goodhead, D. T. Dependence and independence of survival parameters on linear energy transfer in cells and tissues. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **57**, 596–606 (2016).
  149. Paunesku, T., Gutiontov, S., Brown, K. & Woloschak, G. E. Radiosensitization and nanoparticles. *Cancer Treat. Res.* **166**, 151–171 (2015).
  150. McMahon, S. J., Paganetti, H. & Prise, K. M. Optimising element choice for nanoparticle radiosensitisers. *Nanoscale* **8**, 581–589 (2016).
  151. Hwang, C., Kim, J. M. & Kim, J. Influence of concentration, nanoparticle size, beam energy, and material on dose enhancement in radiation therapy. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **58**, 405–411 (2017).
  152. Brown, J. M. C. & Currell, F. J. A local effect model-based interpolation framework for experimental nanoparticle radiosensitisation data. *Cancer Nanotechnol.* **8**, 1 (2017).
  153. Incerti, S., Douglass, M., Penfold, S., Guatelli, S. & Bezak, E. Review of Geant4-DNA applications for micro and nanoscale simulations. *Phys. Medica PM Int. J. Devoted Appl. Phys. Med. Biol. Off. J. Ital. Assoc. Biomed. Phys. AIFB* **32**, 1187–1200 (2016).
  154. Le Trequesser, Q. *et al.* Single cell in situ detection and quantification of metal oxide nanoparticles using multimodal correlative microscopy. *Anal. Chem.* **86**, 7311–7319 (2014).
  155. Barberet, P. *et al.* Monte-Carlo dosimetry on a realistic cell monolayer geometry exposed to alpha particles. *Phys. Med. Biol.* **57**, 2189–2207 (2012).
  156. Sancey, L. *et al.* The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br. J. Radiol.* **87**, 20140134 (2014).
  157. Lechtman, E. & Pignol, J.-P. Interplay between the gold nanoparticle sub-cellular localization, size, and the photon energy for radiosensitization. *Sci. Rep.* **7**, 13268 (2017).
  158. McNamara, A. L. *et al.* Dose enhancement effects to the nucleus and mitochondria from gold nanoparticles in the cytosol. *Phys. Med. Biol.* **61**, 5993–6010 (2016).
  159. Zuberek, M. & Grzelak, A. Nanoparticles-Caused Oxidative Imbalance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1048**, 85–98 (2018).
  160. Cheng, N. N. *et al.* Chemical enhancement by nanomaterials under X-ray irradiation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1950–1953 (2012).

161. Simon, M. *et al.* In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity. *Nanotoxicology* **11**, 134–145 (2017).
162. Garlatti, M. & Barouki, R. Le stress du réticulum endoplasmique : adaptation et toxicité. *MS Médecine Sci. ISSN Pap. 0767-0974 ISSN Numér. 1958-5381 2002 Vol 18 N° 5 P 585-594* (2002). doi:10.1051/medsci/2002185585
163. Simon, M., Barberet, P., Delville, M.-H., Moretto, P. & Sez nec, H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology* **5**, 125–139 (2011).
164. Roa, W. *et al.* Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. *Nanotechnology* **20**, 375101 (2009).
165. Wolfram, J. *et al.* Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr. Drug Targets* **16**, 1671–1681 (2015).
166. Sengupta, J., Ghosh, S., Datta, P., Gomes, A. & Gomes, A. Physiologically important metal nanoparticles and their toxicity. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 990–1006 (2014).
167. Gaspar, R. & Duncan, R. Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1220–1231 (2009).
168. Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. & Borm, P. J. A. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* **61**, 727–728 (2004).
169. Kipen, H. M. & Laskin, D. L. Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **289**, L696–697 (2005).
170. Stone, V. & Donaldson, K. Nanotoxicology: signs of stress. *Nat. Nanotechnol.* **1**, 23–24 (2006).
171. Love, S. A., Maurer-Jones, M. A., Thompson, J. W., Lin, Y.-S. & Haynes, C. L. Assessing nanoparticle toxicity. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* **5**, 181–205 (2012).
172. Dwivedi, S. *et al.* Toxicogenomics: A New Paradigm for Nanotoxicity Evaluation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1048**, 143–161 (2018).
173. Umair, M. *et al.* Nanotoxicity of Inert Materials: The Case of Gold, Silver and Iron. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* **19**, 161–180 (2016).
174. Sabella, S. *et al.* A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* **6**, 7052–7061 (2014).
175. Meindl, C., Kueznik, T., Bösch, M., Roblegg, E. & Fröhlich, E. Intracellular calcium levels as screening tool for nanoparticle toxicity. *J. Appl. Toxicol. JAT* **35**, 1150–1159 (2015).
176. Girigoswami, K. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1048**, 99–122 (2018).
177. Bettini, S. *et al.* Food-grade TiO<sub>2</sub> impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci. Rep.* **7**, 40373 (2017).
178. Gherardi, R. K. & Authier, F. J. Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus* **21**, 184–189 (2012).
179. Jara, L. J. *et al.* Severe manifestations of autoimmune syndrome induced by adjuvants (Shoenfeld's syndrome). *Immunol. Res.* **65**, 8–16 (2017).
180. What happened to personalized medicine? *Nat. Biotechnol.* **30**, 1 (2012).
181. Hofmann-Antenbrink, M., Grainger, D. W. & Hofmann, H. Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **11**, 1689–1694 (2015).
182. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **200**, 138–157 (2015).
183. Wacker, M. G., Proykova, A. & Santos, G. M. L. Dealing with nanosafety around the globe-Regulation vs. innovation. *Int. J. Pharm.* **509**, 95–106 (2016).



184. Maynard, A. D. Don't define nanomaterials. *Nature* **475**, 31 (2011).
185. Zygmanski, P. & Sajo, E. Nanoscale radiation transport and clinical beam modeling for gold nanoparticle dose enhanced radiotherapy (GNPT) using X-rays. *Br. J. Radiol.* **89**, 20150200 (2016).
186. Maier-Hauff, K. *et al.* Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **81**, 53–60 (2007).
187. Technologie NanoXray. *Nanobiotix*
188. Bonvalot, S. *et al.* First-in-Human Study Testing a New Radioenhancer Using Nanoparticles (NBTXR3) Activated by Radiation Therapy in Patients with Locally Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 908–917 (2017).
189. NBTXR3 Crystalline Nanoparticles and Radiation Therapy in Treating and Randomized Patients in Two Arms With Soft Tissue Sarcoma of the Extremity and Trunk Wall - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02379845>. (Accessed: 30th March 2018)
190. NANOBIOTIX. NANOBIOTIX annonce les résultats positifs de sa phase II/III dans les sarcomes des tissus mous avec NBTXR3. *GlobeNewswire News Room* (2018). Available at: <http://globenewswire.com/news-release/2018/06/21/1528083/0/fr/NANOBIOTIX-annonce-les-r%C3%A9sultats-positifs-de-sa-phase-II-III-dans-les-sarcomes-des-tissus-mous-avec-NBTXR3.html>. (Accessed: 22nd July 2018)
191. Bonvalot, S. *et al.* LBA66A phase II/III trial of hafnium oxide nanoparticles activated by radiotherapy in the treatment of locally advanced soft tissue sarcoma of the extremity and trunk wall. *Ann. Oncol.* **29**, (2018).
192. NBTXR3 Crystalline Nanoparticles and Stereotactic Body Radiation Therapy in the Treatment of Liver Cancers - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02721056>. (Accessed: 30th March 2018)
193. NBTXR3 Crystalline Nanoparticles and Radiation Therapy in Treating Patients With Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity or Oropharynx - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01946867>. (Accessed: 30th March 2018)
194. A Study of PEP503 With Radiotherapy in Combination With Concurrent Chemotherapy for Patients With Head and Neck Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02901483>. (Accessed: 23rd July 2018)
195. NBTXR3 Nanoparticles and EBRT or EBRT With Brachytherapy in the Treatment of Prostate Adenocarcinoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02805894>. (Accessed: 30th March 2018)
196. NBTXR3 Activated by SABR for Patients With Advanced HNSCC or NSCLC Treated With an Anti-PD1 Antibody - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03589339?term=NBTXR3&rank=3>. (Accessed: 23rd July 2018)
197. A Study of PEP503(Radio-enhancer) With Radiotherapy and Chemotherapy for Patients With Rectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02465593>. (Accessed: 24th July 2018)
198. Lux, F. *et al.* [Ultrasmall nanoparticles for radiotherapy: AGuIX]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **19**, 508–514 (2015).
199. Radiosensitization of Multiple Brain Metastases Using AGuIX Gadolinium Based Nanoparticles - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02820454>. (Accessed: 28th March 2018)
200. AGuIX Gadolinium-based Nanoparticles in Combination With Chemoradiation and Brachytherapy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03308604>. (Accessed: 30th March 2018)
201. Simon, M., Barberet, P., Delville, M.-H., Moretto, P. & Seznec, H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human

- keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology* **5**, 125–139 (2011).
202. Barberet, P. & Seznec, H. Advances in microbeam technologies and applications to radiation biology. *Radiat. Prot. Dosimetry* **166**, 182–187 (2015).
203. Bourret, S. *et al.* Fluorescence time-lapse imaging of single cells targeted with a focused scanning charged-particle microbeam. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **325**, 27–34 (2014).
204. Muggioli, G. *et al.* Single  $\alpha$ -particle irradiation permits real-time visualization of RNF8 accumulation at DNA damaged sites. *Sci. Rep.* **7**, 41764 (2017).
205. Incerti, S. *et al.* Monte Carlo dosimetry for targeted irradiation of individual cells using a microbeam facility. *Radiat. Prot. Dosimetry* **133**, 2–11 (2009).
206. Titanium Dioxide Nanoparticles (Tio<sub>2</sub> Nanoparticles) | Knowledge Base Nanomaterials. Available at: <https://www.nanopartikel.info/en/nanoinfo/materials/titanium-dioxide>. (Accessed: 23rd September 2018)
207. Zeman, T., Loh, E.-W., Čierný, D. & Šerý, O. Penetration, distribution and brain toxicity of titanium nanoparticles in rodents' body: a review. *IET Nanobiotechnol.* **12**, 695–700 (2018).
208. Zhang, B. *et al.* ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **86**, 429–435 (2010).
209. Yamamori, T., Meike, S., Nagane, M., Yasui, H. & Inanami, O. ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. *FEBS Lett.* **587**, 3348–3353 (2013).
210. Hetz, C. & Chevet, E. Theme Series--UPR in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **33**, 1–2 (2015).



## Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.





# **Nanoparticules de numéro atomique élevé en radio-oncologie : état des lieux, et évaluation de leur potentiel radiopotentialisant**

## **RÉSUMÉ**

**Objectifs :** Effectuer une revue de la littérature pour définir la place dans la stratégie thérapeutique, l'impact actuel et le possible impact futur des nanoparticules (NPs) en onco-radiothérapie. Étudier le potentiel radiopotentialisant des NPs de numéro atomique élevé à travers une revue de la littérature et une partie expérimentale avec des NPs de dioxyde de Titane (TiO<sub>2</sub> NPs).

**Matériels et Méthodes :** La lignée cellulaire IB115 (liposarcome para-testiculaire) a été exposée à des TiO<sub>2</sub> NPs (nanofeuillets, longueur moyenne 178 nm) natifs ou fonctionnalisés au TRITC, à 0, 2 et 4 µg.cm<sup>-2</sup>, et a été irradiée à des doses de 0, 1, 2 et 6 Gy sur un accélérateur linéaire médical de type CLINAC (Varian Medical System) par des photons de 6 MeV. La composition chimique multi-élémentaire a été analysée sur la plateforme AIFIRA après cryofixation. Une analyse par gènes rapporteurs de voies de stress cellulaire (NFκB, NRF2, p53, ATF4, ATF6, ERSE) a été effectuée sur la plateforme BMYScreen. La fonction mitochondriale et l'activation de l'apoptose ont été analysées par immunodétection (Cytochrome C, Caspase 3 clivée). L'activation des voies du stress du réticulum endoplasmique (RE) et du stress oxydant ont été analysées par RTqPCR.

**Résultats :** L'internalisation des TiO<sub>2</sub>NPs est exclusivement cytoplasmique et péri-nucléaire. Elle induit une relocalisation cytoplasmique du Cytochrome c et une activation de la Caspase 3 clivée, signant une action médiée par la mitochondrie. L'exposition aux TiO<sub>2</sub> NPs induit l'activation des gènes de la voie du stress du RE et une augmentation du calcium intracellulaire, sans activation de la voie du stress oxydant. L'exposition aux radiations ionisantes induit une augmentation du calcium intracellulaire et une activation de la voie du stress du RE. La combinaison TiO<sub>2</sub>NPs-radiothérapie potentialise l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la voie du stress du RE.

**Conclusions :** Les NPs de dioxyde de Titane ne sont pas biologiquement inertes. Leur action en combinaison avec la radiothérapie implique la voie du stress du RE, une dysfonction mitochondriale, une activation de la voie apoptotique intrinsèque et une altération de l'homéostasie calcique. Le mode d'action de la combinaison TiO<sub>2</sub>NPs-radiothérapie se définit par une radiosensibilisation et non une seule radiopotentialisation.

**TITRE EN ANGLAIS: High Atomic Number Nanoparticles in Radiation-Oncology:  
state of the art, and evaluation of their radiopotentializing potential.**

**DISCIPLINE :** oncologie-radiothérapie

**MOT-CLES :** radiothérapie, oncologie, nanoparticules, radiopotentialisation, radiosensibilisation, numéro atomique élevé, dioxyde de titane

**UFR DES SCIENCES MEDICALES – UNIVERSITE DE BORDEAUX**