

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

SCIENCES & GÉOGRAPHIE

/ / / / / / / / / /

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Discipline : Génie biologique et médical

présentée et soutenue publiquement

par

Stéphanie CORDE

le 21 octobre 2002

**Développement méthodologique de l'application d'agents
pharmacologiques renforceurs de l'effet photoélectrique
pour l'utilisation du rayonnement synchrotron
en radiothérapie anticancéreuse**

Directeur de thèse: Jacques BALOSSO

COMPOSITION DU JURY :

M. VALLADE, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble	Président
M. TERRISSOL, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
C. LE SECH, Professeur, Université Paris XI, Orsay	Rapporteur
J. LAISSUE, Professeur émérite, Université de Bern, Suisse	Examineur
J.F. LE BAS, Professeur, Praticien Hospitalier, UJF-CHU, Grenoble	Directeur de thèse
J. BALOSSO, Maître de conférences, Praticien Hospitalier, UJF-CHU, Grenoble	Directeur de thèse

Développement méthodologique de l'application d'agents pharmacologiques renforçateurs de l'effet photoélectrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse

La radiothérapie anticancéreuse repose sur trois grands principes: 1) restriction anatomique de l'irradiation ; 2) fractionnement temporel du traitement; 3) traitement de tissus plus sensibles aux rayonnements que les tissus sains environnants. Sous ces principes se cache un idéal: celui de déposer plus d'énergie de rayons X (RX) dans les tumeurs, en préservant les tissus sains adjacents. Objectif difficile à atteindre puisqu'une des causes d'échec de ce traitement est la poursuite de l'évolution tumorale. Le rayonnement synchrotron pourrait-il être plus efficace? Les variations des coefficients d'interactions rayonnement-matière, en fonction de l'énergie des RX et du numéro atomique du matériau, montrent que certaines énergies et certains matériaux sont préférables pour obtenir un maximum d'interactions et d'énergie déposée. Le rayonnement synchrotron permet de sélectionner précisément ces énergies, grâce à sa très grande intensité. Ses caractéristiques spectrales (énergie des RX entre 10 et 100 keV) permettent de déclencher l'effet photoélectrique, avec un maximum de probabilité, sur des éléments lourds introduits au voisinage de cellules tumorales. Il a été montré que: 1) la tomодensitométrie par rayonnement synchrotron est une technique d'imagerie quantitative, potentiellement puissante pour la radiothérapie car elle assure *in vivo* la mesure de la concentration intratumorale d'agent de contraste (I ou Gd); 2) en présence d'agent de contraste iodé l'effet létal des RX sur la survie cellulaire est augmenté et le gain de radiosensibilisation dépend de l'énergie des RX; 3) à l'échelle cellulaire, la létalité de l'irradiation peut être encore optimisée en transportant des atomes lourds (I, Pt) au cœur de l'ADN, cible biologique de l'irradiation. Ce renforcement de l'efficacité létale des RX de basses énergies, grâce à une interaction *physique* ciblée sur un agent pharmacologique, est un concept original en radiothérapie anticancéreuse.

Mots clés : rayonnement synchrotron ; effet photoélectrique ; iode ; gadolinium ; platine ; électrons Auger ; survie cellulaire ; cassures double brins ; ADN ; tomographie ; radiothérapie ; dosage

Enhancement of the photo-electric effect with pharmacological agents in synchrotron radiation based anti cancer radiotherapy: a methodological study

Anticancer therapy rests on three main principles: 1) anatomic confinement of irradiation; 2) temporal fractioning of treatment; 3) treatment of tissues that are more sensitive to radiation than surrounding healthy tissue. Under those principles hides the goal of radiotherapy: to deposit more of the X-ray energy in the tumour while preserving the surrounding healthy tissues. This goal is hard to reach since one of the causes of the failures in radiotherapy is the continuing evolution of the tumour. Could synchrotron radiation be more effective as an X-ray source for radiotherapy? The variation of the radiation-matter interaction cross-sections as a function of X-ray energy and atomic number of the medium show that certain energies and certain elements are more suitable to obtain the largest number of interactions and the largest amount of deposited energy. Synchrotron radiation allows to select precisely those energies because of its high spectral intensity. Its spectral characteristics (energy of the photons between 10 and 100 keV) allow to trigger the photoelectric effect with a maximum of probability on heavy elements introduced close to cancerous cells. It has been shown that: 1) synchrotron radiation based tomодensitometry is a quantitative imaging technique, potentially powerful for radiotherapy since it insures *in-vivo* the measurement of intra-tumoral concentration of contrast agent (I or Gd); 2) in the presence of iodinated contrast agent the lethal effect of X-rays on cell survival is increased and the gain in radio sensitivity depends on X-ray energy ; 3) at the cellular scale the lethality of irradiation can be optimised again by transporting heavy atoms (I, Pt) inside the DNA, which is the biological target of the irradiation. This reinforcement of the killing efficiency of low energy X-rays using a *physical* mechanism aimed at a pharmacological agent is an original concept in anti cancer radiotherapy.

Keywords : synchrotron radiation ; photo-electric effect ; iodine ; gadolinium ; platinum ; Auger electrons ; cell survival ; DNA ; double strand breaks ; tomography ; radiotherapy ; dosage

Discipline: Génie Biologique et Médical

Equipe d'accueil n°2941 de l'université Joseph Fourier « Rayonnement synchrotron et Recherche Médicale », CHU A. Michallon, Unité IRM, B.P. 217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

M

*ais si les fruits de notre recherche ne nous apportent aucun soulagement,
nous pouvons au moins trouver quelque consolation dans la recherche elle-même.*

Les hommes et les femmes ne se contentent pas de se rassurer avec des contes de Dieux et de géants,

ou de confiner leurs pensées dans les problèmes de la vie quotidienne;

ils construisent aussi des télescopes, des satellites et des accélérateurs,

et restent assis des heures sans fin devant leurs bureaux à chercher

la signification des données qu'ils ont assemblées.

L'effort consenti pour comprendre l'univers est l'une des rares choses

qui élèvent la vie humaine au-dessus du niveau de la farce,

et lui confèrent un peu de la dignité de la tragédie.

Steven Weinberg

A mes grands-parents

A mes parents

A Moeava et Lécérina

Sources de soutien et de réconfort, permanents et inconditionnels.

Remerciements

L'heure est venue de remercier tous ceux qui d'une manière ou d'une autre m'ont aidé dans cette incroyable aventure humaine et scientifique. Celle-ci ayant été particulièrement longue et riche en personnes à remercier, je m'excuse d'avance pour le manque de concision de ce qui va suivre.

L'histoire a débuté en mars 1997.

*A cette époque, j'étais en stage du DEA « Rayonnements et Imagerie en Médecine, option physique radiologique et médicale » au centre de physique de plasmas et de leurs applications de Toulouse. Misérablement classée 3^{ème} de ma promotion, aucune bourse du ministère ne se profilait à l'horizon et de toute façon je n'avais à l'époque qu'une seule et unique intention : poursuivre ma formation à Grenoble, qui était et sera toujours à mes yeux un pôle d'excellence en Physique. Ma place au centre hospitalier Michallon était déjà plus ou moins réservée pour le stage de validation de l'année de formation professionnelle qui devait tout naturellement suivre mon DEA, mais cela ne me suffisait pas : je désirais vraiment, presque aveuglément, faire une thèse car mon court séjour auprès de **Yves Salaméro** et **Pierre Millet** m'avait vraiment enthousiasmé et l'idée de faire carrière dans la recherche mûrissait en moi. C'est presque eux que j'aurais envie de remercier en premier car sans eux et sans tout ce qu'ils m'ont apporté, je n'en serais pas là aujourd'hui.*

*J'ai donc décidé de faire quelques recherches sur Internet : quels laboratoires seraient susceptibles de m'accueillir sur Grenoble, sachant qu'a priori je n'aurais aucun financement dédié pour la réaliser et que je me proposais de la financer moi-même en exerçant mon métier de radiophysicienne en parallèle ? Cette question je l'ai posée à plusieurs responsables de laboratoire de la communauté scientifique grenobloise. J'ai conservé quelques traces des échanges électroniques que j'ai eus à l'époque et j'ai été récemment très surprise de constater que c'est auprès de **Christoph Segebarth** et de **Michel Décorps** que mes prospections ont été les mieux accueillies. Ces noms-là ne m'étaient alors pas familiers, mais je sais aujourd'hui que j'ai eu de la chance que ces personnes s'intéressent à mon cas. M. Décorps a notamment pris le temps de me confier sa façon de concevoir le doctorat au cours de longs mails et de m'expliquer pourquoi ma proposition de thèse auto-financée ne tiendrait pas la route auprès de l'université Joseph Fourier. Plusieurs mois plus tard et après un long silence, c'est finalement M. Décorps qui s'est souvenu de mon cas et qui m'a écrit le 12/09/97 à 11h16 un rapide message qui disait : « Bonjour, une possibilité de thèse (région) existe peut-être pour vous. Il s'agit d'un programme concernant la ligne médicale de l'ESRF. Il faudrait que vous contactiez le professeur J.F. Le Bas au CHU. Je lui ai parlé de votre problème. Cordialement. M. Décorps ». Ce petit message a bouleversé ma vie. J'en serais toujours infiniment reconnaissante à son auteur.*

*C'est donc le 12/09/97 à 11h17 que j'ai pour la première fois parlé avec **Jean-François Le Bas**. Au cours de cet entretien téléphonique, l'engouement de Jean-François pour la ligne médicale avait plus que transpercé. Le projet qu'il m'a décrit et dont j'ignorais l'existence jusqu'alors m'a littéralement fasciné ; à tel point que seuls quelques mots ont été griffonnés avec hâte sur le message de M. Décorps : 'ligne médicale', 'aspect radiothérapie', 'interface physique-médecine'. Des conversations téléphoniques comme celles-ci, il y en a eu des dizaines, suivies de rencontres lorsque je suis rentrée sur Grenoble. Jusqu'au dernier moment j'ai douté que ma candidature aboutisse. Jusqu'au dernier moment je me suis demandée si je pouvais avoir confiance en la certitude de Jean-François qu'un sujet de thèse allait s'ouvrir à moi, en plus au Synchrotron, en plus sur la ligne médicale. C'était tellement irréel que je n'osais y croire. Jean-François je vous remercie à présent pour tout cela. Pour votre ouverture d'esprit, pour votre jovialité, pour votre bonne humeur constante, pour votre optimisme, pour votre écoute, pour la confiance que vous m'avez témoignée, pour ce projet magnifique auquel vous m'avez donné l'incroyable chance de participer. J'ai été sensible à vos qualités humaines et à vos idées, dont j'ai essayé de conserver la philosophie au cours de mes travaux. J'espère que vous serez fier de moi en lisant ce manuscrit, autant que je suis fière que vous ayez été mon premier directeur de thèse.*

La direction de cette thèse a néanmoins été modifiée en cours de route. Ce grand homme radiothérapeute-chercheur-radiobiologiste-enseignant-hadroniste-randonneur (à ses heures), venu d'aussi loin que Paris pour nous illuminer de ses talents, a débarqué dans le service de radiothérapie du CHU de Grenoble en Septembre 1998. Quelques mois après le début de ma thèse, il m'a été proposé que ce soit lui, **Jacques Balosso**, qui encadre mes travaux. Je ne cacherais pas que cette proposition m'a choquée. Je conservais en effet de l'enseignement de mon DEA l'idée stupide que les radiothérapeutes étaient plutôt dépassés par les avancées de la physique. Que c'était plutôt à nous, radiophysiciens, de leur enseigner nos connaissances dans le domaine. Et c'est pour cette unique raison que j'ai refusé cette proposition. Uniquement celle-là. Je sais aujourd'hui que j'ai eu tort. A la fois pour Jacques et pour les radiothérapeutes dans leur généralité. C'est la première chose pour laquelle je voulais te remercier, Jacques : grâce à toi, à ta formidable personnalité, à ton insatiable curiosité scientifique, à ta modestie, je verrai à présent et à jamais l'ensemble de la communauté radiothérapeute sous un autre œil, un trillion de fois plus admiratif. Cela va affecter mon comportement à long terme je le crains. Mon côté pessimiste prévoit déjà que je risque même d'en souffrir car je vais tenter de retrouver en tout radiothérapeute quelqu'un comme toi et je sais d'avance que je vais être déçue. Je me suis mille fois demandée comment j'allais pouvoir trouver les mots pour te remercier à la hauteur de ce que tu mérites. Comme l'a si bien écrit Victor Hugo « L'émotion est toujours neuve et le mot a toujours servi, de là l'impossibilité d'exprimer l'émotion », j'en vis aujourd'hui la triste expérience. Je vais donc me contenter d'allusions qui ne seront que le pâle reflet de mon sentiment. Jacques, idéalement j'aimerais que toutes les fois que tu rentreras tard le soir chez toi (ou tôt le matin !), tu lèves le nez au ciel pour contempler le ciel étoilé. Les étoiles se réuniraient alors en un harmonieux cortège pour former le mot MERCI, en lettres capitales. C'est un merci comme celui-là que tu mérites. Et en parlant d'ETOILES, je suis toute prête à en être, sois-en convaincu, car je sacrifierais bien toutes les îles du Pacifique Sud pour rester un peu plus longtemps à tes côtés. Mon amitié et ma reconnaissance pour toi sont tout simplement sans limite. J'espère que tu ne garderas pas un trop mauvais souvenir de ta première thésarde, car c'est bien ce que j'ai finalement été. Et je te garantis que je n'ai pas fini de m'en vanter !

Tout cela devrait faire plaisir au directeur de l'équipe RSRM, **François Estève** ! Tu vois François j'ai fini par ranger mon sale caractère et admettre avec 3 ou 4 années de retard que tu avais raison. En plus de m'avoir accepté dans l'équipe, je voulais te remercier pour une particularité que je trouve sincèrement extraordinaire chez toi : ta volontaire et généreuse disponibilité pour proposer ton aide en cas de besoin ! Sérieusement je n'avais jamais vu cela chez personne d'autre auparavant. Que ce soit pour les paperasseries administratives, pour corriger un article, pour dégoter un contrat pour financer les mois de surplus de thèse, pour conseiller le nom d'un spécialiste à une future maman angoissée pour son bébé par le spectre d'une mucoviscidose, tu as toujours été le premier à proposer ton aide. TOUJOURS. Cette constance m'impressionne énormément. RSRM a énormément de chance de t'avoir comme directeur. Merci.

Messieurs les professeurs **Claude Le Sech** et **Michel Terrissol** ont eu la gentillesse de s'intéresser à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je les remercie vivement pour cette contribution. C'est également un grand honneur que me font Messieurs les professeurs **Marcel Vallade** et **Jean Laissue** de participer à ce jury et je leur adresse mes plus sincères remerciements.

Plus qu'un remerciement, j'aurais à présent aimé rendre hommage à une femme exceptionnelle, une scientifique hors du commun, une mère exemplaire. Trois femmes en une, voilà comment je vois **Hélène Elleaume**. Hélène, tu es devenue au fil du temps un véritable modèle pour moi. Une mère, une sœur, une amie, une collègue, une confidente, une idole, tu as su à tour de rôle prendre ces différentes places dans ma vie. La liste des choses pour lesquelles j'aimerais te remercier étant bien trop longue, saches seulement que je vais tout faire pour essayer de te ressembler ... un jour ! Sérieusement je ne sais pas comment tu fais pour tout concilier harmonieusement, j'ai encore beaucoup à apprendre de toi !

Rassurez-vous, je n'oublierai pas d'inclure dans mes remerciements le reste de l'équipe RSRM : **Anne-Marie Charvet** pour les discussions passionnantes de physique que nous avons eues (quelques eV auraient-ils pu changer significativement l'allure des courbes de survie ? J'espère que la lecture de cette thèse t'apportera au moins des éléments de réponse, à défaut d'y répondre brillamment !); **Géraldine Le Duc** (-Picard) pour sa présence et son soutien des premiers mois, pour ses judicieux conseils et pour l'approche que j'ai eue grâce à elle de ce que pouvait être une interface physique-biologie (tu sais que je détecte encore l'odeur du parfum que tu portais lors du run tomo d'octobre 1998 !!!) ; **Irène Troprés** (-Broux), mon local contact officiel sur ID17 pour sa sympathie, son goût pour les destinations lointaines et surtout sa rigueur et sa disponibilité lors des réglages du faisceau des manipes PAT (je peux le dire maintenant que je suis partie : tu as accompli l'exploit de gagner ma confiance dans ce domaine, c'est un véritable exploit !) ; parmi les plus jeunes j'adresse mes amicaux remerciements à : **Norelhouda Hafsaoui**, même si son passage dans nos vies et sur terre a été injustement raccourci (elle serait devenue une excellente scientifique, j'en suis convaincue), **Jean-François Adam** pour toutes les discussions non-scientifiques que nous avons eues ; **Aurélié Joubert** pour sa dynamique participation aux campagnes d'expériences et sa sociabilité (c'est grâce à toi que j'ai découvert Saint Malo, je ne peux pas l'oublier ! Mais si la Bretagne m'a conquise je ne vois toujours pas ce qu'ils ont de spécial... les Bretons !) et enfin **Marie-Claude Biston**, collègue radiophysicienne, partenaire de soirées mémorables (tu as de belles mains tu sais ?), miss Samba et future entraîneuse de tennis de Lécérina (dis-tu, dis-tu !), pour sa présence, son soutien, sa confiance, les places de concert de Goldman (là tu m'as sauvé la vie) et les bons sandwiches au camembert infâme que nous a généreusement offerts son papa (ça change des supers restos, il fallait le souligner, non ?!).

At the ESRF, I want to warmly thank **William Thomlinson** for continuously being interested in my work. Bill, I would like to express you my gratitude especially for the beamtime allocation on ID17 and for the numerous administrative matters that you solved for me. My unique deception is not to be fluent enough in English to write my PhD in your native language! Many thanks to ID17 folk: **Christian Nemoz**, **Michel Rénier**, **Thierry Brochard**, **Steffan Fiedler** and **Alberto Bravin** for their spontaneous help and **Elke Brauer-Krish** who courageously shared with me her office during the writing of this report (Do you know you are responsible for my idea to go to Sydney for a postdoctoral position!). I don't forget **Stafan Ohlsson** who spent a lot of time to solve my personal computer problem (I am not sure to have still the most sensual lips of the medical beamline! Do the newcomers relieve me?); **Paul Berkvens** and **Claudio Ferrero** for Monte-Carlo simulations introduction; **Gilles Retout**, **François Turel** and **Roland Taffut** for their friendly welcome at the ESRF; **Chantal Argoud** for her communicative taste for science vulgarization.

Au cours de ma thèse, j'ai rencontré trois postdocs vraiment exceptionnels. **Barbara Fayard** tout d'abord que je remercie chaleureusement pour son incroyable bonne humeur, son manuscrit de thèse (à lire !), l'accès privilégié au microscope de ID21 et ses conseils concernant les électrons Auger (Barbara, sans toi c'est clair, je serai encore à 1000 années lumières de la Vérité !). Ensuite j'adresse ma plus vive reconnaissance à **Sylvain Bohic** pour ses conseils, son soutien, sa présence pendant la rédaction de ce travail et l'efficacité de l'encadrement scientifique qu'il a fourni avant, pendant, après, et bien après encore le temps de faisceau qui m'a été accordé sur ID22 (Sylvain je t'offre un capital temps de plusieurs boîtes polystyrène et d'embouteillages à La Tronche pour tout ça !). Enfin, je remercie ma plus précieuse collaboration, établie par le plus grand hasard grâce à Danielle Garambois, manipulatrice au centre hospitalier de Bourg en Bresse, qui, me voyant lire la thèse de sciences de Jacques Balosso, a eu l'incroyable intuition de m'apporter le mémoire de DEA du fils de ses voisins « postdoc à l'IGR, travaillant aussi sur des cellules », **Nicolas Foray** en l'occurrence. Je ne m'imaginais pas que nous en serions là 3 ans plus tard, avec un million d'aventures en commun (notre première rencontre en gare de Grenoble, la balade à Lyon pour rencontrer ton papa, les irradiations à 4 degrés annoncées au dernier moment !), des nuits entières à manipuler ensemble, des heures et des heures d'explications pour m'initier aux mystères de la radiobiologie moléculaire. Nicolas, tu représentes pour moi l'incarnation vivante du génie. Je suis très heureuse que nos destins se soient croisés de la sorte et que tu aies pu trouver à Grenoble une

terre d'accueil pour poursuivre ta carrière. A ces trois personnes j'aimerais tout particulièrement souhaiter bonne continuation avec l'espoir dissimulé qu'un jour, qui sait, nous aurons de nouveau l'occasion de travailler ensembles !

Au CHU de Grenoble, je remercie l'intégralité du personnel du service de radiothérapie et tout particulièrement **Michel Bolla, Jean-Yves Giraud, Andrée Dusserre, Patrick Vassal, Alain Gontier, Christiane De Villèle, Caroline Pasteris, Catherine Le Verre**, pour leur soutien permanent et enthousiaste ; dans l'unité IRM, **Marie-Dominique Fabbri** et **Nadine Micoud** pour leur aide administrative ultra-efficace ; en Biochimie C, **Véronique Ducros** et **Laurence Puillet** pour les dosages avec le spectromètre de masse ; **Jean Boutonnat** et **Magali Barbier** pour leurs mesures de cytométrie en flux ; **Madame Rostaing** pour l'accueil qu'elle nous a réservé en Biochimie A lors de la conception du gel de Fricke et enfin **Marc Colonna**, au Registre du cancer, pour l'intérêt qu'il a porté à notre problème d'analyse statistique de nos données.

A l'INSERM, je remercie vivement les membres des unités U438 et U418 pour leurs conseils et leur appui scientifique et technique. **Régine Farion** et **Chantal Rémy** ont été d'un calme exemplaire face à notre utilisation effrénée du laboratoire de culture cellulaire (je suis certaine que nous allons vous manquer maintenant que la ligne médicale possède son propre laboratoire !) ; **François Berger** a été plus d'une fois sollicité pour donner son avis sur des points difficiles de ce travail. Je le remercie donc vivement pour son écoute attentive et sa sympathie ; les noms de **Michel Décorps** et **Christoph Segebarth** réapparaissent ici en tant que directeurs de l'U438, ce qui me donne l'excellente occasion de les remercier une seconde fois, mais cette fois-ci pour nous avoir autorisé à emprunter le matériel nécessaire à la mise en route des expériences de radiobiologie à l'ESRF. Si l'unité U350 de l'institut Curie-Recherche est physiquement plus éloignée que les deux précédentes, l'attachement de Jacques Balosso à son ancien laboratoire nous a conduit à plusieurs reprises à demander de l'aide à **Vincent Favaudon**. Je le remercie aujourd'hui tout particulièrement pour ses conseils avisés et le matériel indispensable qu'il nous a fait parvenir, souvent en urgence.

Je remercie **Ramon Marti-Battle** et **Emmanuel Camus** de la société Samba technologies de Meylan pour leur collaboration ainsi que **Philips Systèmes Médicaux** à Limonest pour leur partenariat.

Tous mes amis et tous ceux qui, d'une manière plus générale, ont subi patiemment mes sautes d'humeur au cours de ces 4 dernières années, seront ici aujourd'hui j'espère enfin un peu récompensés : **Anne-Marie Patellis, Cécile Cohard et Laurent Gros, Annie Gontier, Magali Storer et Laurent, Laurence Vial et Sounil, Stéphane Fief et Séverine Mercier, Stéphanie Gout, Marie-Carmen De Sousa, Enno Bibow et Laurence Martel, Cathy Gaudenz, Nacéra Mébarki, Patricia Michelas, ma famille**. Bien évidemment le plus courageux de tous, ce fut incontestablement **Moeava Tehei**, mais ce n'est pas pour rien que j'ai décidé de l'épouser ! **Lécérina**, notre bébé d'amour, a plus d'une fois ces derniers temps grimpé sur mes genoux pour tapoter avec moi sur le clavier de mon ordinateur, en espérant sûrement que je lui accorderais ainsi un peu plus d'attention. Merci ma puce pour avoir accepté que ta maman y passe du temps, j'espère que tu comprendras à travers ces lignes l'importance que cela avait à mes yeux.

Un très grand merci enfin à la **Région Rhône-Alpes** et à la **Fondation pour la Recherche Médicale** d'avoir accepté de financer ce travail dans sa quasi-totalité. L'**Association pour la Recherche sur le Cancer** et la **Ligue contre le cancer** ont également cru en nous et ont alloué à ce projet une partie de leurs crédits recherche. Merci.

Sommaire

<i>Avant Propos</i>	1

I.	INTRODUCTION	3

I.1.	LES OUTILS ACTUELS DU RADIODIAGNOSTIC ET DE LA RADIOTHÉRAPIE.....	4
I.2.	APPORTS POTENTIELS DU RAYONNEMENT SYNCHROTRON AU DOMAINE MÉDICAL	6
I.3.	GENÈSE D'UN DOMAINE DE RECHERCHE EN IMAGERIE ET EN THÉRAPIE.....	8

II.	MECANISMES D'ACTION DES RADIATIONS IONISANTES: DE L'ÉVÉNEMENT PHYSIQUE INITIAL AUX APPLICATIONS ET RECHERCHES CLINIQUES	11

II.1.	EFFETS PHYSIQUES INITIAUX DE L'IRRADIATION.....	12
II.1.1.	Les types d'interaction photon-matière et leurs probabilités relatives	12
II.1.2.	Interactions des électrons secondaires avec la matière	18
II.1.3.	Quantification de l'énergie déposée.....	19
II.2.	EFFETS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'IRRADIATION.....	26
II.2.1.	Influence de la radiolyse de l'eau	26
II.2.2.	L'ADN cible critique	27
II.2.3.	Dommages moléculaires.....	28
II.3.	EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IRRADIATION.....	29
II.3.1.	Fidélité et mécanismes de réparation des lésions de l'ADN.....	29
II.3.2.	Les cassures double-brins : dommages critiques ?.....	32
II.3.3.	Létalité des lésions	33
II.3.4.	Survie cellulaire	34
II.4.	EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES TISSUS : APPLICATIONS ET RECHERCHES CLINIQUES	43
II.4.1.	Effets sur les tissus sains	43
II.4.2.	Effets sur les tumeurs.....	44
II.4.3.	Méthodes d'obtention d'un effet différentiel entre les tissus sains et la tumeur.....	47

III.	PROBLEMATIQUE DE LA THESE : OPTIMISER L'INTERACTION PHOTOELECTRIQUE DES RAYONS X SYNCHROTRON AVEC UN ELEMENT LOURD.....	65

III.1.	RENFORCER SÉLECTIVEMENT L'EFFET PHOTOÉLECTRIQUE POUR AUGMENTER LE SIGNAL RADIOLOGIQUE	66
III.1.1.	Seuils d'absorption photoélectrique : première approche.....	66
III.1.2.	Caractérisation des discontinuités des éléments	68
III.1.3.	Pouvoir de pénétration dans les milieux biologiques	75
III.1.4.	Qualité et coût d'une image.....	77

III.1.5.	Comparaison de l'iode et du gadolinium comme agents de contraste.....	82
III.2.	DÉPOSER PLUS D'ÉNERGIE DANS DES TISSUS CHARGÉS EN AGENTS DE CONTRASTE	84
III.2.1.	Coefficient massique d'absorption d'énergie et discontinuités: première approche	84
III.2.2.	Recherche de l'énergie optimale d'irradiation des éléments lourds purs	86
III.2.3.	Capacité des mélanges à augmenter l'énergie déposée	88
III.2.4.	Vers une compréhension plus fine du dépôt d'énergie : parcours des photoélectrons	90
III.3.	CIBLER LE DÉPÔT D'ÉNERGIE SUR L'ADN GRÂCE AUX CASCADES D'ÉLECTRONS AUGER.....	91
III.3.1.	Probabilité de création des lacunes dans les différentes couches et mode de dépôt de l'énergie	91
III.3.2.	Probabilité de désexcitation non-radiative et énergies moyennes libérées après création d'une lacune	94
III.3.3.	Spectres des électrons Auger et vacances électroniques : approche simplifiée.....	97
III.4.	CONSÉQUENCES POUR LE CHOIX DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	100
IV.	MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES	101
IV.1.	LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON	101
IV.1.1.	Généralités	102
IV.1.2.	La ligne médicale ID17.....	106
IV.2.	LES AGENTS PHARMACOLOGIQUES ET COMPOSÉS CHIMIQUES	116
IV.2.1.	Les agents de contraste	116
IV.2.2.	Les vecteurs d'atomes étrangers dans l'ADN	119
IV.2.3.	Bilan	125
IV.3.	TECHNIQUES DE DOSAGE DES ÉLÉMENTS LOURDS.....	126
IV.3.1.	<i>In vivo</i> : Objectifs de la SRCT	126
IV.3.2.	A l'échelle de quelques millions de cellules: ICP-MS.....	134
IV.3.3.	A l'échelle d'une cellule unique : SR-XRF.....	137
IV.4.	DOSIMÉTRIE	143
IV.4.1.	Calibration du faisceau synchrotron avec un détecteur de référence	143
IV.4.2.	Calibration des détecteurs secondaires	146
IV.4.3.	Rendements en profondeur	147
IV.4.4.	Programmation d'une irradiation à visée thérapeutique	151
IV.4.5.	Contrôle des doses effectivement délivrées aux échantillons.....	151
IV.4.6.	Le gel de Fricke.....	153
IV.5.	QUANTIFICATION <i>IN VITRO</i> DES EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RADIOTHÉRAPIE.....	159
IV.5.1.	Lignées cellulaires et conditions de croissance.....	160
IV.5.2.	Survie cellulaire	164
IV.5.3.	Lésions moléculaires et cinétiques de réparation	175
IV.5.4.	Voies de réparation	178

V.	RESULTATS ET DISCUSSION : QUE PEUT APPORTER LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON A LA RADIOTHERAPIE ANTICANCEREUSE ?	183
V.1.	FAISABILITÉ DE LA TOMOGRAPHIE QUANTITATIVE PAR RAYONNEMENT SYNCHROTRON	183
V.1.1.	Évaluation des performances de la méthode sur fantômes.....	184
V.1.2.	Cartographies quantitatives de distribution d'agent de contraste <i>in vivo</i> chez le rat porteur de tumeur	197
V.1.3.	SRCT et imagerie paramétrique tissulaire: première approche.....	207
V.1.4.	La SRCT : un puissant outil au service de la radiothérapie ?	209
V.2.	MESURE DE L'AUGMENTATION DE DÉPÔT D'ÉNERGIE LIÉ À LA PRÉSENCE D'UN AGENT DE CONTRASTE PENDANT UNE IRRADIATION PAR DES RAYONS X MONOCHROMATIQUES	211
V.2.1.	Dopage par des atomes lourds du dosimètre chimique Fricke gélifié.....	211
V.2.2.	Dosimétrie biologique.....	222
V.2.3.	Vers une application thérapeutique ?	229
V.3.	EFFICACITÉ BIOLOGIQUE DE L'INDUCTION PHOTONIQUE EXTERNE DE CASCADES D'ÉLECTRONS AUGER SUR UN HÉTÉROATOME DE L'ADN	231
V.3.1.	Mesure de l'impact sur la survie cellulaire de l'ionisation d'atomes d'iode portés par un nucléoside se substituant à la Thymidine de l'ADN et comparaison avec la présence d'iode extracellulaire	231
V.3.2.	Effets biologiques de l'activation résonante d'atomes de platine incorporés dans l'ADN sous forme de Cisplatine	239
V.3.3.	Vectorisation d'un atome lourd au sein de l'ADN : propriétés et contraintes fondamentales	268
V.4.	SYNTHÈSE DES RÉSULTATS : RÉFLEXION AUTOUR DE L'INTÉRÊT DE L'ÉVÉNEMENT TYPE K EN IMAGERIE ET EN RADIOTHÉRAPIE	269
VI.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	271
VII.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	277

Liste des Publications..... 305

Table des Matières 307

Table des Figures 313

Table des Tableaux 320

Table des abréviations

2D : bi-dimensionnel	k(e)V : kilo (électron-)volt
3D : tri-dimensionnel	LMDS : locally multiple damage sites
³HTdR : thymidine tritiée	M : phase du cycle cellulaire correspondant à la mitose
ADN : acide désoxyribonucléique	M : concentration molaire (mol.l ⁻¹)
ATP : adénosine triphosphate	mA : milli ampère
BHE : barrière hémato-encéphalique	M(e)V : méga (électron-)Volt
BNCT : boron neutron capture therapy	MRT : microbeams radiation therapy
CDA : couche de demi-atténuation	NHEJ : non homologous end-joining
CDB : cassure double-brins	ORL : oto-rhino-laryngologie
CDDP : cis-diamminedichloroplatinum (II)	PAT : thérapie par activation photonique
CHEF : clamped homogeneous electric fields	pb : paire de base
CHU : centre hospitalo-universitaire	PBS : phosphate buffer saline
cpm : coups par minute	pH : potentiel d'hydrogène, coefficient d'acidité ou de basicité d'un milieu
CSB : cassure simple-brin	PLDR : potentially lethal damages repair
CTRx : computed tomography radiotherapy	ppb : partie par milliard
DEA : diplôme d'études approfondies	ppm : partie par million
DEF : dose enhancement factor	ppp : points par pouce
DMEM : dulbecco's modified eagle's minimum medium	PtTC : chloroterpyridine platinum
DMSO : diméthyl-sulfoxyde	OER : oxygen enhancement ratio
DOI : densité optique intégrée	ROI : région d'intérêt
DSC : débit sanguin cérébral	RSB : rapport signal sur bruit
EBR : efficacité biologique relative	RSRM : équipe de recherche « Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale »
EDTA : acide éthylène-diamine-tétracétique	RX : Rayons X
ESRF : european synchrotron radiation facility	S : phase du cycle cellulaire correspondant à la réplication de l'ADN
eV : électron-Volt	SER : sensitization enhancement ratio
FAR : fraction of activity released	SF₂ : fraction d'une population cellulaire survivant à 2 Gy
G0 : phase du cycle cellulaire correspondant à une période de quiescence (hors cycle)	(SR)CT : (synchrotron radiation) computed tomography
G1 : phase du cycle cellulaire précédant la réplication de l'ADN	SR-XRF : synchrotron radiation induced X-ray fluorescence
G2 : phase du cycle cellulaire suivant la réplication de l'ADN et précédant la mitose	SVF : sérum de veau fœtal
Gy : gray	TDM : tomodensitométrie
HES : Hematoxyline eosine safran	TBE : tampon Tris + acide borique + EDTA
ICP-MS : induced coupled plasma-mass spectrometer	TE8 : tampon Tris + EDTA pH 8
IRM : imagerie par résonance magnétique	TEL : transfert d'énergie linéique
IUdR : iodo-désoxyuridine	TEP : tomographie par émission de positrons
kpb : kilo paires de bases	VSC : volume sanguin cérébral
	Z : numéro atomique d'un élément

Avant Propos

« Comme ces jours-là le soleil ne s'est montré que d'une manière intermittente, j'avais conservé les expériences toutes préparées et rentré les châssis à l'obscurité dans le tiroir d'un meuble, en laissant en place les lamelles du sel d'Uranium. Le soleil ne s'étant pas montré de nouveau les jours suivants, j'ai développé les plaques photographiques le 1^{er} mars, en m'attendant à trouver des images très faibles. Les silhouettes apparurent, au contraire, avec une grande intensité... ». Henri Becquerel¹, 2 mars 1896

Pourquoi Henri Becquerel a-t-il eu l'idée de développer ses plaques photographiques ce jour-là, alors qu'il savait pertinemment que l'effet qu'il cherchait à mettre en évidence ne serait pas perceptible, du fait de l'absence de soleil ? Goût du détail ? Inspiration géniale ? Nul ne le sait, mais à présent tout le monde s'accorde à penser que c'est précisément ce geste qui a différencié ce scientifique des autres. Il y avait beaucoup de rigueur dans sa démarche, un esprit toujours en éveil et il a préféré vérifier que les plaques photographiques n'étaient pas impressionnées plutôt que de s'en débarrasser sans même les développer. Et la radioactivité naturelle fut découverte à travers ce geste demeuré symbolique et cette photographie dite de la croix de Malte, impressionnée dans l'obscurité par les rayonnements uraniques...

On ne trouve pas toujours ce que l'on cherche.

On trouve souvent ce que l'on ne cherche pas.

Cette proposition et son corollaire rythment doucement le monde de la Recherche et les plus grandes découvertes proviennent parfois des plus grands concours de circonstances.

Plus de cent ans après, rien n'a changé. Les technologies sont certes plus sophistiquées et les esprits sont imprégnés de notions beaucoup plus abstraites dès le plus jeune âge. Mais le hasard apporte toujours son petit grain de sel et la Science progresse ainsi, lentement, en obéissant aux aléas du destin.

Ainsi cette thèse n'est pas du tout celle qu'elle aurait dû être au départ. Je n'aurais pu imaginer il y a 4 ans qu'elle finirait par des expériences complexes de radiobiologie moléculaire, explorant les mécanismes les plus intimes des cellules vivantes, afin de découvrir et localiser les gènes impliqués dans les systèmes de réparation de l'ADN.

¹ *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, « Sur les radiations émises par phosphorescence »*

Mais le hasard a voulu cela. Il a mis sur ma route des personnes tellement passionnées par leur science, qu'elles ont su me la communiquer. Il a également souhaité nous refuser obstinément les résultats que nous cherchions, pour nous faire découvrir autre chose, de complètement différent.

J'imagine que de l'extérieur ce document va sembler quelque peu disparate, essayant de mettre bout à bout des notions très théoriques de physique avec des techniques expérimentales très pointues de biologie. Je vous avouerais très sincèrement que j'aurais préféré écrire une thèse de physique théorique, dans laquelle j'aurais pu pendant 100 pages expliquer pourquoi mes simulations trouvent à un millionième près ce que celles des autres ont trouvé. Je suis certaine que cela m'aurait plu. Mais « ma thèse », cette chose mythique derrière laquelle je cours depuis des années a été complètement différente. Elle est le fruit d'un travail réalisé à l'interface « physique-biologie-médecine », et comme pour toute approche multidisciplinaire, aucun des domaines précédemment cités n'a été abordé dans toute sa complexité. C'est frustrant et merveilleux à la fois.

Le résultat est ce document certainement trop volumineux.

J'ai voulu expliquer, montrer, partager tout ce que j'ai appris et tout ce que j'ai cru comprendre.

Que ce soit pour le chapitre consacré aux matériels et méthodes comme pour celui des résultats et leur discussion, je me suis longuement demandée dans quel ordre présenter les choses. Devant la diversité des sujets abordés et des outils employés, l'ordre chronologique, qui est d'ordinaire le plus honnête, aurait été source de confusion pour le lecteur. J'ai donc choisi d'aborder les thèmes selon la logique suivante : du plus gros au plus petit ou encore de l'approche des phénomènes la plus grossière, à la plus fine. Des incohérences apparaîtront, forcément.

J'espère que malgré tout, la lecture de ce manuscrit en demeurera aisée et, si possible, agréable.

I. INTRODUCTION

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet « IRM fonctionnelle et neuroimagerie : développements méthodologiques et applications en neurosciences » soutenu par la région Rhône-Alpes, dans la thématique « Neurosciences ». Plusieurs partenaires sont associés dans le cadre de ce projet : l'Unité d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) du CHU de Grenoble ; l'équipe d'accueil n° 2941 « Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale » de l'Université Joseph Fourier de Grenoble ; l'ESRF, installation européenne de rayonnement synchrotron de Grenoble et l'industriel Philips Medical Systems Nederland. L'objectif visé à long terme par ce projet est le développement sur la ligne médicale de l'ESRF d'un système de radiothérapie original. Ce système utiliserait le rayonnement X synchrotron pour engendrer des interactions photoélectriques ciblées sur un agent pharmacologique préalablement introduit dans le proche voisinage des cellules tumorales. Le projet comporte plusieurs volets : le premier consiste à développer un tomographe capable de mesurer *in vivo* chez l'homme les concentrations d'agent de contraste présentes dans les structures cérébrales pathologiques, ainsi caractérisées sur le plan morphologique et fonctionnel. Cette quantification est en effet essentielle pour les calculs dosimétriques du traitement associé de radiothérapie. Le second volet de notre étude porte sur les diverses

optimisations du traitement de radiothérapie proposé. L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer les performances d'un tel outil, de développer les méthodes pour l'utiliser comme un système d'irradiation pour la radiothérapie anticancéreuse et de préciser les projets de recherche clinique qui pourraient être entrepris.

I.1. LES OUTILS ACTUELS DU RADIODIAGNOSTIC ET DE LA RADIOTHERAPIE

L'imagerie médicale, en particulier grâce au développement de l'informatique, a considérablement progressé ces vingt dernières années. La tomodensitométrie conventionnelle par rayons X (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) couplées à l'injection d'un agent de contraste (respectivement l'iode et le gadolinium) ont révolutionné le diagnostic des tumeurs cérébrales. Néanmoins, de grands progrès dans la caractérisation des tumeurs restent nécessaires au-delà de l'imagerie du diagnostic initial. Par exemple, en ce qui concerne la biopsie son caractère très ponctuel ne permet pas d'échantillonner l'ensemble de la tumeur, en tenant compte de son hétérogénéité. L'appréciation du grade tumoral à partir de l'échantillon prélevé peut donc être erronée, notamment si la ponction a eu lieu dans une zone de meilleure différenciation.

Actuellement, de nombreuses équipes concentrent leurs efforts pour étendre les performances de ces techniques au-delà de l'information anatomique, et accéder à des informations fonctionnelles telles le volume sanguin cérébral (VSC) ou encore le débit sanguin cérébral (DSC) [Evan88]. En effet, dans le cas des tumeurs cérébrales ces données permettraient de caractériser les phénomènes de rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la perméabilité endothéliale et l'angiogenèse tumorale. Accéder à la perfusion cérébrale, c'est à dire à la distribution du sang dans un volume de tissu, à travers la mesure de la concentration en agent de contraste, devrait permettre d'accéder au grade tumoral, de guider les orientations thérapeutiques et de prédire l'évolution de la tumeur [Folk95, Sage94]. Il a été démontré, par exemple pour les gliomes cérébraux, que l'importance de l'angiogenèse est directement reliée à l'agressivité de la tumeur et à la brièveté de la survie du patient.

Parmi les méthodes d'investigation fonctionnelle, la tomographie par émission de positrons (TEP) a été la méthode la plus largement utilisée malgré une faible résolution spatiale et temporelle [Evan88]. L'IRM s'annonce depuis quelques années déjà comme une technique prometteuse pour caractériser de tels phénomènes, à travers l'étude des effets des agents de contraste sur la susceptibilité magnétique ou la mesure des temps de relaxation (méthode T_2^* ou T_1). Malgré tout, la quantification du signal reste difficile car les effets

observés (variation des temps de relaxation) sont reliés de façon indirecte à la concentration en agent de contraste. Les résultats obtenus sont par conséquent relatifs.

Malgré une excellente résolution spatiale et temporelle, la TDM a connu peu de développements dans le domaine de l'imagerie fonctionnelle (par exemple Xénon-CT pour mesurer le DSC) [Namb95]. Les limites du scanner conventionnel dans la mesure des coefficients d'atténuation des tissus sont bien connues et dépendent notamment des caractéristiques des tubes à rayons X: taille de la source, variation de son intensité, flux limité et largeur spectrale notable, responsable du durcissement du faisceau. Cela conduit à des changements dans le spectre de rayons X au moment de sa traversée du patient et à la prise en compte de rayonnement diffusé au niveau du détecteur. Le scanner conventionnel reste néanmoins la seule technique qui permette des mesures précises de l'absorptiométrie tissulaire, exprimée avec la même échelle sur toutes les machines (échelle de Hounsfield) et qui fournisse un accès direct à des informations fonctionnelles quantitatives. Ceci justifie le développement de telles techniques avec de nouvelles sources de rayons X. L'idée d'appliquer la source de rayons X d'un faisceau synchrotron aux techniques d'imagerie tomographique n'est pas récente [Dilm91, Dilm97, Nach92, Th84]. Mais l'installation européenne de rayonnement synchrotron (ESRF, Grenoble) présente la particularité d'avoir dédié une de ses lignes de lumière (ID17) aux applications médicales *in vivo* du rayonnement synchrotron [Char96, Elle97, Elle99b, LeBa85, Moul93].

Quelles que soient leurs modalités d'acquisition, les images diagnostiques et fonctionnelles sont aujourd'hui l'information de base nécessaire à toute irradiation à visée thérapeutique. L'objectif de toute radiothérapie est simple : traiter les cellules tumorales en épargnant au maximum les tissus fonctionnels sains avoisinants. La connaissance du volume cible tridimensionnel est donc nécessaire, et elle dépend étroitement des examens réalisés auparavant : biopsie, scanner, IRM, TEP... La tendance actuelle est d'essayer d'utiliser l'ensemble des images disponibles pour délimiter au mieux les volumes à irradier. L'imagerie multimodale se confronte néanmoins à des problèmes de différences de positionnement du patient entre les différents lieux d'examens, perturbant le recalage précis des images [Vassa98]. La parfaite connaissance du volume tumoral à irradier s'accompagne d'une recherche de la plus parfaite adéquation possible entre le volume cible prévisionnel et le volume tumoral à traiter. La définition des champs d'irradiation se complexifie en clinique, avec par exemple la radiothérapie par modulation d'intensité, où la distribution spatiale des doses d'irradiation est modulée pendant le traitement pour se conformer au plus près à l'anatomie du volume tumoral. Cette technique permet d'augmenter les doses prescrites sans

toxicité ajoutée, car la proportion de tissus sains épargnée est de plus en plus importante. Le contrôle des volumes irradiés en temps réel devient un atout majeur de ce type de traitement pour garantir sa fiabilité. Les énergies utilisées pour traiter les cancers (supérieures au mégavolt) ne sont pas compatibles avec une imagerie de bonne qualité, accessible uniquement aux basses et moyennes énergies de rayons X (entre 30 et 300 keV), pour lesquelles l'effet photoélectrique largement dominant entraîne une dépendance de l'atténuation des rayons X avec la composition des différents matériaux traversés. Ainsi les images portales sont d'une qualité relativement médiocre. Des systèmes complexes associant un tube à rayons X avec un accélérateur linéaire d'électrons pour le traitement sont étudiés par les constructeurs pour tenter de pallier à cette limitation.

L'efficacité des traitements par radiothérapie anticancéreuse est aujourd'hui encore limitée par la tolérance des tissus sains et leur plus grande cause d'échec est la rechute de l'évolution tumorale. Depuis toujours, la radiothérapie a entretenu de nombreux axes de recherche pour augmenter préférentiellement dans les tumeurs les dommages létaux. Le plus ancien est sans conteste le fractionnement de la radiothérapie en petites séances quotidiennes étalées sur plusieurs semaines. D'autres alternatives sont recherchées, comme de rapprocher les sources de rayonnement des tumeurs ou de rendre celles-ci plus sensibles à leur action. Peu de techniques proposent de cibler l'effet léthal des rayons X *via* une interaction physique sur un composé présent uniquement dans la tumeur. Ainsi pour des rayons X de basses énergies telles que celles disponibles en rayonnement synchrotron, un renforcement des probabilités d'interaction par effet photoélectrique doit pouvoir être envisageable du fait de la très forte dépendance des sections efficaces d'interaction avec le numéro atomique de l'élément traversé. Que peut apporter le rayonnement synchrotron à ce concept thérapeutique ?

I.2. APPORTS POTENTIELS DU RAYONNEMENT SYNCHROTRON AU DOMAINE MEDICAL

Les rayons X actuellement utilisés pour l'imagerie médicale et la radiothérapie sont à spectres continus, et d'énergies respectivement comprises entre 100-250 keV et 5-25 MeV. Comparativement, le rayonnement synchrotron produit à l'ESRF, obtenu par freinage d'électrons relativistes, est un faisceau de rayons X d'énergie plus faible (10 à 100 keV). En revanche, il est très faiblement divergent et son très haut flux photonique (6 ordres de grandeur de plus par rapport à une source d'imagerie conventionnelle) permet l'utilisation de

monochromateurs, donnant la possibilité de choisir une énergie donnée avec une très grande précision.

Ces propriétés particulières du rayonnement synchrotron sont exploitables en **imagerie** et en **thérapie** car elles permettent de choisir très sélectivement le type d'interaction physique se reproduisant entre le rayonnement incident et des éléments lourds spécialement introduits dans l'organisme, tels que des agents de contraste radiologique (Iode, Gadolinium) ou des médicaments anticancéreux (IUdR, sels de platine). Ainsi l'acquisition de deux images réalisées de part et d'autre du seuil d'absorption K d'un agent de contraste permet d'obtenir une image résolue en concentration de la répartition de ce produit. Selon ce principe, la faisabilité de coronarographies de surveillance par injection intraveineuse a déjà été démontrée. L'ESRF est le troisième site mondial à mettre en œuvre ce type d'imagerie. Les premiers protocoles de recherche clinique impliquant des patients ont débuté en janvier 2000 à Grenoble et ont montré une qualité d'image qui permet d'établir un diagnostic clinique fiable, mais de façon beaucoup moins invasive que la coronarographie conventionnelle. En ce qui concerne le projet de tomодensitométrie cérébrale, dans lequel nous sommes directement impliqués, les études précliniques démontrent la faisabilité d'une nouvelle technique d'imagerie : la tomographie par rayonnement synchrotron monochromatique (SRCT).

Les applications thérapeutiques du rayonnement synchrotron doivent encore être étudiées avant d'envisager des études cliniques. La possibilité de traiter des tumeurs malignes, notamment cérébrales, par « photon activation therapy » a déjà été largement évoquée dans la littérature [Fair82, Fair87a, Jöns96, Last93, Shin84, Usam91]. Notre projet repose en partie sur l'incorporation d'atomes cibles lourds au voisinage immédiat des cellules tumorales voire à l'intérieur de celles-ci dans la cible-même de l'irradiation qu'est leur ADN. Les atomes lourds, ionisés après absorption photoélectrique des photons incidents, d'énergie optimale, se désexcitent en réorganisant leur cortège électronique. Il en résulte l'émission de photons de fluorescence et la génération de cascades d'électrons Auger, fortement toxiques si elles se produisent au niveau de l'ADN des cellules tumorales [O'Do96a, O'Do96b, Whel94]. Le rayonnement synchrotron de l'ESRF est l'outil idéal pour provoquer ces cascades Auger et générer ainsi de très forts dépôts d'énergie à proximité des atomes lourds activés. La situation de tels atomes dans la structure même de l'ADN (substitution de bases par l'IUdR ou adduits par les sels de platine) permet d'envisager leur utilisation pour augmenter l'efficacité radiobiologique de traitements à faible profondeur, comme les tumeurs cérébrales. En effet, le déclenchement de ce phénomène devrait permettre une forte augmentation de l'effet différentiel entre l'énergie déposée dans la lésion par rapport aux tissus sains.

Par ailleurs, la présence d'atomes lourds (iode, gadolinium) dans le réseau microvasculaire tumoral modifie profondément les distributions des doses de rayonnement X incident absorbées dans le milieu. En effet, les interactions entre la matière et des RX, d'énergies comparables à celles utilisées en imagerie, sont d'autant plus importantes que le matériel traversé possède un numéro atomique élevé. Il a été montré que cet accroissement de dose, provoqué par la présence de l'agent de contraste, permet d'envisager l'utilisation d'un faisceau de RX de "basses énergies" non plus uniquement comme moyen d'imager les tumeurs, mais également de les traiter. Un tel système de *tomothérapie* est en cours de validation sur l'homme, avec un scanner conventionnel modifié, dans le cadre d'un essai clinique de phase I à Los Alamos (Californie) [Mesa99, Rose99]. L'utilisation d'un faisceau synchrotron monochromatique plutôt qu'un spectre continu de rayons X issus d'un scanner conventionnel devrait théoriquement conduire à des distributions de dose plus efficaces et mérite donc également d'être étudiée. La nécessité de connaître, en temps réel et de manière quantitative, la répartition du produit de contraste au sein de la tumeur pour planifier précisément le traitement fait de ce projet une application directe de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron.

I.3. GENESE D'UN DOMAINE DE RECHERCHE EN IMAGERIE ET EN THERAPIE

Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été les suivants:

- i) réaliser *in vivo* des cartographies quantitatives et dynamiques de la concentration intra-tumorale d'agents de contraste, tels que l'iode ou le gadolinium. Cette étude méthodologique a porté sur un modèle expérimental de gliome chez le rat.
- ii) étudier les conséquences biologiques de la présence, pendant l'irradiation, d'agents pharmacologiques à fort pouvoir d'action renforçateur de l'effet photoélectrique. La question à laquelle nous avons tenté de répondre au moyen d'un modèle de cellules tumorales, est de savoir s'il est effectivement possible d'augmenter significativement l'efficacité des rayons X synchrotron grâce à l'application d'agents tels que les produits de contraste usuellement utilisés en imagerie diagnostique ou d'agents capables d'accéder au proche voisinage de l'ADN des cellules. Ceci afin d'exploiter plus spécifiquement les caractéristiques dosimétriques de l'effet photoélectrique d'une part, et du cas particulier des cascades d'électrons Auger, d'autre part.

Ces deux approches expérimentales ont pour but commun de déterminer si le rayonnement synchrotron peut devenir un puissant outil thérapeutique.

Notre mémoire de thèse est structuré en quatre principaux chapitres, numérotés de II à V. Dans le premier nous rappelons les mécanismes d'action des radiations ionisantes et leurs conséquences sur la matière vivante. Les phénomènes physiques, chimiques et biologiques conduisant de l'atténuation du faisceau primaire aux dépôts d'énergie critiques pour les tumeurs y sont évoqués.

Le chapitre III se propose de fournir le contexte théorique justifiant en partie le choix des paramètres expérimentaux de notre étude.

Au cours chapitre IV nous décrivons le matériel étudié et les méthodes expérimentales tant physiques que biologiques associées à l'analyse des résultats expérimentaux.

Le chapitre V rassemble l'ensemble des résultats que nous avons obtenus et leur discussion. Nous y abordons tout d'abord la démonstration de la faisabilité de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron sur fantômes puis *in vivo* sur modèle animal. Puis nous présentons les résultats des mesures physiques et biologiques réalisées pour quantifier en fonction de l'énergie des rayons X le gain de dépôt d'énergie lié à la présence d'un agent de contraste pendant l'irradiation. Enfin nous consacrons la dernière partie de ce chapitre à une approche plus fine du phénomène : celle-ci se propose d'optimiser la biologie du problème précédant en ciblant directement les dépôts d'énergie sur l'ADN des cellules pour y concentrer la densité d'événements létaux. Les discussions associées portent sur l'intérêt de ces différentes approches confrontées à la réalité clinique.

II. MECANISMES D'ACTION DES RADIATIONS IONISANTES: DE L'ÉVÉNEMENT PHYSIQUE INITIAL AUX APPLICATIONS ET RECHERCHES CLINIQUES

Ce chapitre se propose de rassembler les concepts communément admis en radiobiologie pour décrire et exploiter dans une perspective clinique les effets du passage des rayonnements ionisants dans la matière biologique. Quatre étapes fondamentales sont généralement admises : l'étape physique, physico-chimique, biologique et tissulaire. Elles font intervenir respectivement le processus physique initial, la chimie radicalaire, la biologie de l'ADN et ses mécanismes de réparation et enfin les mécanismes de l'homéostasie tissulaire. Si le dépôt primaire d'énergie entraîne des ionisations et des excitations des molécules du milieu jusqu'à des temps de l'ordre de 10^{-15} seconde, l'effet de l'exposition à des radiations ionisantes peut apparaître bien des années après, par exemple sous forme de complications tardives (Figure II-1). Par quels mécanismes ?

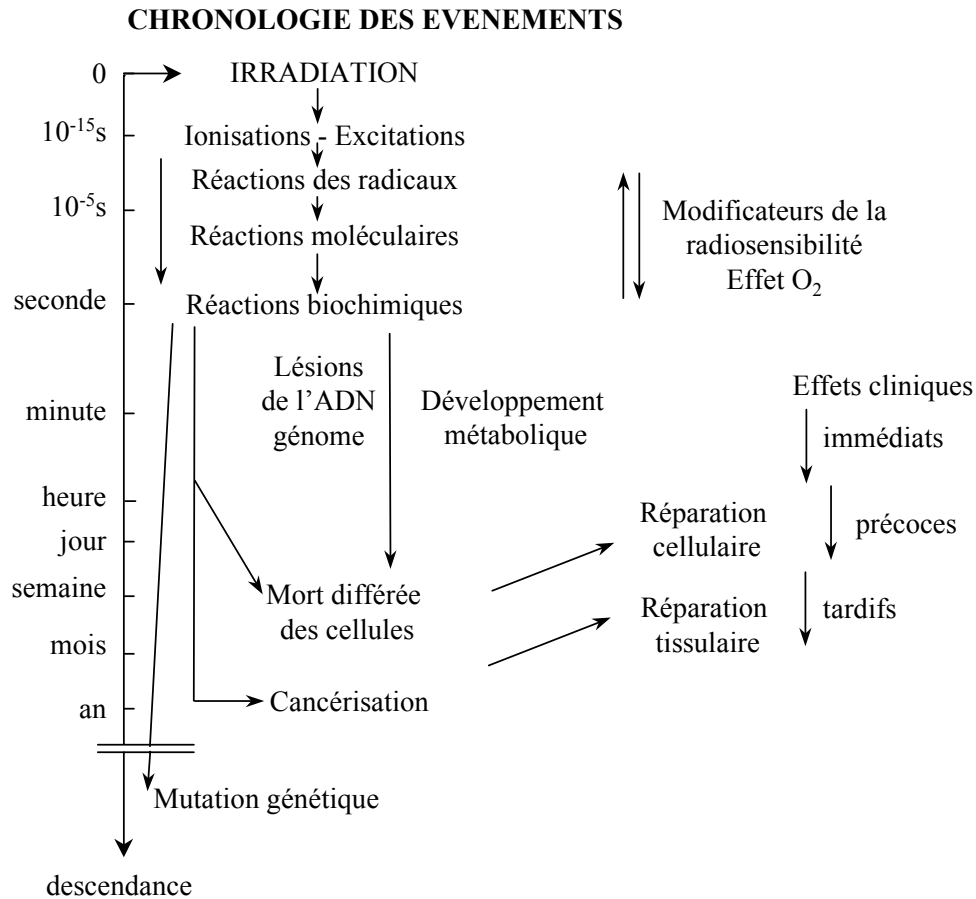


Figure II-1: Échelle des temps en radiobiologie (d'après [Tubi63])

II.1. EFFETS PHYSIQUES INITIAUX DE L'IRRADIATION

Un rayonnement est dit ionisant s'il transporte une énergie suffisante pour ioniser une molécule organique. Cette énergie minimum est d'en moyenne 33 eV. Lors de leur passage à travers la matière, les rayonnements ionisants sont donc par définition capables de perdre leur énergie en provoquant des ionisations. Les processus impliqués dépendent de leur nature (photon, électrons, ion), de leur énergie et de la composition du milieu traversé.

II.1.1. Les types d'interaction photon-matière et leurs probabilités relatives

Nous développerons essentiellement dans cette partie les quatre types d'interaction les plus probables dans la gamme d'énergie couramment utilisée en médecine (de quelques keV à 25 MeV).

II.1.1.1. La diffusion cohérente: effet Rayleigh

Toute l'énergie du photon incident peut être diffusée sans qu'aucune particule ne soit mise en mouvement dans le milieu traversé. La probabilité de cet effet, appelé effet Rayleigh, diminue rapidement lorsque l'énergie du photon augmente jusqu'à devenir négligeable dans les matériaux légers pour des énergies de l'ordre de 100 keV. D'une manière plus générale la probabilité de cet effet varie sensiblement avec Z^2 . Puisque la diffusion des photons se produit principalement vers l'avant, celle-ci a pour effet principal d'augmenter la largeur angulaire du faisceau incident. Si l'intérêt de cette diffusion pour les applications médicales est d'ordinaire limité, elle peut néanmoins être en soi la base d'un principe d'imagerie original [Duva98].

II.1.1.2. La diffusion incohérente : effet Compton

Il s'agit ici d'un mode d'interaction pour lequel le photon incident perd une partie de son énergie pour mettre en mouvement un électron peu lié d'un atome constituant le matériau traversé. Le photon incident est finalement dévié de sa trajectoire initiale, dans une direction de l'espace dépendant de son énergie. L'électron est quant à lui émis sans le demi-espace situé au-delà du point d'impact. Pendant une collision Compton, une petite partie de l'énergie $h\nu_0$ du photon incident est absorbée par le milieu (énergie de liaison de l'électron) et l'énergie restante est emportée par les particules diffusées. La proportion de l'énergie E emportée par l'électron Compton est d'autant plus grande que l'énergie du photon incident est élevée. Avec celle du photon diffusé $h\nu'$, elles obéissent aux relations suivantes :

$$(Eq. II-1) : \quad E = h\nu_0 \frac{\frac{h\nu_0}{m_0 c^2} (1 - \cos\theta)}{1 + \frac{h\nu_0}{m_0 c^2} (1 - \cos\theta)} \quad \text{et} \quad h\nu' = \frac{h\nu_0}{1 + \frac{h\nu_0}{m_0 c^2} (1 - \cos\theta)}$$

où θ est l'angle de déviation des photons diffusés par rapport à la direction du faisceau incident.

Cet effet est prépondérant dans les matériaux dits légers, équivalents-eau (Z faible). Il domine également les processus d'interaction des photons d'énergie comprise entre 0.2 et quelques MeV, quelque soit le numéro atomique du matériau traversé. La probabilité d'apparition de cette diffusion diminue lorsque l'énergie du photon augmente et elle varie peu avec le Z de l'absorbant. La formule de Klein et de Nishina donne la section efficace différentielle (par unité d'angle solide) d'interaction Compton [John53].

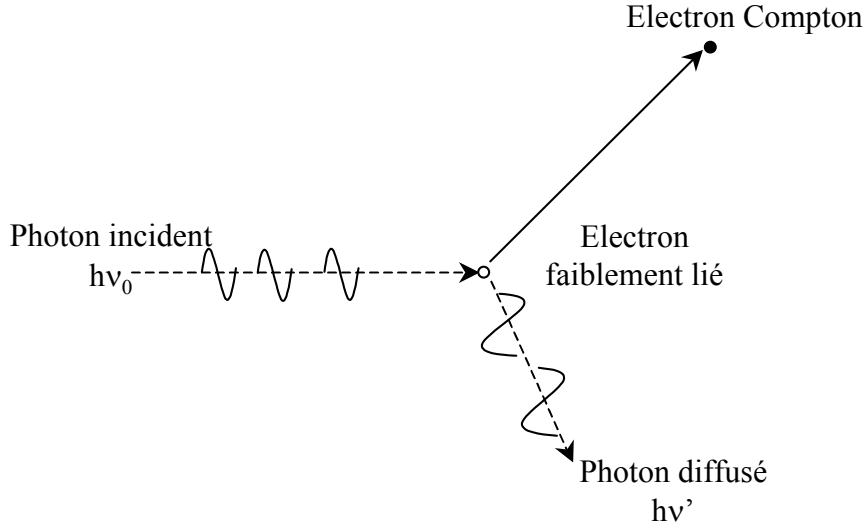


Figure II-2 : Effet Compton

II.1.1.3. L'effet photoélectrique

Cet effet concerne l'interaction entre un photon et un électron fortement lié dans l'atome cible. Contrairement aux deux cas précédents, le photon est totalement absorbé par l'atome dans sa globalité qui expulse alors un de ses électrons des couches K, L, M ou N. Le photo-électron est éjecté de son orbitale avec une énergie cinétique initiale égale à :

$$(Eq. II-2) \quad T_{e^-} = h\nu_0 - E_s$$

où $h\nu_0$ est l'énergie du photon incident et E_s correspond à l'énergie de liaison de l'électron à l'atome pour la sous-couche S.

L'atome excité retourne dans son état fondamental par des processus radiatifs ou non.

Le mode radiatif correspond à l'émission d'un rayonnement de fluorescence, dont le spectre de raies discontinu est caractéristique du matériau. Pour une vacance créée dans la sous-couche S, on définit le rendement de fluorescence par :

$$(Eq. II-3) \quad f_{rad}(s) = \sum_x f_{rad}(s, x) = \frac{\Gamma_{rad}(s)}{\Gamma_{tot}(s)} = \frac{\sum_x \Gamma_{rad}(s, x)}{\Gamma_{tot}(s)}$$

où $f_{rad}(s, x)$ représente la probabilité que la vacance de la sous-couche S migre dans la sous-couche X avec émission du photon de fluorescence correspondant ; $\Gamma_{rad}(s)$ est la largeur de raie du comblement par voie radiative de la vacance électronique en S ; $\Gamma_{rad}(s, x)$ correspond à la largeur de raie partielle d'une transition radiative entre les sous-couches S et X ; et $\Gamma_{tot}(s)$ est la largeur de raie totale de la lacune en S. Nous rappelons ici que la quatrième relation

d'incertitude d'Heisenberg confère une durée de vie finie τ à tout état excité dont la largeur de raie spectrale Γ est définie par la relation suivante:

$$(Eq. II-4) \quad \Gamma = \frac{\hbar}{\tau}$$

avec $\hbar = h/2\pi$ et h =constante de Planck= $6.62 \cdot 10^{-34}$ J.s.

Le mode de désexcitation non radiatif ou électronique est également connu sous le nom de cascade ou d'effet Auger, en mémoire à Pierre Auger qui découvrit en 1925 que des atomes exposés à des rayons X deviennent producteurs de multiples émissions électroniques, suite à des transitions au niveau des couches internes [Auge25]. Lorsque la vacance électronique créée dans la sous-couche S est comblée par un électron moins lié provenant de la sous-couche X, l'excédant d'énergie n'est pas libéré sous forme photonique mais provoque l'éjection d'un autre électron de la sous couche Y. Cet électron sera noté e^-_{sxy} . Si S et X appartiennent à des couches électroniques différentes alors cet électron sera appelé électron Auger (par exemple e^-_{KL1L2}). Si par contre S et X appartiennent à la même couche électronique, cet électron sera un électron Coster-Krönig (par exemple e^-_{L1L2M5}) voire Super Coster-Krönig si Y appartient également à cette même couche (par exemple e^-_{M1M2M5}). Il est intéressant de noter que, de par la structure électronique des orbitales K, une vacance en couche K ne peut générer, en premier lieu, que des électrons Auger. Par abus de langage, l'effet 'Auger' regroupe néanmoins l'ensemble des électrons Auger et Coster-Krönig.

La désexcitation non radiative est prépondérante dans le cas d'atomes cibles légers (C, N, O) qui subissent principalement des photoionisations en couche K et deviennent donc émetteurs d'électrons Auger. Puisqu'une vacance électronique initialement produite par le photon incident conduit à deux nouvelles vacances électroniques qui à leur tour peuvent en produire autant, toute une cascade électronique peut être produite selon des probabilités tabulées. L'atome est finalement laissé dans un état de multiples ionisations.

Après création d'une vacance électronique dans la sous-couche, le rendement de désexcitation par voies non radiatives $f_{non-rad}(s)$ compense directement le rendement de fluorescence :

$$(Eq. II-5) \quad f_{rad}(s) + f_{non-rad}(s) = 1$$

Il regroupe la somme des transitions élémentaires pouvant intervenir :

$$(Eq. II-6) \quad f_{non-rad}(s) = \sum_{x,y} f_{non-rad}(s, x, y) = \frac{\Gamma_{non-rad}(s)}{\Gamma_{tot}(s)} = \frac{\sum_{x,y} \Gamma_{non-rad}(s, x, y)}{\Gamma_{tot}(s)}$$

où $f_{\text{non-rad}}(s,x,y)$ représente la probabilité que la vacance de la sous-couche S migre dans la sous-couche X en provoquant l'éjection d'un électron de la sous-couche Y ; $\Gamma_{\text{non-rad}}(s)$ est la largeur de raie du comblement par voie non radiative de la vacance électronique en S ; $\Gamma_{\text{non-rad}}(s,x,y)$ correspond à la largeur de raie partielle d'une transition non radiative entre la sous-couche S, comblée par un électron X et expulsant un électron Y hors du cortège électronique; et $\Gamma_{\text{tot}}(s)$ est la largeur de raie totale de la lacune en S.

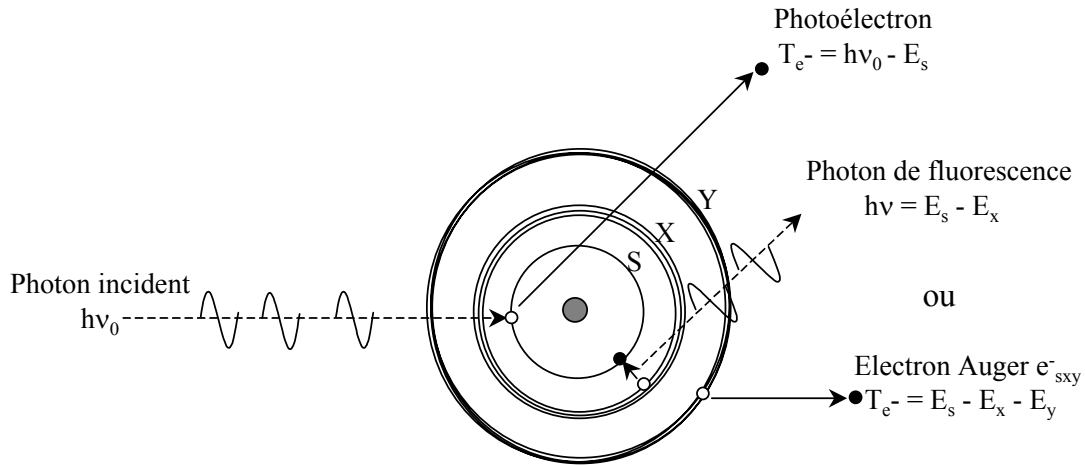


Figure II-3 : Interaction d'un photon avec un atome par effet photoélectrique. Réarrangement du cortège électronique par fluorescence ou effet Auger

L'effet photoélectrique est prédominant à basse énergie (< 100 keV) et dans des matériaux à numéro atomique élevé (proportionnalité en Z^4). L'effet Auger est quant à lui prédominant dans les matériaux légers ($Z < 20$) ou pour des ionisations en couche L. Dans les matériaux lourds ($Z > 50$) et pour des lacunes en couche K, la fluorescence est le mode majoritaire de désexcitation.

II.1.1.4. La production de paire : effet de matérialisation

Lorsqu'un photon d'énergie $h\nu_0$ passe dans le champ d'une particule chargée et notamment dans celui d'un noyau atomique, il peut totalement disparaître et donner naissance à un couple électron / positron. Pour que cette matérialisation soit possible, il faut que $h\nu_0$ soit supérieure ou égale à 1.02 MeV, énergie correspondant à deux fois l'énergie au repos d'un électron. L'excédant d'énergie est emporté sous forme d'énergie cinétique par les anti-particules. Le positron s'annihile avec un électron du milieu en donnant naissance à deux photons d'énergie 511 keV, émis à 180° l'un de l'autre.

La section efficace d'interaction par production de paire est proportionnelle à Z^2 mais seulement pour des photons d'énergie supérieure ou égale à 1.02 MeV. Une application directe

de cet effet est la tomographie par émission de positrons (TEP) qui repose sur la détection en coïncidence des photons d'annihilation. Cette technique permet notamment des études métaboliques du cerveau.

La production de paire peut également se produire dans le champ coulombien électronique. Le seuil est cette fois-ci égal à quatre fois l'énergie au repos d'un électron. Le processus est sensiblement le même que pour la production de paire, à l'exception que l'électron original demeure et conduit donc à la formation d'un triplet. Ce phénomène étant beaucoup plus rare que le précédant, il y est généralement assimilé.

II.1.1.5. Domaines de prédominance des différents effets

L'importance relative des trois principaux effets dominants dans la gamme d'énergie comprise entre 10 keV et 10 MeV est schématisée sur la Figure II-4. Largement minoritaire, la diffusion Rayleigh n'y apparaît pas. L'effet Compton est systématiquement le mode principal d'interaction pour des photons d'énergies comprises entre 1 et 5 MeV. Pour des énergies plus basses, l'effet Compton prédomine seulement pour les matériaux légers (tissus biologiques), laissant la place à l'effet photoélectrique pour les matériaux plus lourds.

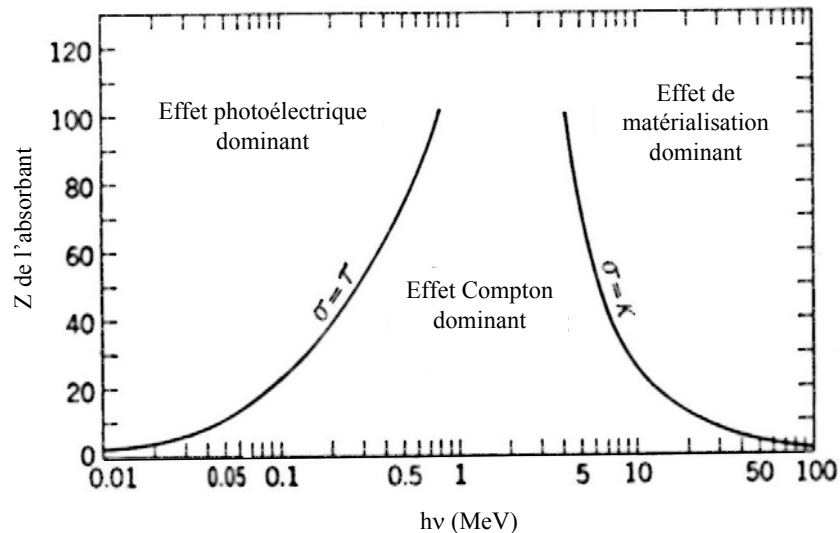


Figure II-4 : Zones de prédominance des différents types d'interaction photon matière en fonction de l'énergie du photon et du numéro atomique du matériau traversé. Les lignes d'isoprobabilités d'apparition des effets sont représentées (d'après [Eva85])

II.1.2. Interactions des électrons secondaires avec la matière

Les électrons mis en mouvement par les photons perdent progressivement leur énergie cinétique dans la matière. Les modes d'interactions des électrons avec la matière sont d'origine Coulombienne.

II.1.2.1. Diffusion élastique

Les électrons peuvent interagir par chocs atomiques élastiques contre des structures atomiques de masses beaucoup plus grandes que la leur, ils sont alors fortement déviés. Il en résulte une trajectoire qui est une suite de tronçons avec des angles de diffusion qui peuvent devenir très importants surtout pour les faibles énergies (quelques centaines d'eV). Le modèle des micro-dépôts d'énergie, introduit par Goodhead et souvent évoqué en radiobiologie, correspond à une prédominance de ce phénomène de diffusion élastique qui, même s'il n'intervient pas directement dans le dépôt d'énergie, en détermine néanmoins sa structure spatiale très localisée. Pour les plus fortes énergies électroniques, les processus inélastiques redonnent une structure de trace au dépôt d'énergie.

II.1.2.2. Perte d'énergie par voie collisionnelle

Une collision est une interaction électron-électron. A chaque choc l'électron cède une partie de son énergie cinétique à la matière. La section efficace de perte d'énergie par choc inélastique est proportionnelle au numéro atomique du matériau traversé.

II.1.2.3. Perte d'énergie par voie radiative

La probabilité de perte d'énergie d'une particule chargée par voie radiative est inversement proportionnelle au carré de la masse m de la particule. La masse de l'électron étant faible, il peut interagir avec le champ électrique des noyaux et être si rapidement décéléré qu'une partie de son énergie s'évacue sous forme de rayonnement de freinage (Bremsstrahlung). Ceci est d'autant plus vrai que le milieu traversé possède un numéro atomique élevé (proportionnalité de l'ordre du Z^2).

II.1.2.4. Pouvoir d'arrêt, parcours, transfert d'énergie linéique (TEL)

Si dE est la quantité d'énergie perdue par un électron en traversant l'épaisseur dx de matériau de densité ρ [g.cm^{-3}], le pouvoir d'arrêt massique total S_{tot} est défini par :

$$(Eq. II-7) \quad S_{tot} = S_{coll} + S_{rad} = \frac{1}{\rho} \left[\left(\frac{dE}{dx} \right)_{coll} + \left(\frac{dE}{dx} \right)_{rad} \right]$$

où S_{coll} et S_{rad} sont les pouvoirs d'arrêt massique par collisions et freinage [MeV.cm²/g]. Le rapport dE/dx est appelé pouvoir linéique de ralentissement de l'électron. La loi de Bethe en donne les variations avec l'énergie E de l'électron. A partir de celle-ci on peut calculer le parcours moyen de l'électron d'énergie initiale E_0 , défini comme la distance parcourue en ligne droite depuis la source avant d'être définitivement arrêtée par le milieu :

$$(Eq. II-8) \quad R = \int_0^{E_0} \left(\frac{dE}{dx} \right)_{tot}^{-1} dE$$

En observant dans un détecteur la trajectoire d'un électron, certaines traces se distinguent de la trajectoire principale alors que d'autres y sont confondues. Ces traces distinctes sont dues aux électrons dits δ provenant d'une collision électronique violente et dont l'énergie est supérieure à une certaine énergie de coupure Δ . C'est pour distinguer ces électrons que la notion de transfert d'énergie linéique noté L_Δ a été introduite : il ne s'agit que de la partie du pouvoir linéique de ralentissement associée à des échanges d'énergie inférieurs ou égaux à Δ qui est souvent fixé à 100 eV. Lorsque toutes les particules sont prises en compte, la notation d'usage est L_∞ . L'unité SI du TEL est le J/m. Des unités plus usuelles sont le keV/ μ m ou le MeV.cm²/g, moins dépendante de la masse volumique.

II.1.3. Quantification de l'énergie déposée

Une part de l'énergie transportée par le rayonnement ionisant est déposée dans l'absorbant par l'intermédiaire des processus physiques évoqués ci-dessus. L'énergie déposée par unité de masse de l'absorbant, encore connue sous le nom de *dose absorbée*, est une quantité très utile pour prédire la gravité des dégâts biologiques engendrés.

II.1.3.1. Caractérisation du champ de rayonnement

Les quantités radiométriques telles que la fluence particulaire ou en énergie permettent de décrire le champ de rayonnement de manière globale. Soient dN particules traversant une petite surface da (unité : m²) pendant le temps dt (unité : s). L'énergie de ces particules est appelée énergie radiante, notée dR (unité : J). La fluence de particules Φ est le nombre de particules traversant la surface da et le débit de fluence de particules en est la dérivée par rapport au temps:

$$(Eq. II-9) \quad \Phi (m^{-2}) = \frac{dN}{da} \quad ; \quad \dot{\Phi} (m^{-2}.s^{-1}) = \frac{d^2N}{da.dt}$$

Similairement, la fluence d'énergie Ψ et le débit de fluence d'énergie se définissent ainsi :

$$(Eq. II-10) \quad \Psi (J.m^{-2}) = \frac{dR}{da} \quad ; \quad \dot{\Psi} (W.m^{-2}) = \frac{d^2R}{da.dt}$$

L'énergie radiante R relie la fluence particulaire à la fluence d'énergie par l'intermédiaire de l'énergie des particules puisque

$$(Eq. II-11) \quad dR = \sum_{i \text{ particules}} E_i dN_i$$

II.1.3.2. Atténuation, transfert et absorption de l'énergie

La *section efficace* d'une interaction représente la plus petite surface autour d'une particule délimitant une probabilité non nulle d'action du rayonnement. Son unité est le barn ou $10^{-28} m^2$. Ainsi, si dn est le nombre de cibles contenues dans un matériau élémentaire dont la section vue par le rayonnement est da , la probabilité qu'une interaction donnée ait lieu est :

$$(Eq. II-12) \quad p = \frac{dn}{da} S$$

où S est la section efficace d'interaction.

L'atténuation d'un rayonnement au travers d'une cible mince d'épaisseur x résulte de la totalité des interactions intervenues dans le matériau. Si n est le nombre d'atomes par m^3 contenue dans cette cible et N_0 le nombre de particules initialement présentes dans un faisceau monoénergétique, le nombre N de particules restant à la sortie de la cible mince est :

$$(Eq. II-13) \quad N = N_0 e^{-nS_{tot}x} = N_0 e^{-n(\sigma + \tau + \kappa)x}$$

où les sections efficaces atomiques sont nommées σ pour la diffusion (Rayleigh et Compton²), τ pour l'effet photoélectrique et κ pour l'effet de matérialisation.

Le *coefficient total d'atténuation linéique* μ_{tot} simplifie la relation précédente :

² Dans certains ouvrages de référence comme [John53] tabulant ces grandeurs, ces deux contributions peuvent être distinguées sous la forme σ_{coh} et σ_{inc}

(Eq. II-14)
$$\mu_{tot} = n S_{tot} \text{ d'où } N = N_0 e^{-\mu_{tot} x}$$

Il a donc la dimension de l'inverse d'une longueur et dépend de l'énergie E des photons incidents ainsi que de la nature du matériau traversé. Pour s'affranchir de la dépendance de ce coefficient avec l'état physique du matériau, le *coefficient massique d'atténuation totale* est préférentiellement utilisé. Si ρ est la densité du matériau composant la cible :

(Eq. II-15)
$$N = N_0 e^{-\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right) \rho x}$$

Pour homogénéiser les dimensions il sera pratique d'utiliser $\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)$ en $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$, ρ en g.cm^{-3} et x en cm. Parfois x est appelée épaisseur massique pour s'affranchir du ρ et son unité est donc le g.cm^{-2} . Le coefficient massique d'atténuation totale intègre toujours les contributions massiques des différents phénomènes physiques, comme évoqué dans l'équation (Eq. II-13) (illustré pour l'eau liquide sur la Figure II-5).

Le *libre parcours moyen* du photon dans le matériau est la valeur moyenne de son parcours entre deux interactions. Il est égal à l'inverse du coefficient linéique total d'interaction et représente ainsi l'épaisseur de cible pour laquelle le nombre de photons incidents est divisé par e . Quant à la couche de demi-atténuation (CDA), c'est l'épaisseur de cible qui divise de moitié le nombre de photons incidents. Cette dernière grandeur permet notamment de caractériser les faisceaux de rayons X de basses énergies.

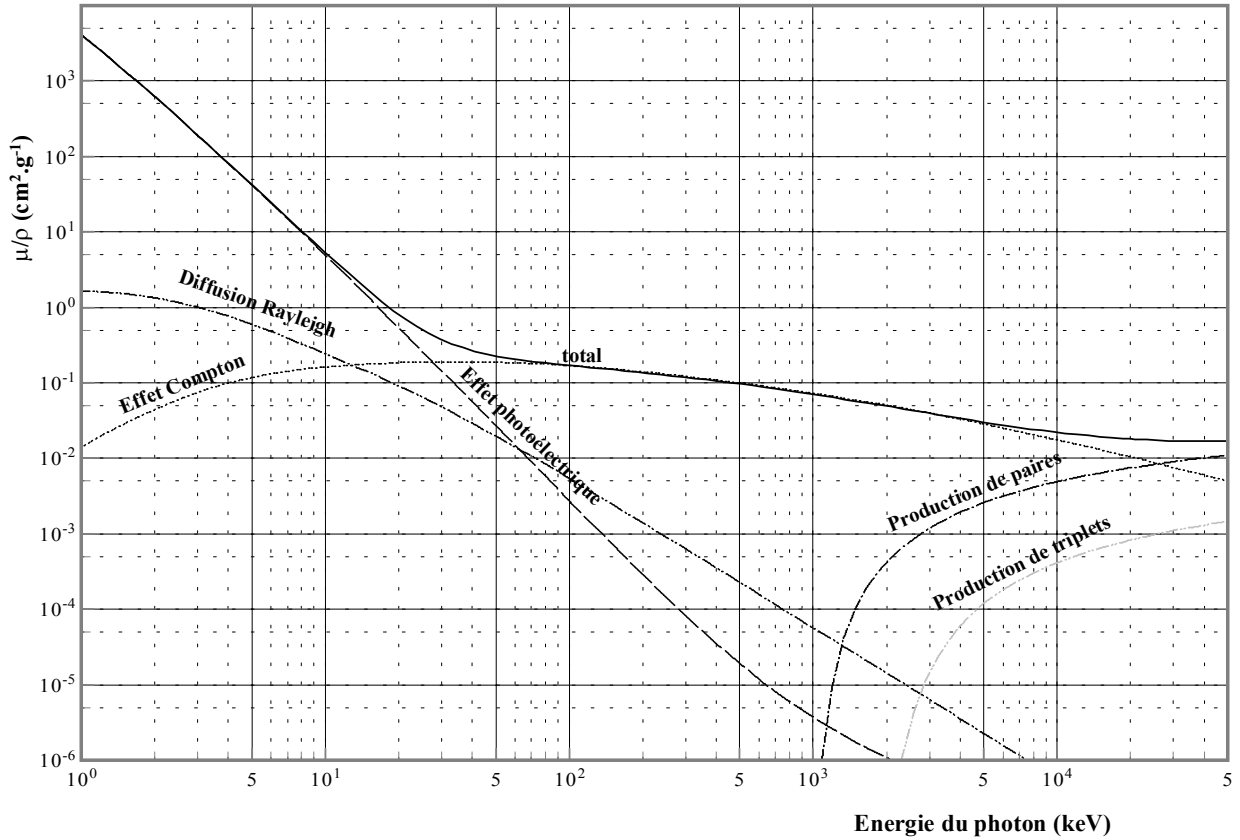


Figure II-5 : Coefficients massiques d'atténuation de l'eau liquide pour des photons d'énergies comprises entre 1 keV et 50 MeV. Contribution des différents types d'interactions physiques.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'absorption de l'énergie du photon par le milieu est un processus en deux temps. Le premier est le *transfert* de l'énergie cinétique des photons aux électrons du milieu et le second est l'*absorption* de l'énergie cinétique des électrons par le milieu *via* des ionisations et des excitations des molécules de celui-ci. Les sections efficaces de chaque type d'interaction régissent les probabilités d'apparition de chaque effet ainsi que les énergies allouées à chaque particule au sortir de l'interaction.

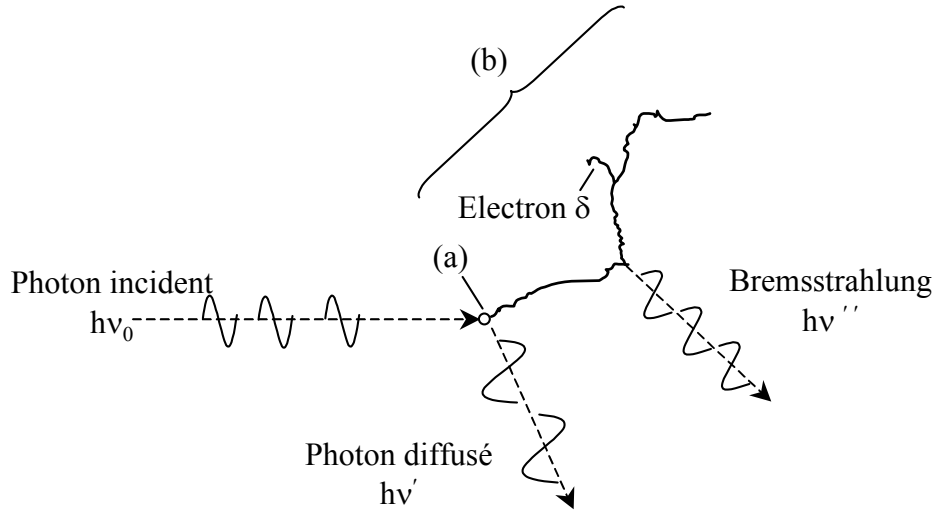


Figure II-6 : Représentation schématique du transfert d'énergie d'un photon au milieu traversé.

L'interaction a lieu en (a) avec gain d'énergie cinétique pour un électron du milieu. Celui-ci va la perdre progressivement le long de son parcours (b) constitué de petites collisions. Du rayonnement de freinage est émis suite à une interaction entre l'électron et un noyau du milieu. L'électron δ résulte d'une interaction relativement violente avec un autre électron.

Le coefficient massique de transfert d'énergie $\left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)$ représente la probabilité que

l'énergie du photon incident soit communiquée aux électrons du milieu au niveau du point d'interaction. Par définition, le rayonnement photonique secondaire (diffusé ou fluorescence) n'est donc pas pris en compte dans ce coefficient (Figure II-6). Ainsi est introduite pour chaque type d'interaction la fraction f de l'énergie du photon ayant immédiatement servi à mettre en mouvement des électrons :

$$(Eq. II-16) \quad \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right) = \frac{1}{\rho} (f_{inc} \sigma_{inc} + f_{pe} \tau + f_{pair} \kappa_{pair} + f_{trip} \kappa_{trip})$$

où $f_{inc} = 1 - \frac{h\nu' + h\nu}{h\nu_0}$ et $h\nu'$ énergie moyenne du photon Compton (cf. Figure II-2), $h\nu$ énergie moyenne libérée sous forme de fluorescence après interaction Compton;

$$f_{pe} = 1 - \frac{h\nu}{h\nu_0} \text{ et } h\nu \text{ énergie moyenne libérée sous forme de fluorescence par photon}$$

absorbé après effet photoélectrique (cf. Figure II-3) ;

$$f_{pair} = 1 - \frac{2mc^2}{h\nu_0} \text{ et } f_{trip} = 1 - \frac{2mc^2 + h\nu}{h\nu_0}.$$

L'unité SI du coefficient massique de transfert d'énergie est le $m^2.kg^{-1}$.

Finalement le *coefficient massique d'absorption en énergie* $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)$ enlève à $\left(\frac{\mu_{tr}}{\rho}\right)$ la partie de l'énergie des électrons secondaires qui s'échappe du matériau sous forme de rayonnement de freinage.

(Eq. II-17)
$$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right) = (1 - g) \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho}\right)$$

avec g proportion de l'énergie cinétique communiquée aux électrons (quel que soit le type d'interaction) réapparaissant sous forme de Bremsstrahlung (Figure II-6). A basse énergie ($h\nu_0 < 100$ keV) et pour les milieux biologiques, g tend vers zéro.

La figure ci-dessous illustre les définitions des coefficients d'atténuation totale, de transfert et d'absorption d'énergie.

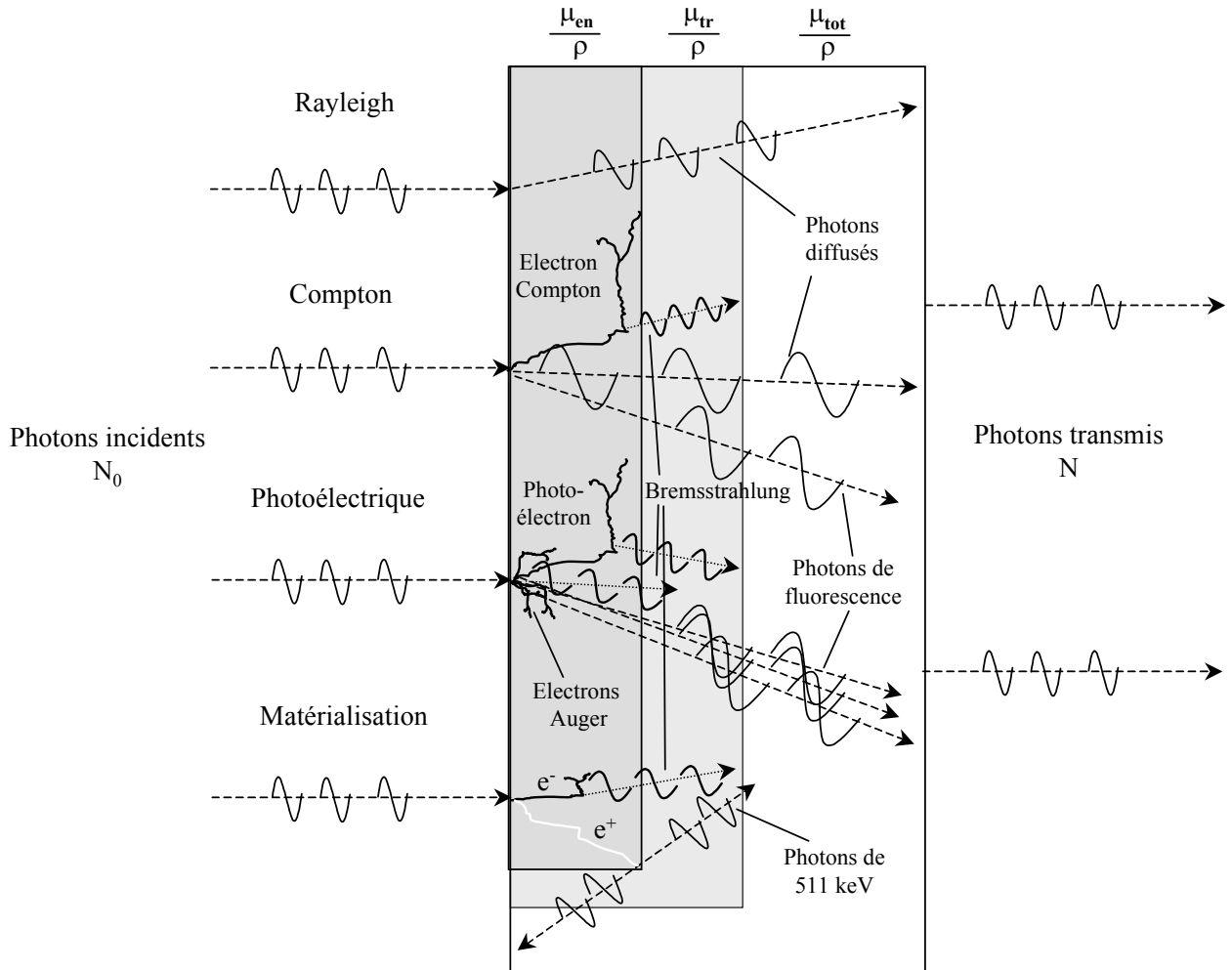


Figure II-7 : Représentation schématique des particules secondaires prises en compte au niveau des coefficients d'atténuation massique totale, de transfert et d'absorption d'énergie pour les différents types d'interaction photon-matière.

Lorsque le matériau cible est constitué d'un mélange de composés élémentaires, les coefficients d'atténuations massiques (total, de transfert ou d'absorption d'énergie³) se définissent à partir de la fraction massique de chaque élément dans le mélange :

$$(Eq. II-18) \quad \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_{\text{mélange}} = \sum_{i \text{ éléments}} w_i \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_i \text{ avec } w_i = \frac{m_i}{M}$$

où m_i est la masse de l'élément i et M la masse totale du mélange.

Les valeurs numériques de ces coefficients sont tabulées pour une grande gamme d'énergie pour tous les composés élémentaires ainsi que pour les mélanges les plus intéressants en dosimétrie, comme l'eau ou les os (d'après [ICRU44]). Les deux principales sources utilisées dans le cadre de ce travail sont ([Hubb97] et [Nowo98]). Néanmoins, devant la discordance de certaines valeurs numériques⁴ et dans l'objectif d'harmoniser toutes les valeurs numériques de ce travail, seul [Nowo98] sera utilisé ici. Ce logiciel, très convivial, facilite énormément le calcul des coefficients d'atténuation de mélanges rarement utilisés et présente l'avantage de détailler la contribution de chaque type d'interaction dans l'atténuation totale des photons.

II.1.3.3. Grandeurs dosimétriques : Kerma et dose

Le *Kerma* représente l'énergie cinétique libérée dans le milieu par le rayonnement indirectement ionisant (photon, neutron). Kerma est l'abréviation de « Kinetic Energy Released per unit MAss in the medium ». Sur la Figure II-6, il correspond à l'énergie transférée en (a) et se définit par la relation :

$$(Eq. II-19) \quad K = \Phi \overline{E_{tr}} \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho} \right) = \Psi \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)$$

où $\overline{E_{tr}}$ est l'énergie moyenne transférée par le rayonnement aux électrons du milieu (J) et les unités de fluence et de coefficients massique d'interaction sont respectivement le m^{-2} et le $m^2.kg^{-1}$. Ainsi l'unité SI du Kerma est le $J.kg^{-1}$ appelée *gray* (Gy). Lorsque le Kerma est

³ En supposant que l'effet matrice soulevé par Hubbell [Hubb99] soit négligeable (à quelques dixièmes de pourcents près), ce qui, à défaut d'être correct, n'est pas plus faux que les autres hypothèses de calcul et est de loin plus pratique [Selt93]

⁴ Notamment les valeurs des seuils d'absorption différentes selon les auteurs. Exemple : le seuil K d'absorption du platine est de 78.398 keV pour [Hubb97] et 78.67 keV pour [Boon96], cité par [Nowo98].

précisé dans l'air sec, il correspond à une grandeur désuète mais néanmoins encore parfois utilisée, l'exposition. Son unité est le Röntgen, qui est égal à $0.00873 \text{ J.kg}^{-1}$.

La *dose absorbée* est la quantité intéressante en radiobiologie et en radiothérapie. Sur la Figure II-6, elle correspond aux excitations et ionisations créées le long du parcours (b) de l'électron. Elle ne tient donc pas compte du rayonnement de freinage dissipé par les électrons.

(Eq. II-20)

$$D = \Psi \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)$$

L'unité de la dose absorbée est identique à celle du Kerma (Gy).

II.2. EFFETS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'IRRADIATION

Les effets physico-chimiques de l'irradiation sont finalement provoqués par les collisions entre les électrons secondaires et les molécules du milieu. Puisque les milieux biologiques sont essentiellement constitués d'eau, les radiations ionisantes ionisent ou excitent les molécules soit directement, soit par l'intermédiaire des produits de la radiolyse de l'eau. Il est aujourd'hui établi que c'est l'altération de l'ADN qui est principalement responsable des effets des rayonnements ionisants observés sur les cellules.

II.2.1. Influence de la radiolyse de l'eau

L'action du rayonnement ionisant est dite directe si l'électron mis en mouvement participe sans médiateur à la rupture de liaison covalente et à la scission de la molécule d'ADN.

L'action indirecte des radiations ionisantes sur les molécules biologiques est induite par les produits de la radiolyse de l'eau cellulaire (Figure II-8). L'ionisation d'une molécule d'eau aboutit après une cascade de réactions chimiques à la formation de radicaux libres hautement réactifs : $\text{OH}^\bullet$ (oxydant), $\text{H}^\bullet$ et e^-_{aq} (réducteurs). On estime que si ces radicaux libres sont produits dans un cylindre de 2 nm de rayon axé sur la molécule d'ADN, ils peuvent atteindre celle-ci.

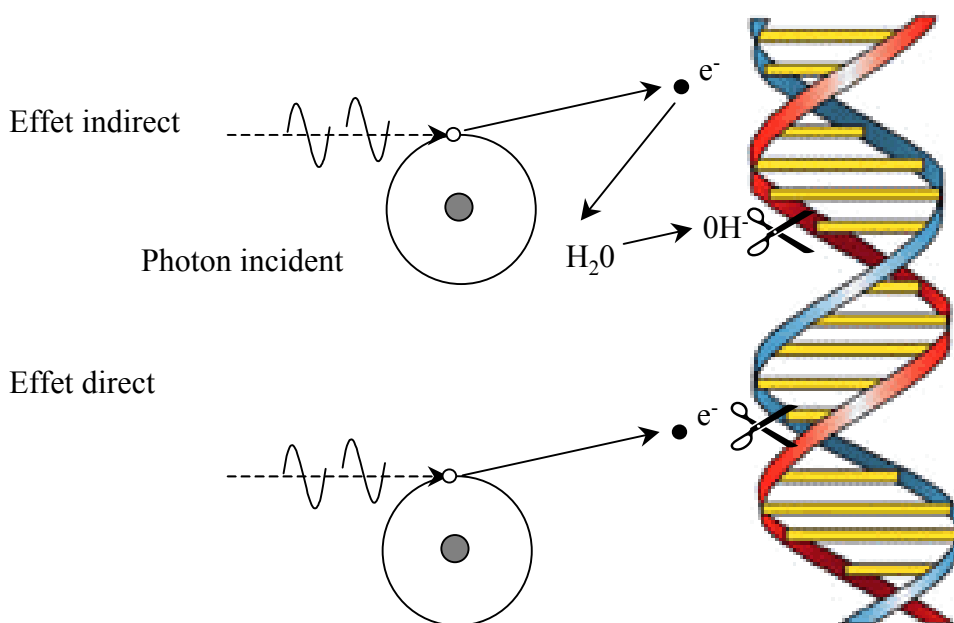


Figure II-8 : Les lésions de l'ADN peuvent être produites soit directement soit indirectement par l'intermédiaire des produits de la radiolyse de l'eau cellulaire

Les radioprotecteurs sont des substances qui permettent de diminuer les effets d'une irradiation s'ils sont présents pendant celle-ci : leur mode d'action principal est de piéger les radicaux libres formés. Leurs mécanismes d'action sont encore mal connus. Entre autres, la vitamine C, A, l'huile de soja, la cysteamine (MEA) et le diméthyl sulfoxyde (DMSO) sont connus pour leur propriété radioprotectrice et sont utilisés notamment pour étudier les mécanismes d'action des rayonnements ionisants à fort TEL [Bish00a, Bish00b, Godd96, Narr94].

Pour les particules à faible TEL, l'effet indirect est prédominant.

II.2.2. L'ADN cible critique

En 1977, Warters *et al.* montrent que la toxicité de ^{125}I , un émetteur Auger radioactif, est fortement dépendante de son site d'incorporation : celui-ci est 300 fois plus efficace s'il est incorporé directement dans l'ADN des cellules plutôt que sur leur membrane [Wart77]. Depuis de nombreux travaux ont confirmé ces données et même si aujourd'hui il n'est pas encore prouvé que l'ADN est la seule cible critique (l'endommagement du système de réparation en serait une autre), il demeure par sa taille, son unicité et sa fonction la cible la plus pertinente.

D'autre part, il n'est pas improbable que certaines zones de l'ADN soit plus radiosensibles que d'autres. Le simple fait qu'une infime partie de l'ADN soit susceptible

d'être exprimée pour révéler l'information génétique qu'il contient, justifierait cette hypothèse.

II.2.3. Dommages moléculaires

Selon le modèle de Watson et Crick, l'ADN est une molécule composée de deux brins antiparallèles, spiralés de manière à former une double hélice. Le motif de base d'un brin d'ADN est le nucléotide composé d'un sucre, le désoxyribose et d'un groupe phosphate faisant partie du squelette de l'ADN, ainsi que d'une base assurant au moyen de liaisons hydrogènes le lien avec la base du nucléotide correspondant situé sur le brin opposé (Figure II-9). Les deux chaînes sucre-phosphate sont enroulées sur elles-mêmes, la distance entre deux tours successifs de la spirale est de 3.4 nm. Une spire correspond à 10 paires de bases. Le diamètre de la molécule est de 2 nm.

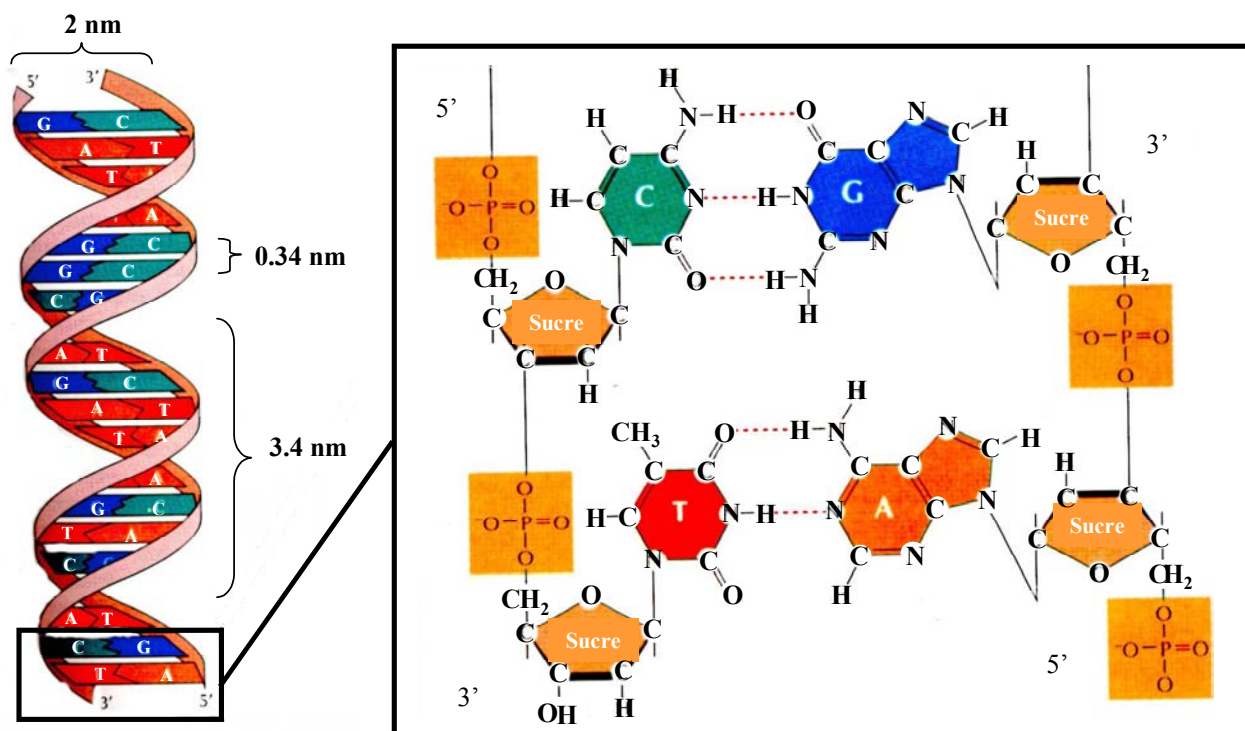


Figure II-9 : Structure de l'ADN (d'après [Coop97]).

Les bases Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine sont ici représentées par les symboles respectifs A, T, C, G

Les lésions de l'ADN induites par les rayonnements ionisants sont multiples et ont des conséquences plus ou moins importantes selon leur nature [Mous00].

Les dommages concernant les bases regroupent toutes les formes d'altérations telles que l'oxydation, le pontage entre bases voisines ou la perte d'une base de l'ADN. Ces dégâts sont largement prépondérants (environ 1500 par Gy et par cellule, pour une irradiation γ) ; leur réparation est rapide et généralement exécutée correctement en moins d'une heure.

Les cassures simple-brins (CSB) représentent, elles aussi, une part importante des dégâts engendrés par l'irradiation (environ 1000 par Gy et par cellule pour une irradiation γ [Ward88]). Elles consistent en la rupture d'une colonne sucre-phosphate. Généralement la cellule parvient à gérer correctement ce type de dommage puisque la durée de réparation est de l'ordre de 15 minutes.

Les cassures double-brins (CDB) sont plus rarement produites que les dégâts décrits précédemment (environ 40 par Gy d'irradiation γ [Ward88]). Il s'agit d'une rupture en vis à vis de la double chaîne de l'ADN, ce qui correspond à deux cassures sur les brins opposés de l'ADN situées à moins de 10 paires de base l'une de l'autre. Elles peuvent conduire dans certains cas à la perte définitive de l'information génétique contenue dans cette zone. La réparation de ces cassures, quand elle est possible, peut prendre plusieurs heures [Fran89].

II.3. EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IRRADIATION

Malgré toutes ses autres fonctions, la cellule va se fixer comme unique priorité de réparer ses lésions, et ce jusqu'à plusieurs heures après la fin de l'irradiation. A l'issue de ce délai, si la réparation n'a pas été réalisée correctement ou si elle n'a pas pu avoir lieu, la cellule, selon la gravité des lésions, mourra ou bien survivra avec des mutations ou des aberrations dont les conséquences pourront apparaître dans sa descendance, des années après l'irradiation. Ainsi les effets biologiques sont cruciaux pour l'avenir de la cellule. Cependant il faut garder à l'esprit que la capacité d'une cellule à réparer ses dommages dépend fortement de leurs types, qui dépendent eux-mêmes fortement du dépôt primaire d'énergie.

II.3.1. Fidélité et mécanismes de réparation des lésions de l'ADN

Les mécanismes de réparation moléculaire éliminent les radiolésions et visent à reconstituer la structure originale de l'ADN. La réparation est dite *fidèle* si l'ADN est restauré dans son intégrité (par exemple : excision-resynthèse, transalkylation, photorestauration). La réparation peut cependant être parfois *fautive* et devenir la source de mutations ou d'aberrations chromosomiques. Ceci se produit notamment dans les cellules cancéreuses qui ont perdu certains systèmes de contrôle de leur génome au cours de leur transformation néoplasique. Il existe par ailleurs un système de réparation de recours dit *fautif* chez les bactéries (le système SOS) qui entre en jeu lorsque les systèmes de réparation fidèles sont saturés. Il induit massivement des mutations géniques qui participent à la variabilité génétique des bactéries en situation de stress et permet l'émergence de formes résistantes.

Des techniques biochimiques et enzymatiques permettent une étude très précise des différents types de lésions et de réparations des molécules d'ADN. Par ailleurs, il existe des mutants défectifs pour une voie de réparation donnée. L'étude de ces mutants fournit une autre méthode d'approche des phénomènes de réparation. Ces mutants sont plus radiosensibles car ils peuvent avoir perdu certains mécanismes de réparation.

II.3.1.1. Réparation des dégâts de bases

Les bases endommagées ou inappropriées peuvent être réparées par plusieurs mécanismes. Tout d'abord la réparation chimique directe comme la transalkylation qui est permise par une protéine capable de recevoir par transfert chimique les groupes organiques inadéquats (comme les groupements méthyles apportés par des agents alkylants). Ce type de réparation est très spécifique d'un type de lésion car il met en jeu des protéines différentes pour chaque type de lésion. L'excision-resynthèse est un mécanisme de réparation plus général, et peut s'adapter aux cas particuliers de l'excision d'une base ou d'un nucléotide endommagés ou encore de la correction d'erreur dans l'appariement de bases. Comme schématisé sur la figure ci-dessous, elle fait intervenir des enzymes capables d'extraire les bases et groupement phosphate erronés (ADN glycosylase), de dépolymériser un segment de l'ADN autour de ce site (ADN endonucléase) puis de les remplacer (ADN polymérase) et enfin de ressouder les brins corrigés (ADN ligase).

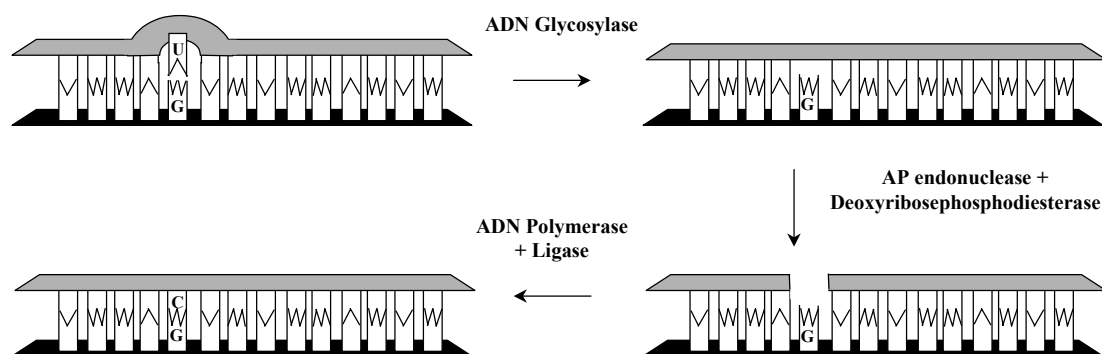


Figure II-10 : Réparation par excision de base.

II.3.1.2. Réparation des cassures de brins de l'ADN

La réparation des cassures simple-brins est efficace et rapide ; elle s'effectue comme pour les dégâts de bases par excision-resynthèse.

Plusieurs modèles existent pour expliquer la réparation des cassures double-brins [Karr00, Khan01].

La réparation peut s'effectuer par simple suture des deux extrémités de l'ADN (Non Homologous End Joining); ce mode de réparation, majoritaire chez les mammifères, serait assuré par des ligases et des topoisomérases. La sous-unité catalytique de la protéine kinase DNA-PKcs est activée par le complexe Ku80/Ku70 (hétérodimère Ku) fixé aux extrémités lésées de l'ADN et s'y associe pour former le complexe DNA-PK (Figure II-11). Pourvu d'un grand pouvoir phosphorylant ce complexe serait capable de rapprocher les brins coupés de l'ADN et jouerait ainsi un rôle important dans sa réparation. Ce mode de réparation conduit à des erreurs mineures au niveau de la séquence de l'ADN.

La réparation par recombinaison consiste à remplacer les séquences endommagées :

- soit par des séquences du chromosome homologue ou de la chromatide sœur (recombinaison dite homologue [Thya96])
- soit par des séquences fréquentes (recombinaison illégitime [Ehr193]).

Le mécanisme de recombinaison homologue n'est à l'heure actuelle que partiellement élucidé. Il fait intervenir les protéines rad52 et rad51, qui respectivement, se fixent aux extrémités lésées de l'ADN (comme les protéines Ku le font pour la suture non homologue) et forment des filaments pour faciliter la récupération de l'information sur le chromosome homologue (Figure II-11). L'information manquante est resynthétisée d'après ce modèle. Il est intéressant de noter que deux autres protéines utilisées pour le processus de recombinaison homologue sont synthétisées par les gènes BRCA1 et BRCA2. Des mutations héréditaires au niveau de ces gènes prédisposent les femmes au cancer du sein et de l'ovaire. Inversement, lorsque ces gènes sont fonctionnels, l'intégrité du génome semble être préservée par la promotion de la recombinaison homologue [Moyn99]. La recombinaison homologue n'est pas permise dans toutes les cellules du fait de leur différenciation. Ce peut être une source d'aberrations chromosomiques comme peut en être une le mécanisme similaire représenté par la recombinaison des immunoglobulines dans les lymphocytes (recombinaison V(D)J).

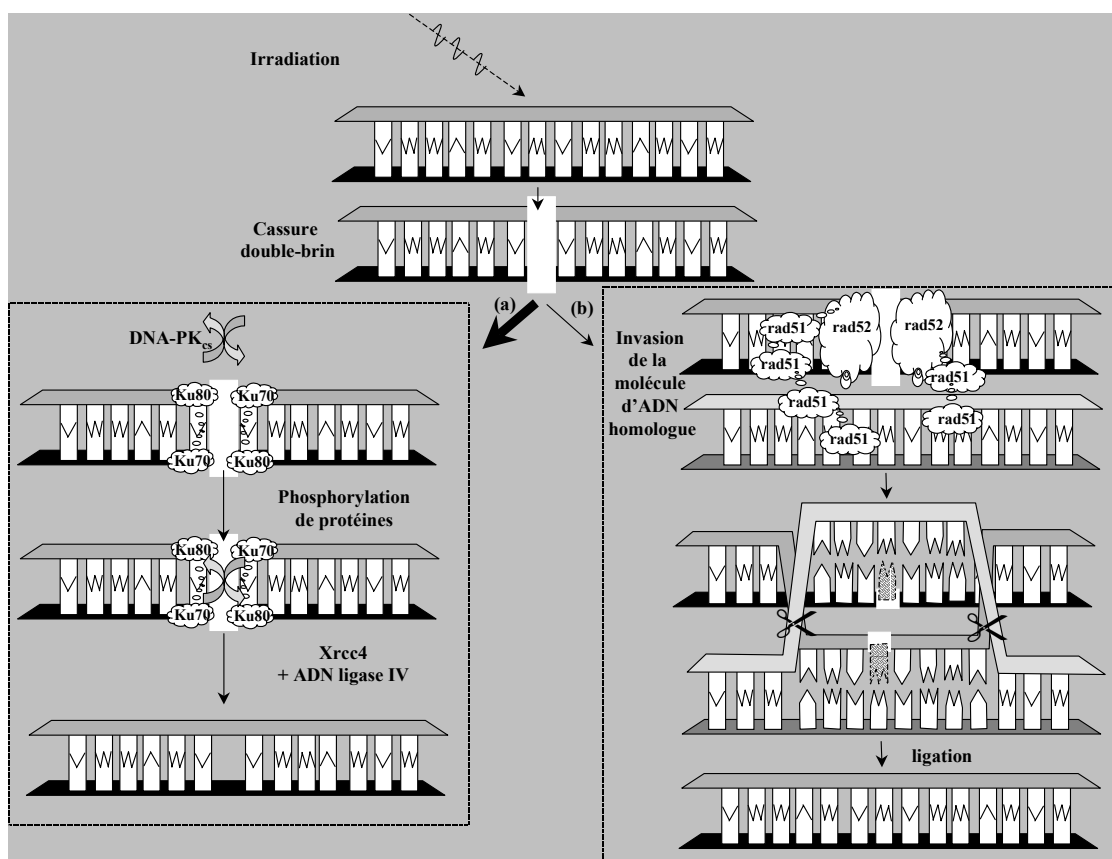


Figure II-11 : Mécanismes de réparation d'une cassure double-brins. (a) par suture non-homologue, d'après [Feat99] et (b) par recombinaison homologue d'après [Khan01]

II.3.2. Les cassures double-brins : dommages critiques ?

De tous les dégâts de l'ADN possibles, seules les cassures double-brins semblent être corrélées à la létalité lorsque des paramètres tels que le TEL, les radioprotecteurs ou l'hypoxie varient [MacM93]. Il a été notamment montré qu'une seule CDB non réparée est létale chez les bactéries [Ilia91a]. De la même manière, une CDB non réparée constitue un événement létal pour les levures [Fran90]. Chez l'homme des lignées systématiquement hypersensibles se sont révélées déficientes en système de réparation des CDB [Badi95]. D'une manière plus générale, chez l'homme, ce sont l'absence ou les défauts de réparation des cassures double-brins qui induisent la létalité des radiations ionisantes [Fora97b].

Un problème important pour comprendre la relation existant entre CDB et létalité est la mesure précise du taux de CDB induites dans les cellules. Aucune technique de mesure ne permet actuellement de quantifier directement les CDB. Elles sont mises en évidence indirectement par l'évaluation des fragments d'ADN qu'elles produisent. Le pouvoir de résolution des techniques employées ne permettant pas de détecter des fragments de taille supérieure à 15 Mbp, les doses utilisées pour mesurer les CDB sont de l'ordre de la dizaine de

Gy alors que celles administrées pour des études de survie cellulaire sont de l'ordre du Gy. Ces techniques font généralement appel au marquage de l'ADN par de la thymidine marquée par un isotope radioactif de l'hydrogène (thymidine tritiée : $^3\text{HTdR}$) ou du carbone ($^{14}\text{CTdR}$). Après l'irradiation éventuellement suivie d'une période de réparation, les cellules sont lysées. La *sédimentation en gradient de sucrose* est basée sur la discrimination des fragments selon leur poids moléculaire par une centrifugation par une colonne à viscosité progressive. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle demande des doses d'irradiation supra-létales, supérieures à 50 Gy car le pouvoir de sédimentation des longs fragments d'ADN est faible. Une extrapolation doit donc être réalisée pour la corrélation avec l'inactivation cellulaire. Avec l'*élution neutre sur filtre* les fragments d'ADN migrent à travers les pores d'un filtre de polycarbonate entraînés par un tampon d'élution à pH neutre. La nécessaire calibration de cette technique [Radf85] la rend d'usage délicat et de plus les conditions de lyse semblent influencer la forme des courbes d'élution [Pris89]. L'*électrophorèse en champs pulsés* (PFGE) est la technique de référence actuellement, c'est la plus récente et elle est plus sensible que les précédentes. Elle a en outre l'avantage de reposer sur des bases physiques connues : les fragments d'ADN, chargés négativement, migrent sous l'effet de champs électriques à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille. [Schwa84]. Plusieurs variantes de cette technique existent, différant notamment sur l'orientation des champs électriques. Si les cellules lysées sont incluses individuellement dans le gel d'électrophorèse, on peut observer par fluorescence l'image de la migration de l'ADN qui prend la forme de la queue d'une comète dont les dimensions (le moment) du cœur et de la queue dépendent du nombre de fragments d'ADN libérés. Le *test des comètes* fournit des résultats comparables à ceux de l'électrophorèse en champ pulsé; la *technique du halo*, quant à elle, fait appel à une lyse plus modérée qui préserve la structure en boucle de la chromatine. Comme les cassures de l'ADN relaxent la chromatine, la taille apparente du noyau augmente avec l'irradiation et son diamètre constitue donc une mesure indirecte des CDB.

II.3.3. Létalité des lésions

Lorsque la réparation est fautive ou incomplète mais que la continuité de l'ADN est respectée sans remaniement à grande échelle, on parle de *mutations*. Lorsque les anomalies résiduelles sont des modifications chromosomiques ou chromatidiennes telles que des échanges (translocations), des pertes de matériel (délétions) ou la duplication de séquences entières d'ADN, on parle d'*aberrations* chromosomiques. Lorsque celles-ci affectent une partie codante de l'ADN, le génotype de la cellule est modifié. Il est probable que ce sont ces

aberrations chromosomiques qui sont à l'origine de l'inactivation cellulaire puisque la dose moyenne pour tuer une cellule est approximativement égale à celle nécessaire pour induire en moyenne une aberration chromosomique [Bedf91, Nikj98].

Lorsque le nombre ou la gravité des lésions dépassent un certain seuil et à condition que la cellule en soit capable, elle peut activer une réponse 'suicide' ou mort cellulaire programmée, dénommée *apoptose* [Verh00]. Elle ne peut se produire que si sa protéine p53 est fonctionnelle (ce qui n'est pas le cas dans près de 50% des cancers humains). L'apoptose provoque une fragmentation du noyau cellulaire.

Finalement ce sont donc les aberrations chromosomiques qui induisent la mort de la cellule. Celles-ci résultent de la non ou mauvaise réparation de quelques cassures double brins.

Parmi les lésions élémentaires produites par une irradiation, on distingue phénoménologiquement:

- les lésions *létales*, qui touchent les fonctions vitales de la cellule et sont irréparables ;
- les lésions *sublétales*, qui ne sont pas individuellement létales et sont donc réparables ; leur accumulation peut tout de même conduire à la mort cellulaire ;
- les lésions *potentiellement létales*, qui peuvent être létales si la division cellulaire intervient avant leur réparation mais qui peuvent aussi être réparées si les conditions et l'environnement cellulaire post-irradiation le permettent.

II.3.4. Survie cellulaire

Ce paragraphe traite essentiellement de la mortalité cellulaire et de sa relation avec les doses d'irradiation et des facteurs qui peuvent la modifier. Pour pouvoir préciser la notion de survie cellulaire il est nécessaire au départ de définir celle de mort cellulaire.

II.3.4.1. Types de mort cellulaire radio-induite et survie clonogénique

L'exposition de cellules à des doses significatives de radiations ionisantes induit toujours une perte de potentiel clonogénique ce qui est la définition-même de la mort cellulaire au sens radiobiologique du terme. Elle n'implique donc pas nécessairement la disparition physique de la cellule bien que ceci puisse se produire à plus ou moins brève échéance. Ainsi une cellule qui est encore présente au sein d'un tissu, et apparemment intacte, capable de synthétiser des protéines et même de l'ADN, et par conséquent capable d'effectuer encore un petit nombre de divisions sera considérée malgré tout comme morte si sa descendance est condamnée à disparaître. Plusieurs modes de disparition des cellules existent

et leur proportion est fonction de la dose de rayonnement et de l'expression d'un certain nombre de gènes.

Après une irradiation à dose très élevée, de l'ordre de quelques centaines de grays, l'arrêt de toute fonction cellulaire est observé : il s'agit de la *mort cellulaire immédiate* ou mort en intercinèse.

L'*apoptose radio-induite* est également susceptible d'apparaître rapidement après l'irradiation (6-24h) selon l'intégrité de la protéine p53 des cellules. Génétiquement programmée ce type de mort est indispensable à l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire au maintien de l'équilibre croissance-prolifération. Le taux d'apoptose radio-induite n'est important que dans certains types cellulaires (prostate, lymphocytes, cryptes intestinales) et excède rarement 10% pour les cellules épithéliales.

La *mort mitotique* est le mécanisme de mort cellulaire prépondérant dans les cellules tumorales épithéliales. Elle peut revêtir des faciès très divers dont les principaux sont l'oncose (nécrose) et la mort cellulaire différée au décours ou au moment d'une mitose.

Au contraire une cellule radiobiologiquement *survivante* ou *viable* est une cellule qui a gardé son pouvoir de prolifération et donc sa capacité de donner naissance à une colonie ou à un clone ; ces cellules sont dites *clonogéniques*.

II.3.4.2. Les courbes de survie cellulaire

La proportion de cellules survivantes diminue lorsque la dose augmente. La courbe de survie cellulaire est la représentation graphique de cette relation dose-effet. Les premières courbes de survie de cellules de mammifères ont été décrites *in vitro* par Puck et Marcus en 1956 [Puck56], *in vivo* par Hewitt et Wilson [Hewi59]. Ces travaux sont à l'origine de la radiobiologie quantitative.

L'ajustement des courbes de survie expérimentales à une équation mathématique de référence est essentiel puisque cette opération permet la comparaison des résultats de plusieurs auteurs ainsi que l'appréciation de leur valeur statistique.

Il arrive que la survie S au rayonnement obéisse à une loi exponentielle en fonction de la dose absorbée D :

(Eq. II-21)
$$S = e^{-\alpha D}$$

Ce cas peut se rencontrer dans différentes conditions comme par exemple pour l'irradiation de bactéries, de cellules synchronisées en mitose ou des cellules exposées à des radiations de TEL élevé.

Néanmoins les courbes de survie présentent le plus souvent une incurvation continue, avec une tangente à l'origine non nulle. La partie initiale convexe de la courbe est connue sous le nom d'épaule. Le modèle mathématique le plus utilisé pour l'ajustement de ces courbes de survie est le *modèle linéaire-quadratique* :

(Eq. II-22)
$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

où le paramètre α correspond à la tangente à l'origine de la courbe. Malgré quelques faiblesses⁵, ce modèle est universellement accepté et largement utilisé par les radiothérapeutes pour adapter la dose totale d'un traitement en cas de modification du fractionnement. Pour ceux qui cherchent à donner une valeur explicative aux modèles mathématiques, les paramètres α et β pourraient représenter respectivement l'effet des lésions létales d'emblée et l'accumulation des lésions sublétales. Le rapport α/β correspond à la dose pour laquelle le terme linéaire et le terme quadratique contribuent pour une part égale à la létalité radio-induite globale (Figure II-12). Une petite valeur de ce rapport reflète une incurvation marquée de la courbe de survie. La partie distale de la courbe présente un intérêt clinique moindre par rapport à la partie initiale (caractérisée par α), dans la mesure où le protocole le plus habituel en radiothérapie externe fractionnée consiste à délivrer uniquement 2 Gy par jour. Des doses par fractions plus importantes rétabliraient l'importance du paramètre β .

⁵ Ce modèle n'explique pas l'hypersensibilité aux faibles doses de rayonnement

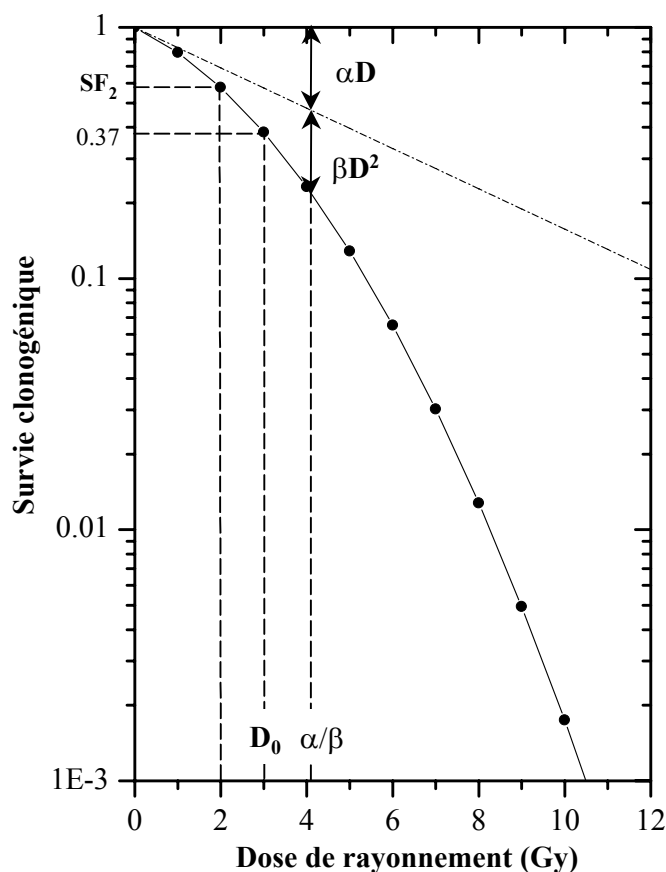


Figure II-12 : Exemple de courbe de survie ajustée avec le modèle linéaire-quadratique

La dose létale moyenne D_0 est la dose pour laquelle la survie résiduelle est égale à $1/e$ soit 37%. Un autre paramètre important est la fraction de cellules survivantes à 2 Gy (SF_2), pour les raisons évoquées précédemment (Figure II-12).

L'existence de l'épaulement des courbes de survie a suscité de nombreux modèles mathématiques parmi lesquels les modèles dits *balistiques* et *de réparation*. Aujourd'hui leur intérêt est uniquement historique dans la mesure où aucun n'a pu rendre compte de la complexité des processus biologiques initiés par l'irradiation. Une analyse complète en est donnée dans l'ouvrage [Tubi86].

II.3.4.3. Facteurs influençant l'effet biologique des radiations ionisantes

L'action biologique des radiations ionisantes peut être modifiée par les paramètres suivants :

II.3.4.3.1. Radiosensibilité cellulaire intrinsèque

Les courbes de survie présentent de larges différences selon l'espèce cellulaire étudiée. Ainsi les virus sont des structures biologiques particulièrement radorésistantes, et les

cellules eucaryotes apparaissent par comparaison très radiosensibles. Les bactéries présentent une radiosensibilité intermédiaire.

Pour une espèce cellulaire donnée, les mutants déficients en système de réparation se révèlent plus sensibles que la souche sauvage et la courbe de survie ne présente plus d'épaule.

S'il a été longtemps estimé que la radiosensibilité était déterminée par la pente de la partie distale des courbes de survie (D_0 et nombre d'extrapolation n) en particulier parce que les expérimentateurs utilisaient de fortes doses, il est à présent considéré que c'est l'aspect de la partie initiale qui est le meilleur facteur prédictif de la réponse des populations cellulaires aux radiations ionisantes (d'où la SF_2). La capacité de restauration cellulaire est donc le facteur prédictif principal de la radiosensibilité intrinsèque. Schématiquement on distingue :

- les cellules à faible capacité de réparation, donc relativement radiosensibles. Leurs courbes de survie sont caractérisées par un épaulement étroit et un α/β élevé (par exemple 10 Gy). Les cellules tumorales considérées comme sensibles (carcinome) entrent dans cette catégorie ainsi que les cellules saines à réponse précoce (cellules souches de la moelle hématopoïétique, épithélium...).
- Les cellules à forte capacité de réparation, donc relativement radiorésistantes. L'épaulement de leurs courbes de survie est plutôt large et le α/β est faible (par exemple 3 Gy). Les cellules tumorales peu sensibles à l'irradiation (glioblastome, mélanome malin) ainsi que les cellules saines à réponse tardive (tissu conjonctif, derme, tissu nerveux...) en font partie.

II.3.4.3.2. Effet radiosensibilisant de l'oxygène

L'effet d'une irradiation est augmenté en présence d'oxygène. Celui-ci se combine avec les radicaux libres pour former des molécules hyperoxygénées, dont la toxicité s'ajoute à celle du rayonnement. L'OER (ou *Oxygen Enhancement ratio*) est défini comme le rapport des doses nécessaires à l'obtention d'un effet biologique donné selon que les cellules sont irradiées en hypoxie ou bien oxygénées. Par exemple, pour les rayonnements photoniques ou électroniques classiques, l'OER est typiquement de 3 ce qui signifie que les cellules hypoxiques auront besoin d'une dose 3 fois plus élevées que les cellules normoxiques pour être stérilisées.

II.3.4.3.3. Facteur temps : fractionnement, débit de dose, ensemencement différé, effet-W

Le taux de survie cellulaire dépend de la distribution de la dose dans le temps : la dose totale, son fractionnement et son étalement. Une partie des lésions sublétales et potentiellement létales créés par l'irradiation est en effet réparée pendant le temps de repos entre deux fractions de l'irradiation. Ce phénomène, mis en évidence *in vitro* par Elkind et Sutton [Elki59], est appelé *restauration cellulaire*. Pour maintenir le même effet tumoricide il est donc nécessaire d'augmenter la dose totale délivrée lorsque celle-ci est fractionnée. L'étalement favorise d'autres phénomènes biologiques, comme la repopulation cellulaire (multiplication des cellules survivantes) et la réoxygénation des cellules tumorales hypoxiques.

En cas d'irradiation continue, la radiosensibilité cellulaire varie en fonction du débit de dose [Hall72]. Dans la plupart des lignées cellulaires, pour les hauts débits (10 Gy/h ou plus) la radiosensibilité est pratiquement constante et indépendante du débit. Pour les valeurs inférieures, trois phénomènes biologiques expliquent l'influence :

- 1/ la restauration cellulaire dont les effets sont notables pour les débits $< 6 \text{ Gy/h}$
- 2/ la progression dans le cycle cellulaire peu fréquente au-dessus de 0.3 Gy/h
- 3/ la division cellulaire dont l'incidence n'est notable que pour des débits aussi bas que 0.06 Gy/h

Comme illustré ci-dessous (Figure II-13) seules les lésions létales d'emblée sont significatives (paramètre β tend vers 0) car les lésions sublétales peuvent être réparées par la cellule entre deux lésions puisque ces dernières sont statistiquement espacées dans le temps. Lorsque le débit de dose augmente, la probabilité que deux lésions interagissent pour produire une lésion létale augmente et les courbes de survie retrouvent leur épaulement. Une réduction du débit de dose protège donc les cellules pour lesquelles le rapport α/β est faible mais n'a aucun effet sur les cellules possédant déjà une réponse à l'irradiation exponentielle en fonction de la dose.

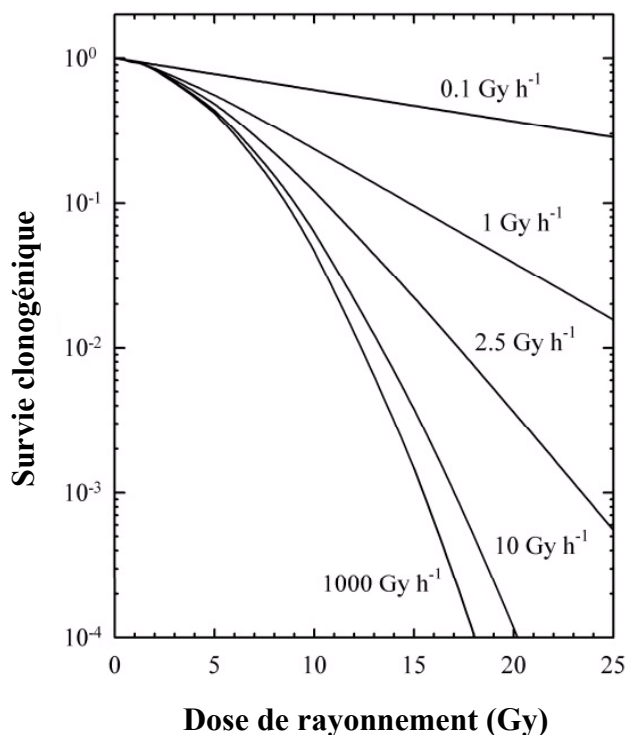


Figure II-13 : En dose unique le débit de dose influence l'effet biologique des radiations ionisantes. Simulation pour des cellules humaines de tumeur prostatique d'après [Stew01]

D'autre part, le facteur temps intervient également au niveau du choix de l'intervalle de temps entre l'irradiation et le ré-ensemencement des cellules. Des cellules quiescentes⁶ (confluentes) auront une survie clonogénique d'autant plus faible que le temps écoulé entre leur irradiation et leur étalement est court [Litt73]. Ce phénomène est classiquement expliqué par la possibilité offerte par l'ensemencement différé de réparer les dommages potentiellement létaux (PLDR, *Potentially Lethal Damages Repair*).

Enfin, la radiosensibilité cellulaire présente des oscillations multiphasiques dès les premières fractions de seconde suivant la première dose d'irradiation d'une irradiation fractionnée à haut débit de dose [Pone00]. En raison de son profil temporel, cette réponse précoce à l'irradiation a été baptisée « effet-W ».

II.3.4.3.4. Cycle cellulaire et degré de compaction de l'ADN

En pratique, seules les cellules qui sont amenées dans un terme plus ou moins proche à se diviser sont radiosensibles. L'étude de la variation de radiosensibilité de populations synchronisées dans les différentes phases du cycle cellulaire montre que la phase de mitose⁷

⁶ en inhibition de contact

⁷ Correspondant à la duplication de l'ADN, donc au transfert du code génétique

(M) et celle qui la précède (G₂) sont les plus radiosensibles. La période de réplication de l'ADN présente quant à elle une radiorésistance maximale en fin de phase S et moyenne en son début. La phase qui précède, G₁ fait la jonction entre les phases M et S du cycle à la fois du point de vue de leur chronologie et de leur radioréponse.

Il est intéressant de noter que l'irradiation de cellules altère leur progression dans le cycle cellulaire. Des arrêts sont marqués dans la progression du cycle pour permettre l'intervention des mécanismes de réparation. Cette *redistribution radio-induite* consiste en un arrêt significatif en phase G₂ pour toutes les cellules de mammifères, avec parfois un arrêt transitoire en phase S.

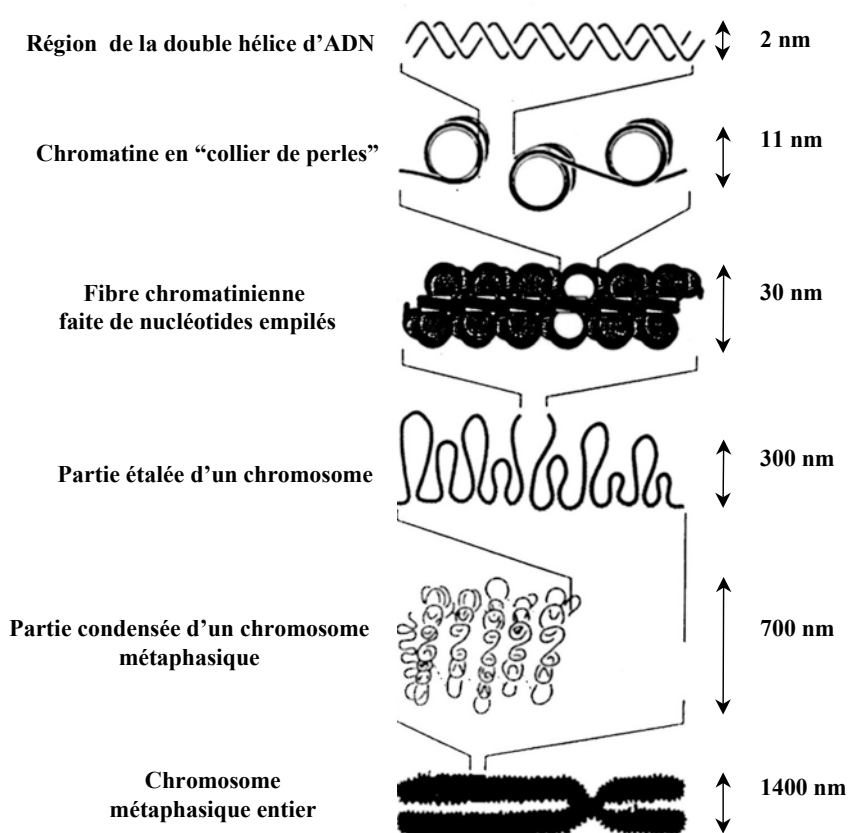


Figure II-14 : Les différents degrés de compaction de l'ADN, d'après [Albe89]

D'une manière plus générale, puisque l'état structural de l'ADN dépend fortement du cycle cellulaire, le degré de compaction de l'ADN nucléaire influence la radiosensibilité cellulaire. La chromatine est formée de l'enroulement de l'ADN autour des histones (protéines qui complexent l'ADN). L'ADN peut se présenter soit sous forme de chromosomes très compactés qui lui assure une certaine radioprotection [Olei94], soit sous forme filamenteuse non condensée (Figure II-14). Globalement pendant toute l'interphase qui correspond à l'intervalle de temps entre deux divisions cellulaires, l'ADN demeure sous forme filamenteuse pour faciliter la copie de l'information génétique et la synthèse des

protéines. La structure de la chromatine régit également l'accessibilité des sites endommagés aux enzymes chargées de la réparation.

II.3.4.3.5. Conditions de culture : température, composition du milieu

La température peut être létale pour une cellule à partir de 42°C. L'effet produit par une irradiation sur une population cellulaire est augmenté si elle est soumise à une hyperthermie. L'action de la chaleur est synergique puisque l'effet obtenu est plus important que celui qui devrait résulter de la simple addition des deux effets pris séparément. La chaleur inhibe la réparation des lésions sublétales et pourrait aussi réduire l'OER.

Le milieu de culture influence lui aussi les courbes de survie cellulaire obtenues. Son pH et sa composition (facteurs de croissance, pourcentage de sérum) sont susceptibles d'en modifier l'allure.

II.3.4.3.6. Qualité du rayonnement

L'effet biologique produit par une irradiation, à dose délivrée égale, dépend de la qualité du rayonnement utilisé. Pour faciliter les comparaisons, l'efficacité biologique relative (EBR) a été définie comme le rapport des doses D nécessaires pour obtenir le même effet biologique (par exemple 50% de survie cellulaire) avec un rayonnement de référence (« ref ») et le rayonnement étudié (« test »)

(Eq. II-23)

$$EBR = \frac{D_{ref}}{D_{test}}$$

Actuellement la tendance est d'adopter les photons γ du ^{60}Co comme rayonnement de référence ou des rayons X de haute énergie (> 1 MV). Néanmoins n'importe quel autre type de rayonnement peut être pris comme référence.

L'EBR est principalement relié au TEL : les rayonnements à TEL élevé (neutrons, ions lourds) possèdent généralement une plus grande EBR que les rayonnements à TEL faibles (photons, électrons) et l'allure de leurs courbes de survie en est modifiée puisque leur épaulement initial est plus étroit ce qui témoigne d'un plus grand nombre de lésions létales d'emblée. Toutefois il est intéressant de noter que pour les particules à fort TEL, la sensibilité à l'hypoxie est réduite (OER 2 fois plus faible pour les neutrons rapides que pour les photons, électrons). Lorsque le TEL augmente, la dose nécessaire pour produire un effet biologique donné (comme un taux de survie cellulaire) diminue sauf pour les TEL très élevés où elle augmente à nouveau (cf. Figure II-15).

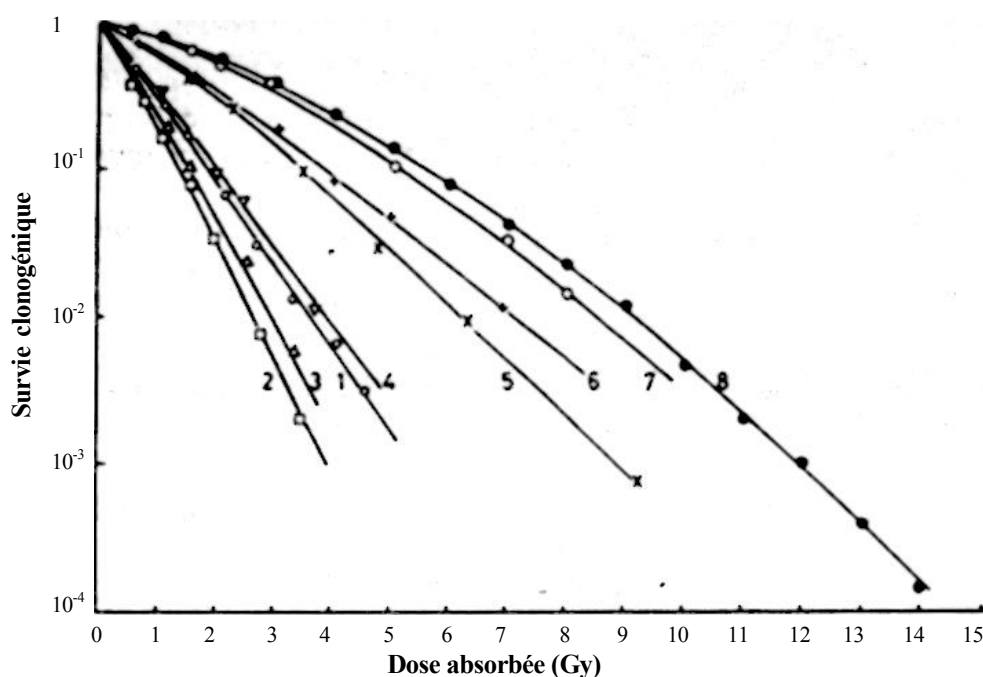


Figure II-15 : Influence du TEL sur les courbes de survie cellulaire d'après [Bare68]
 Courbes de survies obtenues *in vitro* pour des cellules rénales humaines exposées à des rayonnements de qualité différente : α de 2.5 MeV (TEL = $166 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ – courbe 1) ; α de 4 MeV (TEL = $110 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ – courbe 2) ; α de 5.1 MeV (TEL = $88 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ – courbe 3) ; α de 8.3 MeV (TEL = $61 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ – courbe 4) ; α de 26 MeV (TEL = $25 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ – courbe 6) ; deutons de 3 MeV (TEL = $20 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ – courbe 7) ; rayons X de 250 kV_p (TEL moyen estimé à $1.3 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ – courbe 8)

II.4. EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES TISSUS : APPLICATIONS ET RECHERCHES CLINIQUES

Les cellules composant un tissu ne sont pas indépendantes les unes des autres : elles forment un système complexe où s'équilibrent de manière délicate naissance et mort cellulaire. Des mécanismes de régulation permettent de maintenir la constance du nombre et de l'organisation des cellules. Les réactions tissulaires ne sont pas que la conséquence de la mort des cellules; il faut également considérer la réaction du tissu à la mort cellulaire, qui nécessite la connaissance de son *organisation* et de sa *vitesse de prolifération*. Ces deux paramètres conditionnent des différences importantes d'apparition et de gravité de lésions, dans des tissus composés de cellules de radiosensibilité pourtant identique.

II.4.1. Effets sur les tissus sains

La majeure partie des tissus sains sont des populations cellulaires en équilibre : le nombre de cellules qui naissent est égal au nombre de cellules qui meurent. Toutes les cellules sont renouvelées au bout d'un certain temps qui peut être de l'ordre de quelques jours

(sang, peau, intestin, muqueuse ORL...) à plusieurs mois (rein, foie, os, muscle, tissu nerveux).

II.4.1.1. Schéma d'organisation

Schématiquement les tissus sains sont composés au plus de trois compartiments cellulaires: celui des *cellules souches* indifférenciées capables d'autoreproduction ; celui des *cellules différenciées* purement fonctionnelles qui, à l'autre extrême, ont perdu toute capacité de proliférer et meurent par sénescence ; celui des *cellules en voie de maturation* qui constitue l'intermédiaire entre les deux compartiments précédents. La radiosensibilité tissulaire diminue avec l'augmentation du degré de différenciation.

II.4.1.2. Réactions à une irradiation

Pour un tissu sain irradié, il est classique d'opposer les réactions *précoces* aux réactions *tardives*. Les réactions précoces ou aiguës apparaissent au plus tard quelques semaines après l'irradiation. Elles suivent la mort d'un grand nombre de cellules dans les tissus à renouvellement rapide, sont réversibles et s'estompent généralement en quelques semaines avec la repopulation générée par les cellules souches résiduelles. Les réactions tardives sont généralement peu réversibles et apparaissent sur les tissus à renouvellement lent quelques mois ou plusieurs années après l'irradiation. Elles sont caractérisées par l'association de trois phénomènes : un appauvrissement progressif en cellules fonctionnelles réalisant un vieillissement prématuré et accéléré de l'organe atteint, une perturbation de la vascularisation liée à des lésions de l'endothélium des artérioles qui diminue le flux sanguin, et enfin une fibrose proliférante infiltrant le tissu conjonctif de l'organe atteint. Elles peuvent provoquer des dystrophies, des atrophies, des rétractions musculaires, des occlusions, des fistules, des hémorragies, etc.. Elles constituent en pratique le facteur limitant de la radiothérapie.

II.4.2. Effets sur les tumeurs

Les 4 facteurs de radiosensibilité tumorale sont la redistribution des cellules dans le cycle (blocage en G2 pour réparation) ; la réoxygénation des zones hypoxiques centrales grâce à la destruction des cellules oxygénées plus sensibles ; la réparation moins bonne des

cellules tumorales qui permet de protéger tissus sains grâce au fractionnement et enfin la repopulation, qui est plus rapide pour les tissus sains.

II.4.2.1. Définition et caractéristiques d'une tumeur

Une tumeur est définie comme le résultat d'une croissance cellulaire anarchique échappant aux lois de l'homéostasie tissulaire. L'effet d'une irradiation sur un tissu tumoral est donc la résultante de la disparition des cellules tuées et de la multiplication des cellules survivantes.

Les seules cellules tumorales vraiment préoccupantes sont les clonogènes, capables de se multiplier indéfiniment. La stérilisation locale ne peut être obtenue que si toutes les cellules clonogènes ont été rendues incapables de se diviser. La probabilité d'éradiquer toutes les cellules clonogènes dépend de multiples facteurs, parmi lesquels les plus importants sont :

- la dose : la probabilité de stérilisation tumorale augmente progressivement avec la dose ;
- le volume tumoral : l'expérience clinique a montré que les grosses tumeurs sont plus difficilement stérilisables (en partie à cause des zones centrales hypoxiques), et doivent si possible recevoir des compléments de dose ;
- le type histologique : certains types de tumeurs sont très radiosensibles (séminome, lymphome malin) ; d'autres le sont moyennement (carcinomes) ou très peu (mélanomes, sarcomes).

La curabilité d'une tumeur ne se définit pas par rapport à sa vitesse de régression après l'irradiation qui est uniquement fonction du taux de prolifération cellulaire.

II.4.2.2. Cas particulier des tumeurs cérébrales gliales, angiogenèse, barrière hémato-encéphalique

Les maladies neurodégénératives constituent, dans les pays occidentaux, la première cause de morbidité et de mortalité et les tumeurs cérébrales la seconde cause de mortalité par cancer chez l'enfant. L'épidémiologie des tumeurs cérébrales en France révèle que dix nouveaux cas de tumeurs cérébrales sont diagnostiqués par an et pour 100 000 habitants. Parmi elles 65% sont des gliomes. L'espérance de vie est alors réduite à 6 mois dans la moitié des cas, du fait du haut grade tumoral et donc du mauvais pronostic. Actuellement seule la chirurgie est capable de diagnostiquer précisément le degré d'évolution de ce type de tumeur. Les techniques d'imagerie conventionnelles (scanner, IRM) ne donnent en effet qu'une information morphologique sur la tumeur. Si la biopsie permet par contre d'accéder au grade

tumoral, l'échantillonnage de l'information sur le volume tumoral prélevé conduit, en plus de l'agressivité de la méthode, à 16% d'erreur par rapport à la chirurgie.

Le classement des tumeurs gliales regroupe en grades I et II les tumeurs bénignes, en III les tumeurs malignes capables de prolifération cellulaire et en IV les tumeurs malignes capables de développer leur propre système d'irrigation sanguin, appelé *angiogenèse* [Folk95]. Ce réseau de nouveaux vaisseaux présente la particularité d'être produit par la tumeur pour se répandre dans le reste de l'organisme et y diffuser des localisations secondaires (métastases). Ainsi, un des buts de la thérapie génique est de parvenir à stopper cette angiogenèse soit en neutralisant le gène pro-angiogénique ou en activant le gène anti-angiogénique des cellules tumorales.

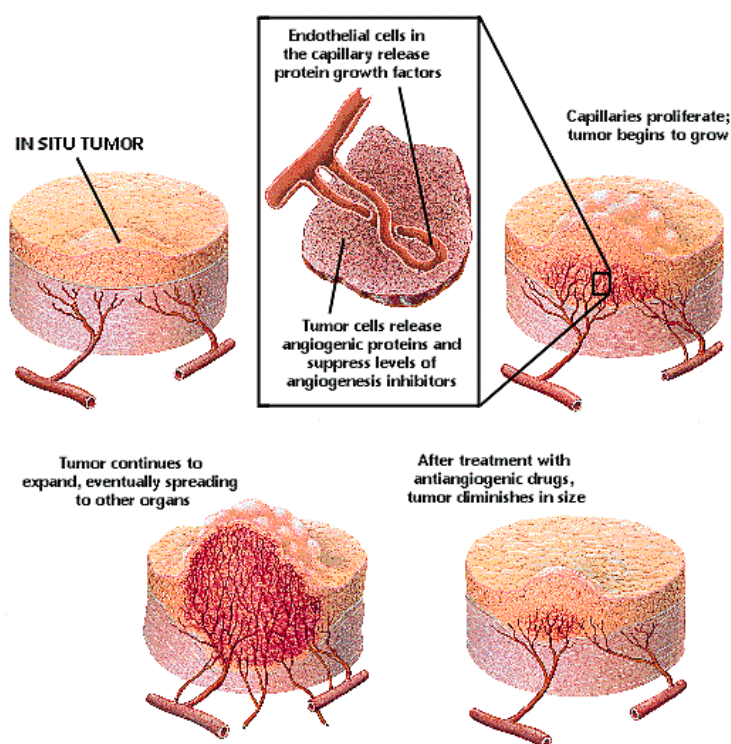


Figure II-16 : L'angiogenèse d'après [Folk96]

Il faut savoir que dans le cerveau sain, le système nerveux central est capable de se protéger du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique (BHE), plus difficile à franchir que les membranes biologiques classiques car son tissu est bordé d'une couche de cellules endothéliales qui adhèrent très étroitement les unes aux autres et empêchent donc le passage de molécules par voie paracellulaire. Toute substance doit donc, pour passer du sang vers le tissu cérébral, franchir la barrière hémato-encéphalique par voie transcellulaire. Dans le cerveau sain, seules les molécules de petites tailles lipophiles diffusent donc au travers des membranes de cellules de la BHE pour alimenter le cerveau en nutriments. La

néovascularisation tumorale caractéristique des hauts grades tumoraux entraîne, en plus d'une augmentation de la densité des vaisseaux et du débit sanguin cérébral, des modifications au niveau de leur morphologie (augmentation diamètre) et de leur perméabilité : lésée, la BHE permet la diffusion des composés hors du secteur vasculaire du cerveau pathologique. Ceci permet en outre la prise de contraste des tumeurs cérébrales en imagerie conventionnelle, mais à un stade d'évolution de la tumeur où son traitement est largement inefficace. La caractérisation de cette angiogenèse (augmentation du flux sanguin dans certaines zones du cerveau, modifications précoces de perméabilité des vaisseaux) est donc un outil pronostic de l'efficacité du traitement et donc de la survie du patient. En effet des patients à posteriori sensibles à un traitement par radiothérapie présentaient avant irradiation une faible valeur de perméabilité et qui diminuait encore pendant celle-ci.

Les gliomes sont des tumeurs uniques, tant sur le plan de leur histoire naturelle que dans leurs caractéristiques biologiques. L'amélioration de leur technique de diagnostic reste aujourd'hui un thème de recherche essentiel (imagerie métabolique : médecine nucléaire et spectroscopie IRM ; imagerie IRM paramétrique : caractérisation de la vascularisation tumorale). D'autre part, leur traitement, qui reste difficile et décevant puisque la principale cause d'échec des traitements de radiothérapie classique est la poursuite de l'évolution tumorale, est également source d'espoir. Des progrès dans sa guérison peuvent en effet être attendus grâce à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques qui président leur comportement. Ce type de tumeurs représente donc pour nous un modèle idéal d'application clinique de la recherche fondamentale et illustre parfaitement le lien souhaité entre le laboratoire et la clinique. Le problème de traiter la tumeur cérébrale en préservant au maximum les tissus sains environnants est, dans le cerveau plus qu'ailleurs, crucial et ce d'autant plus que le patient traité est jeune.

II.4.3. Méthodes d'obtention d'un effet différentiel entre les tissus sains et la tumeur

Le but d'une irradiation à visée thérapeutique est toujours double : la mort des cellules cancéreuses d'une part et la préservation des tissus sains d'autre part. Quelle que soit la technique de traitement employée, ces deux aspects sont toujours inséparablement liés. L'objectif de toute radiothérapie est donc l'augmentation de l'effet différentiel entre l'énergie déposée dans les tissus cancéreux et celle déposée dans les tissus sains. Comment arrive-t-on en pratique à optimiser cet effet différentiel ?

II.4.3.1. Restriction anatomique

II.4.3.1.1. Vers une meilleure maîtrise du volume irradié

Le meilleur moyen d'obtenir un effet différentiel entre les tissus sains et tumoraux est de s'efforcer de n'irradier que la tumeur. Cette idée basée sur des notions simples de géométrie et d'anatomie a conduit à une optimisation de plus en plus fine de la balistique des rayonnements ionisants utilisés : faisceaux de plus en plus pénétrants pour épargner les portes d'entrée, mieux collimatés, précisément planifiés grâce à la définition rigoureuse des différents volumes d'intérêt [ICRU50]. L'évolution technologique a ainsi conduit les radiothérapeutes à abandonner leurs tubes à rayons X conventionnels, utilisés pour le traitement depuis 1896, l'année suivant la découverte des rayons X par Röntgen, pour d'abord les appareils au cobalt 60, puis pour de puissants accélérateurs linéaires d'électrons. Ces derniers délivrent des faisceaux de photons d'énergie maximale de 25 MeV, déposant leur maximum d'énergie à 4 ou 5 centimètres sous la peau, sous-dosant ainsi la zone en amont. Le croisement des faisceaux dans la tumeur réduit d'autant plus la dose reçue par les tissus sains, en augmentant toutefois la proportion de tissus irradiés à faibles doses. A l'extrême, la cyclothérapie minimise la dose maximale reçue par les tissus sains tout en maximisant leur proportion irradiée.

Si la *radiothérapie per-opératoire* profite d'une opération chirurgicale pour délivrer une dose unique et élevée de rayonnement hyperfocalisé directement au cœur des tissus, la *radiothérapie en conditions stéréotaxiques* propose une alternative moins invasive pour laquelle des mini faisceaux convergents délivrent une dose unique à une lésion de petite taille souvent inaccessible à la chirurgie.

La tendance actuelle est à la *radiothérapie conformationnelle*, qui recherche la congruence la plus parfaite possible entre le volume cible prévisionnel et le volume tumoral à traiter. Elle épargne au mieux les tissus sains en imposant une définition très précise des volumes sur un système d'imagerie tridimensionnelle. Cette démarche nécessite des systèmes de contention amovibles de haute précision [Troc95] et la définition de champs de plus en plus complexes (le collimateur multilames remplaçant les caches focalisés ; le mouvement de ces lames pendant l'irradiation conduit à l'IMRT, *radiothérapie avec modulation d'intensité*). Ces moyens permettent d'augmenter la dose prescrite sans toxicité surajoutée car la proportion de tissu sain épargné par la géométrie de l'irradiation est de plus en plus importante [Chau99].

En complément de la radiothérapie externe, les techniques de curiethérapie restreignent au maximum l'irradiation au volume tumoral en y introduisant des sources radioactives scellées. La *curiethérapie gynécologique* utilise les cavités naturelles du corps pour y introduire des sources de rayonnement à proximité des volumes à traiter. La *curiethérapie interstitielle* consiste à implanter en conditions stéréotaxiques ou en per-opératoire des sources radioactives au sein de la tumeur, de manière définitive (grains de ^{125}I) ou temporaire (fils de ^{192}Ir). La dose délivrée au volume tumoral est ainsi plus élevée avec une excellente protection des tissus sains périphériques. Les volumes tumoraux traités par cette technique sont variés : seins, sphère ORL, prostate, tumeurs cérébrales⁸.

II.4.3.1.2. Des rayonnements de balistiques différentes

La *protonthérapie* est une technique particulière permettant d'accroître encore dans certains cas la précision de la balistique et de l'énergie déposée. La profondeur de pénétration des protons varie avec leur énergie ce qui permet d'épargner les volumes sensibles situés au-delà. De plus leur TEL augmente en fin de trajectoire⁹ ce qui conduit à un dépôt d'énergie plus important (pic de Bragg) et si localisé (quelques μm) qu'il doit en pratique être dégradé pour couvrir le volume cible, au détriment partiel de la protection des tissus situés en amont. Cette technique de traitement basée sur la sélectivité physique due à la distribution spatiale du faisceau est actuellement très coûteuse car elle nécessite des cyclotrons d'énergie relativement élevée (70 à 250 MeV). Elle est de ce fait réservée à certaines localisations oculaires ou cérébrales.

II.4.3.1.3. Thérapies par injection d'isotopes radioactifs

Enfin, une irradiation très localisée peut être obtenue par l'intermédiaire de *radiopharmaceutiques*, capables de se fixer spécifiquement dans le volume tumoral. En règle générale le ciblage de l'agent dans la tumeur est réalisé grâce à son activité métabolique. Par ailleurs le développement d'anticorps dirigés contre des récepteurs de facteurs de croissance ou à des antigènes membranaires permet le transport hypersélectif de molécules au niveau des cellules tumorales. Le principe de la *radio-immunothérapie* renouvelle donc le ciblage moléculaire ou génique de l'irradiation, réalisée par l'intermédiaire d'un isotope radioactif. Pour la thérapie, cet isotope doit bien évidemment délivrer un rayonnement peu pénétrant

⁸ peu de patients porteurs de gliomes malins sont éligibles pour être traités par cette technique. De plus près de la moitié des patients traités sont victimes d'une radionécrose extensive et doivent resubir une opération, avec les complications liées à ce nouveau geste chirurgical

pour réaliser une irradiation très localisée, à l'échelle de la cellule tumorale. Les émetteurs de particules à faible parcours (de l'ordre de grandeur des dimensions cellulaires) sont donc privilégiés (β^- , fort TEL). Tout naturellement, les émetteurs β^- se sont imposés en candidats potentiellement très intéressants puisque ce sont des particules dont les interactions obligatoires avec la matière leur procurent un parcours fini. Ainsi, le traitement des cancers thyroïdiens est-il réalisé par l'administration d'iode 131, dont le spectre d'émission comprend des électrons de 600 keV. Ces électrons, en interagissant avec le milieu environnant, sont capables de provoquer, soit directement, soit par création de radicaux libres, suffisamment de dégâts au niveau de l'ADN des cellules tumorales pour entraîner la mort cellulaire.

Les *émetteurs radioactifs d'électrons Auger* sont des candidats potentiellement très séduisants à condition que les faibles énergies de ces électrons soient libérées à proximité de l'ADN [Adel93]. Peu après la découverte de l'effet Auger en 1925 (cf. § II.1.1.3) il devint évident que ces cascades d'électrons de faibles énergies étaient également produits par certains radionucléides lors de leurs transformations radioactives (capture électronique ou conversion interne). En réalité, il est à présent clair que plus de la moitié des émetteurs radioactifs connus sont émetteurs Auger. Longtemps négligés, les électrons Auger ne semblaient pas intéressants pour la thérapie: en effet, de part leur mode de génération (réarrangement du cortège électronique suite à une vacance électronique au niveau des couches profondes de l'atome), ceux-ci ne possèdent qu'une très faible énergie cinétique (20-500 eV) et des parcours extrêmement limités (quelques nanomètres). Néanmoins, au début des années 1970, les progrès réalisés au niveau de la vectorisation des agents radioactifs par des macromolécules complexes, capables d'être transportées au cœur des volumes tumoraux cibles non seulement macroscopiquement mais également microscopiquement, confrontèrent les chercheurs au problème suivant : la dosimétrie conventionnelle, qui ignorait l'effet des électrons Auger, n'était pas en mesure d'expliquer l'extrême toxicité biologique constatée des émetteurs Auger [Ertl70, Fein71, Hofe71]. Un gros effort de simulation par des méthodes de Monte-Carlo du phénomène Auger et de ses conséquences sur les milieux biologiques a alors été mis en œuvre [Charl81, Gill70, Smi66]. Des spectres des principaux émetteurs Auger utilisés en médecine ont été publiés par de nombreux auteurs, et le sont toujours [Howe92]. Malgré cela, du fait de la complexité même du phénomène il semblerait que de nombreuses incertitudes demeurent notamment en ce qui concerne le nombre exact d'électrons Auger émis ainsi que l'énergie déposée à l'échelle « nanoscopique ». De nouvelles méthodes de

⁹ mais reste faible : au maximum 100 keV / μM

simulations, basées sur la prise en compte des effets directs et indirects des émissions Auger d'atomes radioactifs fixés au niveau de l'ADN de cellules sont actuellement en cours de développement [Humm89, Pomp00, Pomp96]. Une idée majeure ressort néanmoins des expérimentations et des simulations réalisées : l'effet des électrons Auger dépend fortement de leur localisation subcellulaire, qui est elle-même déterminée par la forme chimique de l'agent moléculaire vecteur de l'émetteur Auger. Il a été clairement montré que l'émetteur Auger doit au pire être intégré dans le noyau cellulaire des cellules tumorales et au mieux dans son ADN [Comm80, Fara94, Gard96, vanD96].

Le problème de vectorisation est aujourd'hui au centre de nombreuses problématiques thérapeutiques, telles que la médecine nucléaire, la thérapie génique, la thérapie par capture neutronique par le bore...etc [O'Do96a, Whel94]. Le vecteur idéal devrait être capable de se fixer : i) exclusivement et spécifiquement sur les cellules cancéreuses ; ii) indifféremment sur n'importe quelle cellule cancéreuse, quelle qu'en soit l'organe d'origine ; iii) en quantité suffisante pour que la stérilisation de la cellule tumorale soit possible ; iv) sans endommager les tissus sains. Les trois principaux types de vecteurs étudiés sont les analogues de précurseurs d'ADN, tels que les pyrimidines halogénés (IdU, BrdU) ; les molécules capables de se lier à l'ADN, comme les hormones stéroïdes ou les facteurs de croissance et les oligonucléotides synthétiques. En ce qui concerne la thérapie par émetteurs Auger radioactifs, les molécules vectrices les plus étudiées et les plus utilisées ont sans nul doute été les précurseurs halogénés, des nucléotides tels que l'iodo- ou la bromo-désoxyuridine [Bara91, Kins98, La89, Makr92], sur lesquels étaient fixés des radioisotopes tels que ^{125}I , ^{123}I ou ^{77}Br . Leur utilisation pour la thérapie a très vite posé de gros problèmes, à savoir que ce type d'agent se fixe en quantité importante dans toutes les cellules à prolifération rapide, telles que celles du système hématopoïétique ou de l'épithélium gastro-intestinal, et ne peut marquer les cellules non proliférantes (ex : gliosarcome) qu'au prix d'injections répétées ou continues. D'autre part, la demi-vie des précurseurs halogénés dans le plasma est très courte, ce qui rend l'homogénéisation du produit dans la tumeur pratiquement impossible, à moins d'envisager des administrations loco-régionales et/ou continues, avec la toxicité que cela peut entraîner au niveau des cellules fortement proliférantes. Cette technique, dont l'intérêt est fortement pressenti, est donc encore en phase débutante [Kass00b] et doit surmonter de nombreux problèmes, notamment d'irradiation non spécifique liée à la circulation de l'isotope dans le système sanguin.

II.4.3.2. Fractionnement de la radiothérapie

Le moyen le plus utilisé pour obtenir un effet différentiel entre les tissus sains et la tumeur est l'utilisation du fractionnement, qui permet de tirer avantage de la restauration cellulaire. Celle-ci permet à toute cellule de réparer les lésions sublétales de leur ADN après une irradiation. En pratique, il s'avère que les cellules saines réparent plus efficacement ces lésions que les cellules cancéreuses. Par le fractionnement de l'irradiation, ce phénomène est amplifié et aboutit, pour une dose d'irradiation égale, à un effet différentiel favorable (en terme de survie cellulaire) au tissu sain par rapport aux tissus cancéreux (Figure II-17).

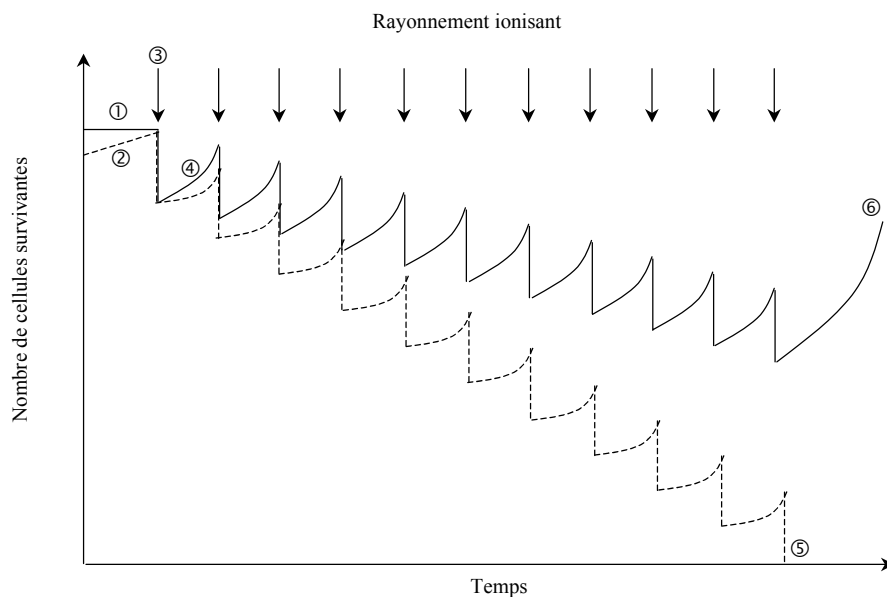


Figure II-17 : La restauration cellulaire permet d'obtenir un effet différentiel favorable entre tissus sains et cancéreux grâce au fractionnement de la dose d'irradiation

① tissu sain stable ② tissu tumoral en croissance ③ séance d'irradiation tuant le même pourcentage de cellules saines que cancéreuses ④ entre la 1^{ère} et la 2^{ème} séance les cellules saines restaurent mieux leurs lésions sublétales que les cellules cancéreuses ⑤ au terme de l'irradiation les cellules cancéreuses sont détruites et les cellules saines sont capables de proliférer jusqu'à la restauration complète du tissu sain ⑥

L'hyperfractionnement et les traitements accélérés hyperfractionnés sont des variantes du fractionnement conventionnel qui correspondent à une fraction par jour d'environ 2 Gy, 5 jours par semaines. Le premier permet d'augmenter la dose totale au niveau tumoral, en conservant l'étalement conventionnel et ce, sans augmenter les effets tardifs au niveau des tissus sains à renouvellement lent. La dose par fraction est alors inférieure à 2 Gy, renouvelée deux fois par jour. Quant au traitement hyperfractionné accéléré, il permet de délivrer une dose équivalente totale identique en un temps beaucoup plus court, afin de limiter la repopulation des cellules tumorales à prolifération rapide pendant le traitement, ce qui permet d'augmenter de manière considérable l'efficacité du traitement, mais au prix d'une complexité logistique qui n'a pas permis la généralisation de ces approches..

La *curiethérapie à faible débit* ($< 1\text{Gy/h}$) est un cas particulier de l'exploitation du facteur temps en radiothérapie. L'irradiation continue à faible débit de dose met en jeu divers facteurs radiobiologiques évoqués précédemment tels que la réparation des lésions sublétales, la réoxygénation des tissus hypoxiques, la multiplication et la cinétique cellulaires.

II.4.3.3. Modulation physico-chimique et pharmacomodulation de la radiosensibilité des cellules tumorales

L'*oxygénation* des tissus se fait à partir de l'oxygène présent dans la circulation sanguine, lié à l'hémoglobine et libéré dans l'organisme en fonction de ses besoins. L'hémoglobine sert donc de réservoir à oxygène et permet le maintien d'une pression partielle en oxygène relativement constante dans les tissus. La viabilité des cellules tumorales dépend de leur proximité par rapport aux capillaires sanguins. Si elles en sont éloignées de plus de 200 micromètres, une nécrose apparaît par hypoxie. La présence de cellules clonogènes hypoxiques, indirectement prouvée chez l'homme à ce jour [Disc91], pourrait donc être un facteur limitant potentiel de l'action des radiations ionisantes du fait de leur radiorésistance [Mala86]. Si le volume est un facteur pronostic important de l'oxygénation tumorale, celle-ci n'a pas pu être clairement corrélée à sa radiosensibilité du fait de la difficulté à en réaliser une mesure représentative. Améliorer l'oxygénation des tumeurs a néanmoins fait l'objet de nombreuses recherches visant à diminuer la proportion de cellules clonogéniques radiorésistantes. Parmi elles :

- la ventilation des patients en cours d'irradiation avec un mélange de 95% d'oxygène et 5% de CO_2 (le carbogène) ;
- l'utilisation de molécules pharmacologiques oxygénomimétiques telles que les dérivés imidazolés (malheureusement neurotoxiques) ;
- l'utilisation toujours à l'ordre du jour de faisceaux de particules à haut TEL qui ne sont pas sensibles à l'effet de l'hypoxie (historiquement les neutrons puis maintenant les ions carbonés au Japon et en Allemagne) ;
- la réoxygénation en caisson hyperbare : sous une pression de 3 atmosphères, l'oxygène sanguin est relargué de façon passive dans les tissus, augmentant ainsi les zones oxygénées autour des capillaires pour atteindre les zones hypoxiques. Ce traitement étant mal toléré par les patients, il a été au contraire envisagé de réduire la sensibilité des cellules oxygénées au même niveau que les cellules hypoxiques, en plaçant un garrot en amont de la

tumeur... Ce type d'approche est toutefois limité à un nombre restreint de localisations particulières (tumeurs des membres par exemple).

A l'opposé, l'*hyperthermie* présente un intérêt certain malgré l'extrême complexité technique de sa mise en œuvre pour le traitement des tumeurs chez l'homme. Des températures moyennement élevées ($< 45^{\circ}\text{C}$) peuvent être appliquées soit à l'ensemble du corps, soit à des régions particulières, par l'intermédiaire d'émetteurs de micro-ondes ou d'ultrasons. Si une action synergique a été montrée avec une radiothérapie concomitante pour de nombreuses localisations (cancers du sein, cervical, mélanomes, glioblastomes, tumeurs ORL) [Falk01], la relation entre l'hyperthermie et la chimiothérapie semble moins bien définie à ce jour et fait l'objet d'études fondamentales et cliniques actives. L'hyperthermie apparaît en outre comme un moyen de vaincre la chimiorésistance de certains cancers aux composés platinés [Ohts01, West01].

Enfin des *modificateurs chimiques* de radiosensibilité tumorale peuvent être utilisés. D'une manière générale la modulation de l'effet du rayonnement par des molécules doit augmenter le taux de cellules tumorales tuées sans accentuer les dommages infligés aux tissus sains afin d'espérer accroître l'index thérapeutique. Trois catégories de molécules peuvent être distinguées.

1/ *Les molécules ciblant l'hypoxie tumorale.* L'utilisation de radiosensibilisateurs mimant l'action de l'oxygène (molécules nitro-imidazolées ou fluorocarbonées) n'a pas permis à ce jour d'améliorer ni le contrôle local, ni la survie des patients atteints de tumeurs cérébrales humaines [Chang98] et sont de plus souvent neurotoxiques. Néanmoins de nombreux composés sont toujours en cours d'études [Ev01, Kasa98].

2/ *Les molécules ciblant la prolifération cellulaire.* Les analogues halogénés de pyrimidines, sont classés dans cette catégorie (BUdR, bromodeoxyuridine ; IUdR, iodo-désoxyuridine). Leur incorporation dans l'ADN pendant la division cellulaire en remplacement de la thymidine entraîne une radiopotentialisation de certains types de tumeurs (gliomes anaplasiques) [Fra01, Urta96]. Le blocage des systèmes de réparation est évoqué dans la littérature [Wang94]. La toxicité principale de ces composés est liée à leur effet photosensibilisant. Elle est moins marquée pour l'IUdR qui possède de plus une pharmacocinétique plus appropriée que celle du BUdR.

3/ *Les molécules de chimiothérapie.* Les associations chimio-radiothérapie se proposent de combiner l'action de certains médicaments cytotoxiques avec celle de la radiothérapie. Les agents médicamenteux employés (poisons de topoisomérase I et II, taxanes, sels de platine, 5fluorouracile, mitomycine C, vinorelbine, ...) présentent la

particularité d'être actifs par eux-même sur les tumeurs traitées et donc cytotoxiques. Le concept de radiosensibilisation, qui caractérise l'action d'un agent inactif à sa concentration d'usage pour augmenter la toxicité de l'irradiation, ne s'applique donc pas ici. Les arguments cliniques pour utiliser de *manière concomitante* une association chimio-radiothérapie sont les suivants [Fu85]:

- 1) la coopération spatiale ;
- 2) des modes cytotoxiques indépendants ;
- 3) une réduction des dommages aux tissus sains ;
- 4) une augmentation de la réponse tumorale.

Pendant longtemps les auteurs ont invoqué de manière convaincue qu'il devait exister des interactions biologiques entre les deux modalités thérapeutiques pour expliquer les avantages potentiels de telles associations. Ainsi, les mécanismes biologiques suivants ont été considérés comme impliqués [Fu85]: la modification de la relation dose-effets pour la survie cellulaire ; diminution de la tolérance ou de la réparation des radiolésions sublétales ; la diminution de la capacité de réparation des radiolésions potentiellement létales ; la stimulation de la prolifération cellulaire avec redistribution dans le cycle cellulaire augmentant la proportion de cellules présentes en G2-M, phase la plus radiosensible ; la diminution plus rapide de la masse tumorale permettant une réoxygénation et une remise en cycle des cellules tumorales augmentant ainsi respectivement la radiosensibilité et la chimiosensibilité ; et enfin la modulation positive de la pharmacocinétique des agents antinéoplasiques. Parmi ces mécanismes, certains ont été clairement démontrés et peuvent avoir une grande importance comme la redistribution dans le cycle cellulaire. D'autres, bien que réalisables, sont associés à des effets toxiques totalement inapplicables à la clinique, c'est le cas des inhibiteurs de la réparation des radiolésions. D'autres encore n'apparaissent que dans des conditions de doses hors des possibilités cliniques, comme par exemple les modifications pharmacocinétiques du carboplatine [Yang95b]. Enfin certains effets tout à fait insoupçonnés ont été découverts, comme la cytotoxicité augmentée des poisons de topoisomérase II lors de toute période de réparation de l'ADN dans des cellules en cycle [Balo97].

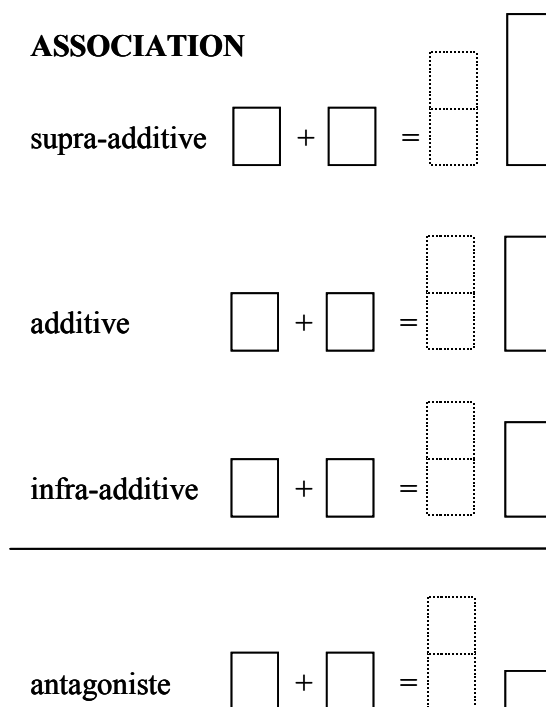


Figure II-18 : Terminologie d'évaluation de l'effet d'une association chimio-radiothérapie, d'après [Stee79]

La figure ci-dessus montre que tous les niveaux de synergie, de la supra-additivité à l'infra-additivité donnent un résultat supérieur à l'une des deux modalités, utilisée seule à son optimum. De plus, les deux niveaux d'action intermédiaires (additivité et infra-additivité) sont certainement les plus utiles en clinique dans la mesure où l'antagonisme serait défavorable et la supra-additivité trop toxique pour procurer un réel gain thérapeutique.

II.4.3.4. Exploitation de l'EBR

Les effets biologiques de certains rayonnements peuvent être nettement différents, à dose égale, de ceux des rayonnements classiques. Il s'agit essentiellement des particules à TEL élevé, dont l'EBR peut être nettement supérieure à 1. L'EBR croît avec le TEL mais comme il s'agit d'une mesure de l'efficacité du rayonnement, elle atteint un maximum qui se situe vers $100 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et décroît ensuite. Au-delà de ce TEL optimal, les particules délivrent toujours plus d'énergie sur leur trajectoire sans pouvoir augmenter leur effet biologique qui est la mort cellulaire (*overkill effect*). En pratique, l'effet biologique lié à cette augmentation de l'EBR se traduit par une disparition progressive de l'effet oxygène et une réduction progressive de l'épaule des courbes de survie et une diminution des écarts de radiosensibilité des tumeurs radiorésistantes. En quelque sorte l'augmentation de l'EBR gomme les différences de radiosensibilité et fait disparaître l'effet du fractionnement. Elle n'offre donc d'avantage théorique que pour le traitement des tumeurs dont la radiorésistance

serait supérieure à celle des tissus sains environnants les mettant ainsi hors de portée des rayonnements « classiques » à faible TEL et d'EBR égale à 1.

Historiquement les premiers rayonnements à fort TEL utilisé en radiothérapie ont été les faisceaux de neutrons rapides. Leur très mauvaise balistique en a rendu les avantages immédiatement contrebalancés par des manifestations sans indulgence de leurs effets secondaires vis à vis des tissus sains. Le cas des neutrons est un cas particulier dans la mesure où l'effet différentiel entre tissus sains et cancéreux n'est pas augmenté mais au contraire nivelé. Les indications cliniques de la neutronthérapie se sont donc réduites à des situations très particulières, où les volumes¹⁰ et les profondeurs à traiter ainsi que l'extrême radiorésistance des tumeurs¹¹ rendent acceptable les effets secondaires encourus.

Les faisceaux d'ions lourds (C^{6+} , O^{8+} , Ne^{10+} , Ar^{18+}) partagent avec les protons la propriété d'améliorer la sélectivité physique des traitements puisqu'ils présentent une distribution de dose dans les tissus équivalente : parcours en ligne droite, fin de parcours à une profondeur bien définie, et augmentation du dépôt d'énergie en fin de parcours avec un pic de Bragg. Ils se différencient néanmoins des protons par leur TEL élevé qui leur confère une grande efficacité biologique, ce qui les rapproche cette fois-ci des neutrons pour le meilleur mais pas pour le pire, grâce à leur excellente qualité balistique. Leur utilisation en radiothérapie représenterait donc un réel avantage en permettant d'utiliser leurs propriétés biologiques sans la lourde contrepartie toxique des neutrons. Cette technique séduisante de traitement des tumeurs est assez récente et est donc encore en cours d'évaluation [Lars94]. Elle nécessite des installations lourdes, telles l'HITAG allemand (Heavy Ion Therapy unit At GSI) de Darmstadt ou l'HIMAC japonais (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) capable d'accélérer toutes sortes d'ions situés entre l'hélium et l'argon dans la classification périodique jusqu'à des énergies de 800 MeV/nucléon. Quatre projets européens sont également en cours de concrétisation, notamment à Heidelberg en Allemagne, à Mirasole en Italie (CNAO) et les projets ETOILE (Espace de Traitement Oncologique par Ions Légers dans le cadre Européen) à Lyon en France et le quatrième à Stockholm en Suède.

¹⁰ grand diamètre inférieur à 15 cm dans un membre, et à 10 cm dans le tronc

¹¹ tumeur des glandes salivaires, sarcomes de bas grades, rechutes pelviennes hypoxique de cancers non irradié...

II.4.3.5. Thérapies binaires

Le terme de thérapie binaire est proposé ici pour l'ensemble des techniques bimodales associant par exemple la présence d'un composé à une irradiation très particulière. Ce sont les produits de la réaction physique du rayonnement sur le composé qui présentent une certaine toxicité pour les cellules tumorales.

II.4.3.5.1. Thérapie par capture neutronique : NCT

Le concept bimodal de la *boroneutronthérapie* (BNCT pour Boron Neutron Capture Therapy) repose sur l'exploitation des conséquences d'une interaction physique entre le rayonnement ionisant et un agent pharmacologique : il s'agit de la capture de neutrons thermiques de faible énergie (0.025 eV) peu ou pas toxiques par des atomes de bore stables (^{10}B) non toxiques. Le noyau de bore se désintègre alors et il se forme des ions hélium¹² et lithium à la place des atomes de bore, entraînant un dépôt d'énergie élevé dans les cellules, responsable de la cytotoxicité [Bart90a].

(Eq. II-24) : $^{10}\text{B} + n_{th} \rightarrow ^{11}\text{B} \rightarrow ^4\text{He} + ^7\text{Li} + 2.79 \text{ MeV (6\%)} \text{ ou } ^4\text{He} + ^7\text{Li} + 0.48 \text{ MeV } \gamma + 2.31 \text{ MeV (94\%)}$

Outre la géométrie de l'irradiation, l'effet différentiel s'appuie ici sur une concentration élevée d'atomes de bore dans les cellules tumorales et plus faible dans le tissu sain adjacent. Les composés borés doivent donc être spécifiques des cellules tumorales, et y assurer de plus une concentration intracellulaire suffisante de bore pour qu'un effet tumoricide soit possible (entre 20 et 35 μg de ^{10}B / g de tissu tumoral soit 10^9 atomes de ^{10}B par cellule [Solo94]). Le faisceau de neutron n'étant pas sélectif par lui-même et présentant une faible pénétration, il nécessitait initialement une craniotomie. L'expérience la plus importante porte sur 120 patients traités au Japon par du borocaprato de sodium (BSH) [Hata94]. Actuellement les recherches concernent la fixation d'atomes de bore à des macromolécules pour un ciblage très spécifique (anticorps, facteurs de croissance [Carl94]) et la mise au point de nouveaux composés borés (BPA : phénylalanine boratée ; BOPP : porphyrine boratée [Fair90]). L'utilisation de neutrons épithermiques (1 à 10 keV) a permis une meilleure pénétration du rayonnement, donc le traitement de tumeurs plus profondes sans craniotomie. En contrepartie la contamination du tissu cérébral sain par des neutrons rapides demeure un problème et est responsable de la toxicité de ces derniers. Il est implicite que pour ce type de thérapie, la détermination de la quantité de bore présent au moment de l'irradiation dans la tumeur est un

paramètre crucial pour l'étude de la répartition de l'énergie déposée. Il est intéressant de noter qu'actuellement les traitements par BNCT ne disposent pas tous en routine d'une méthode de dosage quantitative et *in vivo* du bore telle que celle mise récemment en oeuvre à Petten [Verb01a, Verb01b]. Le dosage est plus généralement réalisé sur du bore sanguin, prélevé à différents moments du traitement. Des données de pharmacocinétiques corrélées à un index reflétant le rapport entre la quantité de Bore présente dans la tumeur et le sang [Code98, Fuku99, Kage97], permettent d'obtenir *post-traitement* une estimation de la dose délivrée. Cette technique est une alternative à la ponction d'un échantillon tumoral de chaque patient pour dosage de son contenu en bore. Si des tentatives d'utilisation de l'IRM pour mesurer les quantités de bore intra-tumorales ont été rarement décrites [Brad97], l'intérêt du Gadolinium a été plus d'une fois évoqué. L'association du Bore aux complexes de Gadolinium est envisagée à des fins d'imagerie [Gira97] et de thérapie [Zhao97]. En effet le potentiel thérapeutique du gadolinium est loin d'être négligeable puisque l'affinité du ^{157}Gd pour la capture neutronique est 66 fois plus importante que le ^{10}B [Shih92]. Néanmoins si les produits de la capture neutronique par le gadolinium conduit essentiellement à des γ et des électrons Auger, ceux-ci ne peuvent être efficaces du fait de la localisation extracellulaire des complexes usuels de gadolinium [Ber97]. La plus grande pénétration des γ en GdNCT (70 μm environ soit 10 fois plus que les particules α et ^7Li) peut toutefois être considérée comme un avantage pour le traitement des tumeurs larges, dont la partie centrale nécrosée, non irriguées par les voies sanguines, est inaccessible par les agents pharmacologiques. La Gd-BNCT évoquée précédemment tente ainsi de regrouper les propriétés des deux agents qui agissent de manière complémentaire à des niveaux différents. L'exploration des possibilités de la NCT est donc loin d'être achevée et reste une technique révolutionnaire de traitement possiblement intéressante pour les tumeurs cérébrales [Bart90b].

II.4.3.5.2. Effet Mössbauer

L'effet Mössbauer a également été proposé pour augmenter la quantité de dommages létaux aux tumeurs. Le phénomène physique sous-jacent est la manipulation des conditions de résonance pour les transitions nucléaires, dont les spectres d'absorption et d'émission peuvent drastiquement différer. Ces spectres sont sensiblement affinés lorsque les noyaux émetteurs ou récepteurs sont piégés dans des structures cristallines, qui empêchent tout phénomène de recul ou effet Doppler et donc les élargissements de raies spectrales correspondants [Cagn75].

¹² particules α

Ces phénomènes de résonance Mössbauer nécessitent une parfaite similitude des niveaux d'énergies des noyaux émetteur et récepteur, et par conséquent de leur environnement chimique. Une différence est néanmoins compensable par la mise en mouvement de l'émetteur. Ainsi des atomes stables de ^{57}Fe solidement liés à de l'ADN via une molécule de bléomycine (agent de chimiothérapie anticancéreuse) peuvent être excités en résonance par les rayons γ de 14.4 keV du noyau de ^{57}Fe excité, isotope Mössbauer issu de la capture électronique du ^{57}Co , fixé sur une matrice en mouvement. Ainsi de très faibles doses de rayonnement (10^{-5} Gy) ont été nécessaires in vitro pour obtenir le même effet que 5 Gy de rayonnement classique [Mill88]. Des simulations ont montré que la cascade d'électrons Auger émis par conversion interne suite à l'absorption résonante par le ^{57}Fe stable est responsable du gain de radiotoxicité observé. Ce sont notamment les électrons Auger d'énergie inférieure à 100 eV qui créent le plus de cassures double-brins, par effet direct sur l'ADN [Terr99]. Néanmoins le bénéfice que pourrait apporter ce type de thérapie, bien que conceptuellement très satisfaisant [Humm88b], ne semble pas accessible en clinique tant sont faibles et donc peu pénétrantes les radiations mises en œuvre pour produire le phénomène physique évoqué [Bren89]. Cette technique n'a pas, à notre connaissance, été mis en pratique chez l'homme.

II.4.3.5.3. Thérapie par renforcement de l'effet photoélectrique

Même s'ils ne parlaient au début des années 1970 que de *Photon Capture Therapy*, Tisjlar et Feinendegen ont été les précurseurs de ce qui a été communément appelé « *thérapie par activation photonique* » [Tisl73, Tisl77]. Leur idée est originale : il s'agit d'induire par irradiation externe un effet Auger au niveau d'éléments lourds incorporés dans l'ADN de cellules tumorales. A l'instar de Pierre Auger, qui provoquait un demi-siècle plus tôt des cascades électroniques par stimulation photonique basse énergie, ils choisissent donc d'utiliser des éléments stables et de rechercher l'énergie optimale de l'irradiation externe pour provoquer le plus de dégâts biologiques possibles. L'utilisation de composés stables (et non plus radioactifs) permettrait d'éviter les problèmes liés à la circulation des isotopes radioactifs dans l'ensemble du système sanguin. Un fait apparaît clairement : la probabilité de provoquer des cascades Auger est maximale lorsque l'irradiation externe possède une énergie juste supérieure au seuil d'absorption K de l'élément lourd utilisé. Cette constatation se heurte à des difficultés techniques, liés aux caractéristiques des générateurs de rayons X conventionnels : ces derniers, émetteurs de spectres continus de rayons X de freinage grâce à l'interposition d'une cible de numéro atomique élevée dans un flux d'électrons arrachés à un

filament chauffé, ne disposent plus d'une intensité suffisante pour produire des effets biologiques notables si des cristaux sont interposés dans le faisceau pour le rendre monochromatique.

Néanmoins, des faisceaux polychromatiques comme source d'irradiation externe ont tout de même été utilisés [Mil87a, Mil87b, Nath87], et ont montré que l'orthovoltage (tube à rayons X de tension d'alimentation comprise entre 50 à 250 kV) était plus favorable à la radiosensibilisation de cellules dopées en éléments lourds que les rayons gamma du cobalt 60 (1,25 MeV) par exemple. La contribution positive de l'effet photoélectrique était donc probable.

Néanmoins les processus de dépôt d'énergie mis en jeu dans des faisceaux polychromatiques sont difficilement discernables et nous poussent à la question suivante : les phénomènes observés étaient-ils provoqués par une éventuelle cascade Auger (dont la probabilité est faible puisque c'est essentiellement de la fluorescence qui est produite dans les matériaux dont le Z est supérieur à 50) ou bien tout simplement par les photoélectrons émis suite à l'interaction primaire des photons incidents avec le composé de numéro atomique élevé ? [Karn99]

Les travaux de l'équipe de Norman lèvent une partie de cette confusion en étudiant l'effet de l'incorporation d'un agent de contraste sur l'augmentation du dépôt d'énergie par des rayons X issus d'un scanner conventionnel, légèrement modifié pour pouvoir collimater le faisceau sur le volume à irradier [Iwam90]. Leurs travaux ont débuté en 1978 par la constatation que la prise de contraste des tumeurs en scanner conventionnel [Mell83, Nor78] était le siège d'une plus grande atténuation du rayonnement X, donc d'une plus grande absorption de son énergie [Mell83, Nor78]. Par la suite ces recherches ont progressivement évolué vers le traitement de patients [Rose94, Rose99], après de nombreuses études précliniques [Iwam87, Iwam93, Norm97] et simulations théoriques [Solb92a, Solb95]. Leur technique nommée CTRx (*Computed Tomography Radiotherapy*) présente de plus l'avantage d'imager en temps réel la tumeur, ce qui est actuellement un atout majeur. Une échelle de calibration du scanner a été réalisée ; elle permet de relier expérimentalement l'information contenue dans les pixels de l'image CT, réputée résolue en densités électroniques, aux concentrations d'agent de contraste présent dans la tumeur. Cette donnée est nécessaire à la planification dosimétrique du traitement. Cette technique CTRx n'a été malgré tout que très peu diffusée, seules deux équipes, l'une anglaise [Daws87], l'autre japonaise [Mats80], ont confirmé l'approche de Amos Norman sans toutefois s'y attarder. L'approche réalisée par

cette équipe, même si elle est indéniablement efficace, semble en effet reposer sur un double manque d'optimisation :

- d'abord *biologique*, puisque les agents de contraste, en raison de leur localisation extracellulaire, sont bien moins efficaces à *concentrations égales* que les agents pénétrants dans l'ADN. Les électrons Auger ne peuvent donc pas contribuer à une augmentation de létalité. Ce point est néanmoins discutable puisque à l'opposé cette approche permet de s'affranchir des nombreux problèmes de vectorisation des émetteurs Auger dans l'ADN puisqu'il est *a priori* biologiquement beaucoup plus aisé de parvenir à charger une tumeur cérébrale par des quantités non négligeables d'agent de contraste que par des quantités mêmes infimes d'éléments lourds dans son ADN ;
- *physique* ensuite, car le rayonnement X polychromatique, bien qu'efficace pour générer des interactions de type photoélectrique, n'est pas optimal et de nombreux photons irradient le patient sans apporter un quelconque gain à l'énergie déposée, du fait de la diffusion et de l'absorption des plus faibles énergies du spectre. L'intérêt d'utiliser un rayonnement monochromatique pour optimiser la quantité d'énergie délivrée après interaction photoélectrique, a été pressenti par cette même équipe [Solb01, Solb92b] et par la nôtre [Elle01].

Il reste donc un vaste domaine sur l'effet de la stimulation d'éléments lourds, au mieux incorporés le plus proche possible de l'ADN pour tirer parti des cascades Auger, par une source de photons monochromatiques, gamma par exemple [Halp74, Halp78, Nath90]. L'idée est séduisante en soi puisqu'elle ouvre le champ à de nouvelles approches, en curiethérapie par exemple. L'effet différentiel entre les tissus sains et tumoraux pourrait ainsi être doublement augmenté, à la fois grâce à la restriction anatomique de la curiethérapie (évoquée au § II.4.3.1.1) et au renforcement de l'effet photoélectrique ; encore faut-il trouver le radio-isotope idéal, c'est à dire émettant des photons gamma capables de provoquer un maximum d'interactions sur l'atome ciblé, ce qui restreint le champ des couples (émetteur-récepteurs) préférentiels possibles sans toutefois l'annihiler. Cette technique a été proposée par certains auteurs, avec par exemple une source de Samarium émettant des photons de 40 keV, idéale pour la stimulation photoélectrique de l'iode au-dessus de son seuil K [Fair87b, Last92a]. D'autres possibilités existent, telle l'exploitation des γ de 28 keV de l'iode 125 pour exciter sélectivement des atomes d'indium au-delà de leur seuil K ou encore l'utilisation du ^{103}Pd en association aux atomes de bore stables (seuil K = 13.5 keV) [Last01]. L'utilisation en routine des grains d'iode 125 pour les curiethérapies de prostate offre à cette technique de renforcement de la dose absorbée un avenir possible : si l'argent s'est avéré être un bon

renforceur d'effet photoélectrique [Youn99], les simulations réalisées avec de l'iode, du gadolinium ou du lutécium donnent des résultats tout aussi probants [Norm99].

Le rayonnement synchrotron semble néanmoins s'imposer comme outil de recherche idéal dans ce type d'approche, puisque son flux photonique demeure exceptionnellement élevé même après interposition dans le faisceau de cristaux permettant le choix d'une longueur d'onde particulière. Dans les diverses installations mondiales de rayonnement synchrotron, des études préliminaires de thérapie par activation photonique ont tout naturellement été menées [Maez88, Shin84, Usam91]. Les résultats obtenus sur cultures cellulaires après incorporation de iodo-désoxyuridine dans l'ADN des cellules, irradiées à 33,4 keV, juste en dessus du seuil d'absorption K de l'iode, ont montré une augmentation de la cytotoxicité d'un facteur 3 par rapport aux cellules contrôles [Last93] ce qui est dans un sens encourageant mais décevant par rapport aux estimations théoriques de l'effet attendu [Fair84, Mil87b]. D'autre part, les analogues de thymidine halogénés (iodés ou bromés) ne sont plus les seuls agents pharmacologiques étudiés : des recherches diverses ont été menées avec d'autres éléments cibles, tels que l'indium [Jöns96], le brome [Last92b], le platine [LeSe01] ou encore le phosphore et le calcium intracellulaires [LeSe96, Maez99], potentiellement très intéressants car l'effet Auger est le mode de désexcitation prédominant des éléments légers. Cette dernière approche sera néanmoins forcément limitée à la fois par son manque de sélectivité (les éléments naturels ciblés sont présents dans toutes les cellules, saines et cancéreuses, sans restriction) et par les énergies des rayonnements employés, trop peu pénétrants pour une éventuelle application clinique (< 10 keV). A ce jour et à notre connaissance, l'induction photonique externe de cascades d'électrons Auger n'a pas encore clairement montré son efficacité *in vitro* dans la totalité des travaux réalisés. Le manque d'adéquation entre les effets attendus et trouvés, mêlé à l'évident manque de disponibilité des sources de rayonnement synchrotron mondiales, laissent de plus percer un certain sentiment de déception dans la littérature [Humm88a, Humm88b, Mil87b], qui aurait pu et a bien failli décourager les derniers arrivants dans le domaine [Cord01] ! Cependant, l'existence même de cette thèse prouve que nous avons trouvé un réel intérêt à cette thématique que nous avons introduite à l'ESRF. Nos résultats, comme souvent en recherche, nous ont surpris et semblent ouvrir des perspectives fondamentales et appliquées très intéressantes.

II.4.3.6. Propositions pour la radiothérapie par rayonnement synchrotron

Dans le cadre de cette thèse nous proposons d'utiliser le rayonnement synchrotron pour augmenter l'effet différentiel entre les tissus sains et tumoraux. A ce jour celui-ci n'a

encore jamais été utilisé chez l'homme pour traiter des cancers mais un certain nombre d'études ont été réalisées dans cette perspective, axées soit sur le très grand flux et la très grande cohérence du faisceau synchrotron [Slat92], soit sur sa monochromaticité [Fair84]. L'originalité de notre travail repose sur une approche transversale combinant les trois méthodes évoquées précédemment :

1/ la *restriction anatomique* puisque nous avons tout d'abord participé à l'élaboration d'une méthode d'irradiation basée sur un système d'imagerie en temps réel permettant l'obtention *in vivo* des cartographies tumorales résolues en concentration d'agents de contraste ; ce système peut être utilisé pour la planification dosimétrique perçu comme l'outil d'une irradiation à visée thérapeutique, qui nécessiterait la parfaite connaissance des concentrations absolues d'agent de contraste intratumoral ;

2/ cet agent de contraste, dont la distribution tumorale est parfaitement quantifiée, a ensuite été pris comme cible d'une *thérapie binaire* dans laquelle il joue le rôle de rehausseur de contraste photoélectrique ; nous avons mesuré *in vitro* le gain de radiotoxicité des rayons X monochromatiques synchrotron, en fonction de leur énergie et vérifié la notion d'énergie optimale;

3/ une optimisation de l'irradiation à l'échelle sub-cellulaire a été développée pour tenter d'exploiter la toxicité des électrons Auger: en véhiculant des atomes lourds dans l'ADN des cellules nous avons modifié les systèmes de réponse cellulaire à l'irradiation et ainsi rajouté au point précédent un aspect de *radiopotentialisation* des cellules tumorales.

Ces trois aspects constituent les trois principales parties du chapitre des résultats.

III. PROBLEMATIQUE DE LA THESE : OPTIMISER L'INTERACTION PHOTOELECTRIQUE DES RAYONS X SYNCHROTRON AVEC UN ELEMENT LOURD

Ce chapitre a pour but de préciser les raisons physiques qui ont conduit au choix des atomes lourds utilisés comme cibles du rayonnement X monochromatique dont l'énergie devait être précisée mais ne pouvait excéder 100 keV. Cette énergie limite, qui peut sembler basse pour une éventuelle application thérapeutique, permet néanmoins de travailler dans une gamme d'énergie où l'effet photoélectrique est largement prédominant. Ce type d'interaction est potentiellement intéressant pour la radiothérapie anticancéreuse dans la mesure où il demeure l'*unique* mode d'interaction rayonnement-matière où la totalité de l'énergie du photon incident est libérée en un seul point du matériau. De plus la très forte dépendance de sa probabilité d'apparition avec le numéro atomique de l'absorbant (cf. § II.1.1.3) permet d'envisager un renforcement de cet effet grâce à des agents pharmacologiques porteurs d'atomes lourds, qui auraient la propriété de se concentrer au niveau des cellules cancéreuses. Tout comme pour la BNCT (cf. § II.4.3.5.1), la contrainte liée à ce genre d'approche en thérapie est de rendre nécessaire la mesure *in vivo* et en temps réel, des distributions

quantitatives de ces agents afin de pouvoir calculer de manière prévisionnelle la dose de rayonnements délivrée.

Le choix des paramètres expérimentaux (éléments lourds renforçateurs de l'effet photoélectrique, énergie d'irradiation) a fait l'objet de plusieurs compromis, basés certes sur des critères de sélection physique, mais également biologique, pharmacologique et pharmacotoxicologique. Il devait être en outre absolument compatible avec un usage *in vivo*. Le choix a donc été finalisé sur des critères de disponibilité sur le marché d'agents pharmacologiques adaptés à ces contraintes. Certains agents non encore commercialisés ont néanmoins pu être obtenus grâce à la collaboration d'industriels, tels que les laboratoires Guerbet et Schering.

Notre travail d'optimisation physique a reposé sur trois objectifs qui se distinguent par leur finalité, mais qui correspondent en réalité à trois niveaux d'approche différents de l'effet photoélectrique lui-même.

III.1. RENFORCER SELECTIVEMENT L'EFFET PHOTOELECTRIQUE POUR AUGMENTER LE SIGNAL RADIOLOGIQUE

L'effet photoélectrique induit avant tout une atténuation du rayonnement primaire. Nous avons évoqué au paragraphe §II.1.1.3 la très forte dépendance de cette atténuation avec l'énergie du rayonnement, et surtout le numéro atomique Z du matériau traversé. Pour des énergies d'irradiation inférieures à 500 keV l'introduction d'un composé à Z élevé dans les tissus à imager permet d'améliorer nettement le contraste radiologique, grâce à la différence d'absorption photonique entre ces éléments et l'eau des milieux biologiques.

III.1.1. Seuils d'absorption photoélectrique : première approche

Pour les matériaux légers comme l'eau le coefficient massique d'atténuation par effet photoélectrique présente une décroissance régulière lorsque l'énergie des photons incidents augmente. Sa représentation sur un graphique en échelle log-log conduit à une courbe d'allure linéaire, signifiant que l'atténuation photoélectrique varie en E^{-n} , où E est l'énergie photonique et n la pente de la droite. En considérant à présent l'allure des variations du coefficient massique d'atténuation totale pour des matériaux de Z élevé (Figure III-1) des discontinuités apparaissent. Celles-ci matérialisent le moment où le photon possède exactement l'énergie nécessaire pour éjecter un électron bien particulier du cortège électronique de l'atome cible. Ces discontinuités, encore appelées seuils d'absorption,

caractérisent totalement le matériau traversé puisque les valeurs des énergies de liaison des électrons des atomes sont uniques. En considérant tout d'abord les plus hautes énergies, le premier seuil correspond à l'éjection de l'électron le plus lié, l'électron K. Pour les énergies supérieures à ce seuil, l'électron K est éjecté et pour les énergies inférieures, il ne peut pas l'être, par manque d'énergie du photon incident. Ainsi la discontinuité peut être interprétée par le fait que la probabilité d'interaction du photon augmente brusquement lorsque son énergie correspond exactement à l'énergie de liaison d'un électron du cortège électronique du matériau irradié. Il en est de même pour les autres énergies de liaison : au-dessus de l'énergie correspondant à la discontinuité L_I , des électrons L_I , L_{II} , L_{III} , M et moins liés peuvent être éjectés tandis qu'en dessous les électrons de la sous-couche L_I ne sont jamais éjectés. Il est intéressant de noter qu'au passage d'un seuil, la section efficace d'éjection des électrons autres que celui de la sous-couche concernée par le seuil ne varie pas. Ainsi juste en dessous et au-dessus du seuil K, la probabilité d'éjecter des électrons L_I est à peu près identique. La discontinuité correspond donc uniquement à la contribution des électrons K.

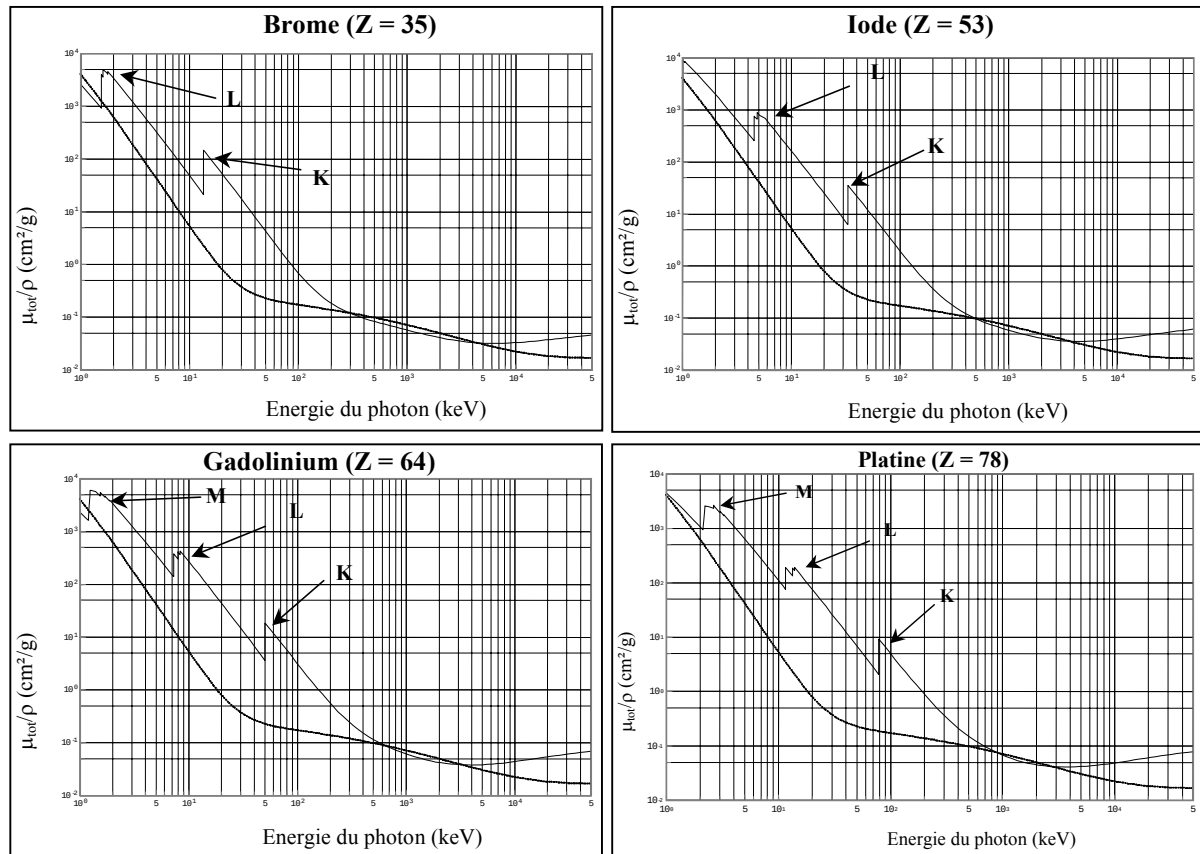


Figure III-1 : Variation en fonction de l'énergie des photons incidents des coefficients d'atténuation totale du brome, du gadolinium, de l'iode et du platine. Comparaison avec l'eau liquide. Source : [Nowo98]

Comme illustré sur les figures Figure III-1, ces discontinuités apparaissent à des énergies d'excitation différentes selon le type de matériau traversé. De plus l'amplitude des

discontinuités (qui peut être considérée comme un gain subit dans la probabilité d'interaction entre le photon et le matériau) dépend également du Z du milieu, mais aussi de la couche électronique considérée.

III.1.2. Caractérisation des discontinuités des éléments

Les discontinuités des variations des coefficients massiques d'atténuation totale des éléments ont été caractérisées de deux manières différentes : d'abord pour l'élément pur, de part et d'autre de son seuil et ensuite en comparant les caractéristiques d'absorption de l'élément lourd par rapport à celles de l'eau.

III.1.2.1. Comparaison pour des énergies voisines situées de part et d'autre de la discontinuité

L'amplitude des discontinuités du coefficient massique d'atténuation totale a été évaluée pour les sous-couches K, L_I, L_{II} et L_{III}, pour l'ensemble des éléments de la classification périodique compris entre $Z=11$ (sodium) et $Z=92$ (uranium) (Figure III-2). Il apparaît clairement que pour un élément donné, l'augmentation absolue du coefficient massique d'atténuation totale est d'autant plus favorable que le photon possède une énergie légèrement supérieure au seuil des électrons les moins liés. Ceci est principalement dû à la plus grande valeur du coefficient massique d'absorption totale aux faibles énergies (cf. Figure III-1).

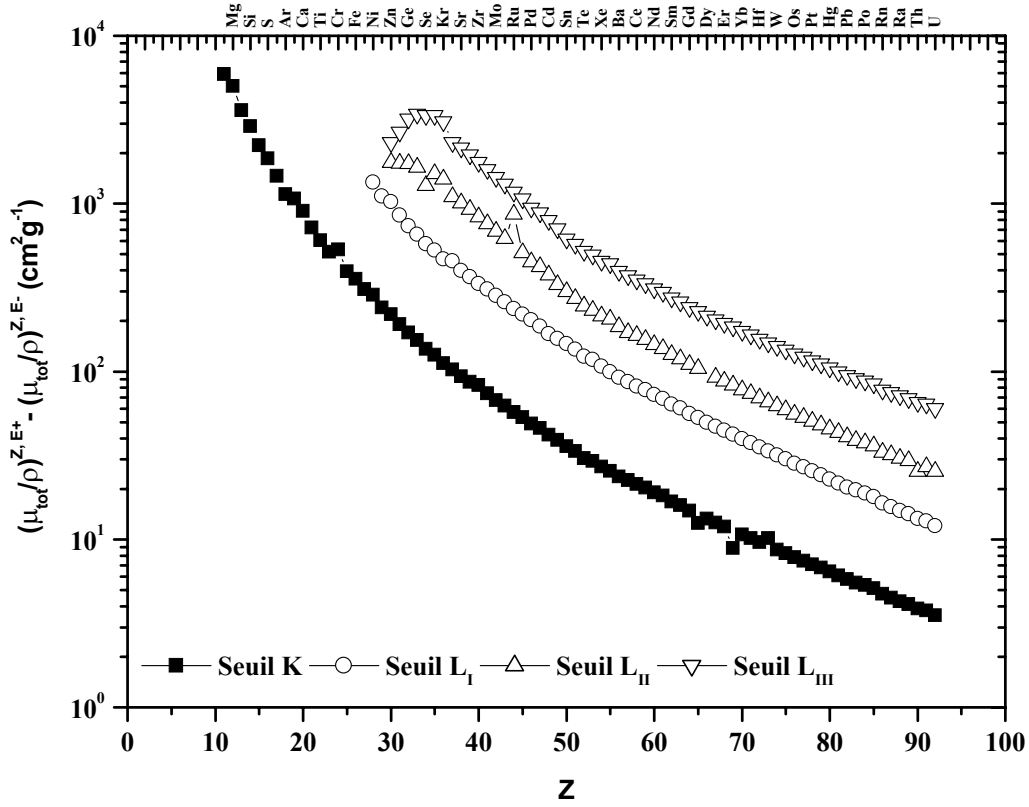


Figure III-2 : Amplitude des discontinuités K , L_I , L_{II} , L_{III} du coefficient massique d'atténuation totale des différents éléments entre $Z = 11$ et 92 d'après [Hubb97]

Par contre, si pour caractériser le gain de probabilité de réaction, nous considérons à présent le rapport entre le coefficient massique d'atténuation totale juste au-dessus et juste en dessous des seuils K , L_I , L_{II} et L_{III} des différents éléments, il apparaît que ce sont au contraire les couches les plus liées qui sont les plus favorables (Figure III-3). Ainsi pour l'ensemble des éléments un photon possédant une énergie légèrement supérieure au seuil K possède une probabilité d'être absorbé 4 à 12 fois plus élevée qu'un photon d'énergie légèrement inférieure. Par contre ce facteur n'excède pas 2 pour les couches L_I et L_{II} et se situe entre 2 et 5 pour la couche L_{III} .

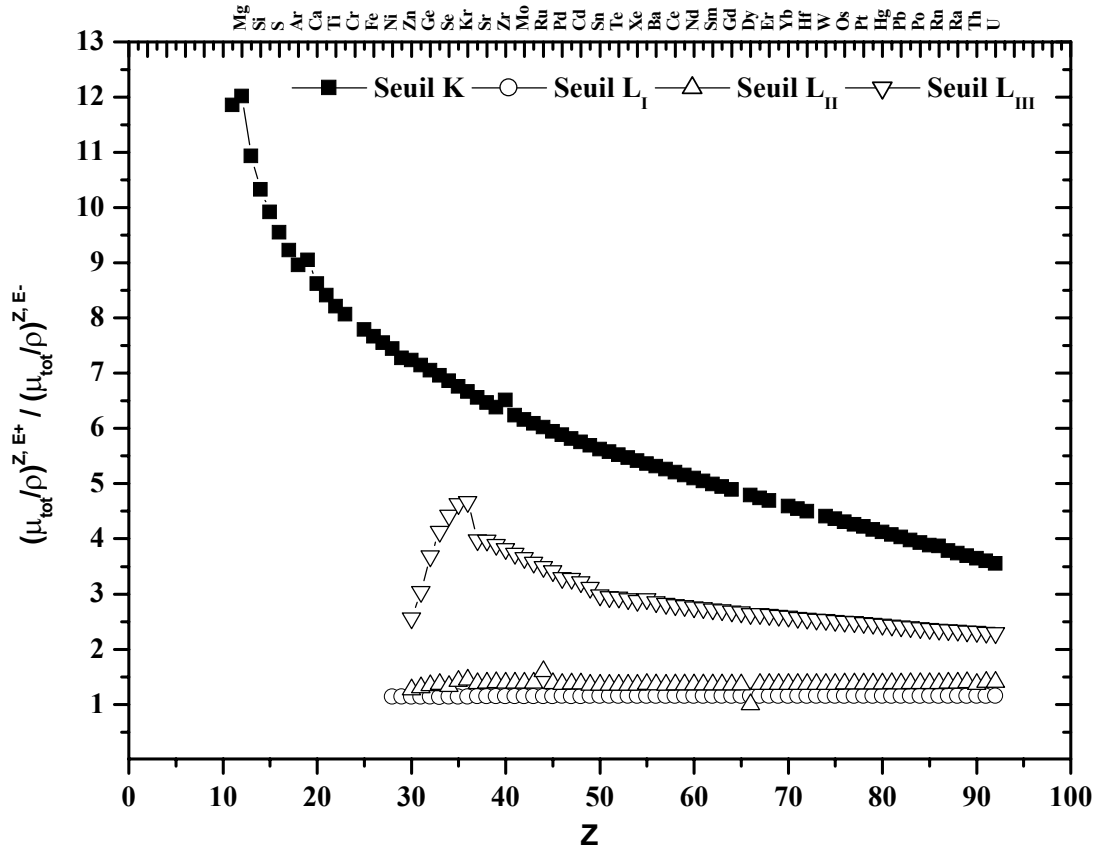


Figure III-3 : Gain du coefficient massique d'atténuation totale au passage des seuils K, L_I, L_{II}, L_{III} pour les différents éléments entre Z = 11 et 92 d'après [Hubb97]

Par ailleurs, l'amplitude des discontinuités ainsi que le gain d'atténuation totale à leur passage décroissent lorsque le numéro atomique de l'élément considéré augmente. Parmi les éléments lourds, ce sont donc les éléments les plus légers qui contribuent le plus efficacement à l'atténuation du faisceau primaire lorsque l'énergie de celui-ci traverse un seuil. Par exemple le passage du seuil K du brome permet d'atténuer 6.7 fois plus les photons d'énergie légèrement supérieure, contre 5.46 pour l'iode, 4.9 pour le gadolinium et 4.2 pour le platine.

III.1.2.2. Comparaison avec l'atténuation de l'eau

L'eau, en tant qu'élément léger, voit la contribution de l'effet Compton devenir dominante à des énergies plus faibles que les éléments lourds (Figure II-4 p. 17). Cette contribution précoce de la diffusion Compton modifie l'allure de la variation, en fonction de l'énergie des photons incidents, du coefficient massique d'atténuation totale de l'eau par rapport aux éléments plus lourds. Le ralentissement de la diminution du coefficient d'atténuation totale, observé dès 20 keV pour l'eau, est reculé à des énergies de l'ordre de 500 keV pour les matériaux lourds, du fait de la très large prédominance de l'effet photoélectrique

aux énergies moindres (cf. Figure III-1 p. 67). Il est donc important de se questionner non plus sur l'apport absolu de l'élément lourd en terme de renforcement d'effet photoélectrique, mais également sur le bénéfice gagné en terme d'absorption par rapport à l'eau ou, de manière plus générale, aux tissus biologiques.

Dans cette optique, l'énergie optimale pour maximiser une différence d'absorption avec l'eau pure, est celle situé juste au-dessus des seuils d'absorption. La décroissance monotone des coefficients d'atténuation totale au-delà semblait à première vue indiquer que cette énergie était à priori la plus favorable à un renforcement maximal de l'effet photoélectrique par rapport à l'eau. La figure suivante illustre la variation des coefficients massiques d'atténuation totale de quelques éléments lourds rapportés à celui de l'eau, pour des photons incidents compris entre 1 et 500 keV (cf. Figure III-4). Si l'énergie située juste au-dessus des seuils K de ces éléments semblent en effet optimale pour renforcer l'absorption des photons par rapport à l'eau pure, cette constatation ne s'applique pas exactement pour les seuils L puisqu'un optimum apparaît à des énergies supérieures. Ce maximum se rapproche de l'énergie située juste en dessus du seuil L lorsque le numéro atomique de l'élément lourd augmente. Il apparaît également sur ces figures qu'une gamme d'éléments semble meilleure que les autres pour obtenir un maximum d'atténuation par rapport à l'eau après passage du seuil K : les échelles des axes des ordonnées de ces 6 figures étant identiques, l'argent et l'iode s'avèrent plus efficaces que les 4 autres éléments illustrés pour absorber les photons d'énergies supérieures à leur seuil K préférentiellement à l'eau. Les gains des seuils L augmentent quant à eux progressivement avec le numéro atomique de l'élément, pour arriver à surpasser les seuils K dès que Z est supérieur à 70.

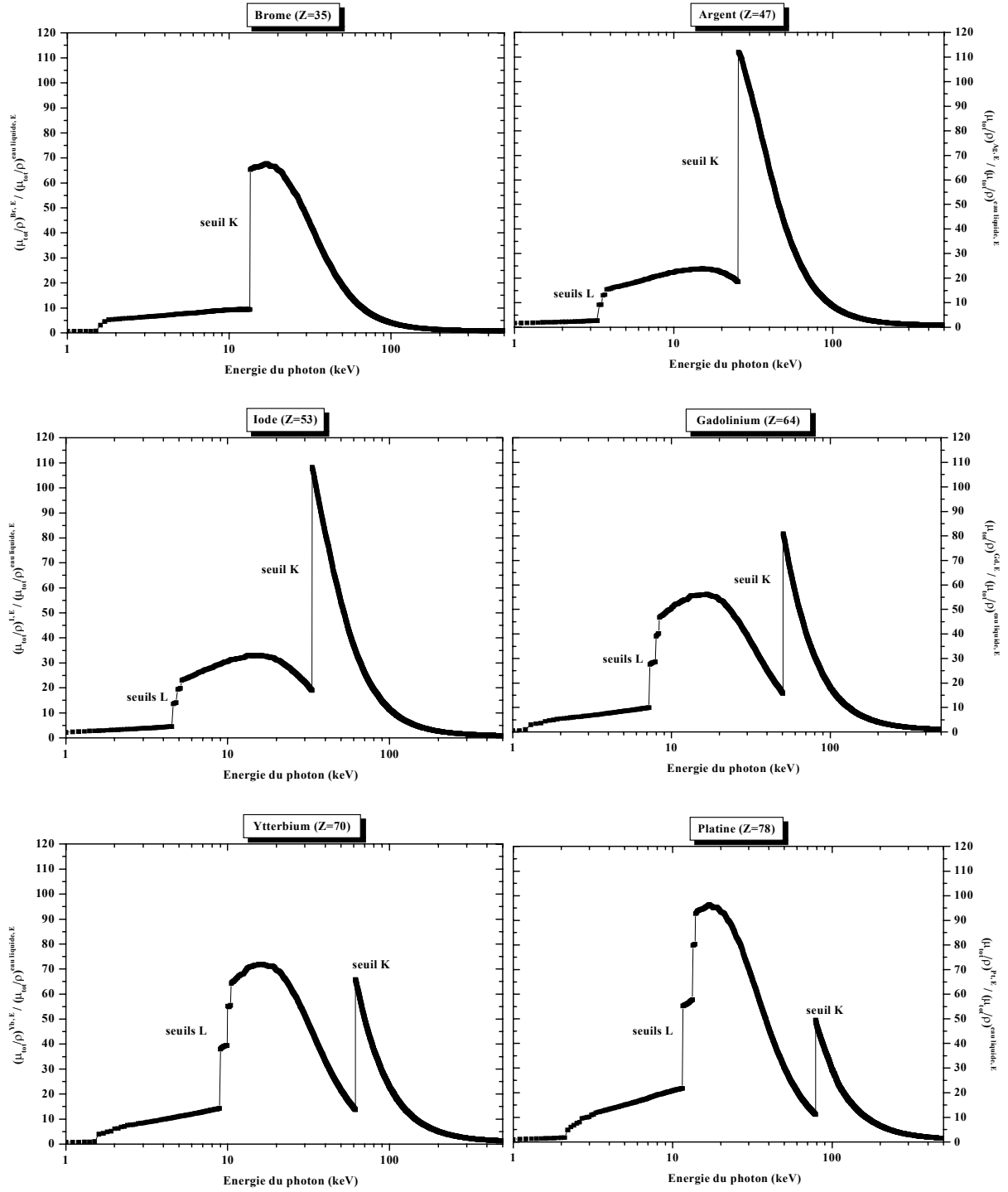


Figure III-4 : Facteurs d'augmentation du coefficient massique d'atténuation totale de 6 éléments purs (Br, Ag, I, Gd, Yb, Pt) par rapport à l'eau, pour des photons d'énergie comprise entre 1 et 500 keV

L'énergie située juste en dessus des seuils K, L_I, L_{II} et L_{III} a toutefois été choisie comme étant la plus favorable pour obtenir une absorption maximale par rapport aux tissus biologiques équivalents eau.

Les différences des coefficients massiques d'atténuation totale par rapport à l'eau ont été évaluées pour les sous-couches K, L_I, L_{II} et L_{III} pour l'ensemble des éléments de la classification périodique compris entre Z=11 (sodium) et Z=92 (uranium) (Figure III-5). Il y apparaît clairement que pour un élément donné, l'augmentation relative à l'eau du coefficient massique d'atténuation totale est d'autant plus favorable que le photon possède une énergie légèrement supérieure au seuil des électrons les moins liés (sous-couches L). Comme évoqué au paragraphe précédent, ceci s'explique par la plus grande valeur du coefficient massique d'absorption totale aux faibles énergies.

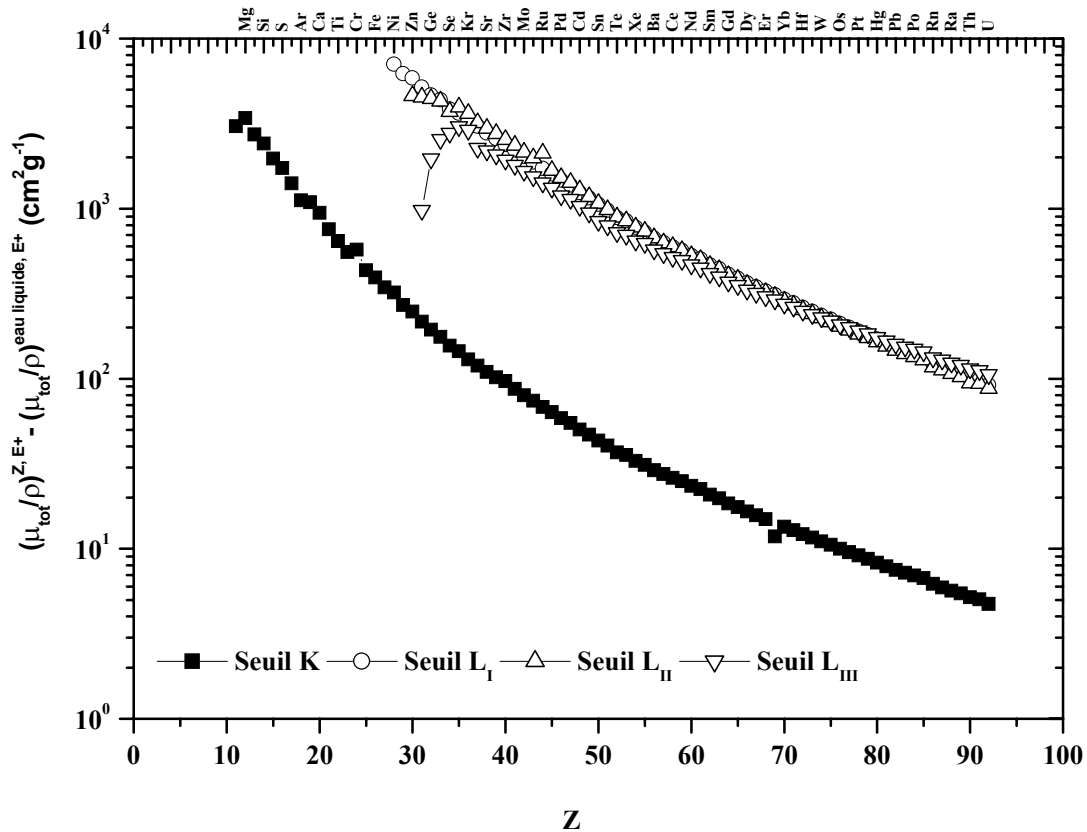


Figure III-5 : Différence entre les coefficients massiques d'atténuation totale des différents éléments ($Z = 11-92$) et l'eau liquide, pour une énergie photonique située juste au-dessus des seuils K, L_I, L_{II}, L_{III} d'après [Hubb97]

L'étude du rapport entre le coefficient massique d'atténuation totale juste au-dessus des seuils K, L_I, L_{II} et L_{III} des différents éléments comparé à celui de l'eau confirme les constations partiellement réalisées au vue de la Figure III-4 ci-dessus. Ainsi une gamme d'éléments comprise entre $Z = 35$ et 55 affiche un maximum d'atténuation par rapport à l'eau

des photons dont l'énergie est juste supérieure à leur seuil K (Figure III-6). Le maximum se situe pour l'indium ($Z = 49$) qui possède une probabilité d'absorber des photons de 28 keV 113 fois plus élevée que pour l'eau. Les sous-couches L_I et L_{II} sont légèrement plus efficaces que la sous-couche L_{III} pour augmenter la probabilité d'absorption par rapport à l'eau. L'efficacité des couches L augmente régulièrement avec le numéro atomique du matériau et dépasse celle de la couche K pour les éléments les plus lourds ($Z > 75$). La couche K demeure néanmoins 6.5 fois plus performante que les couches L pour renforcer l'absorption des photons autour de $Z = 49$.

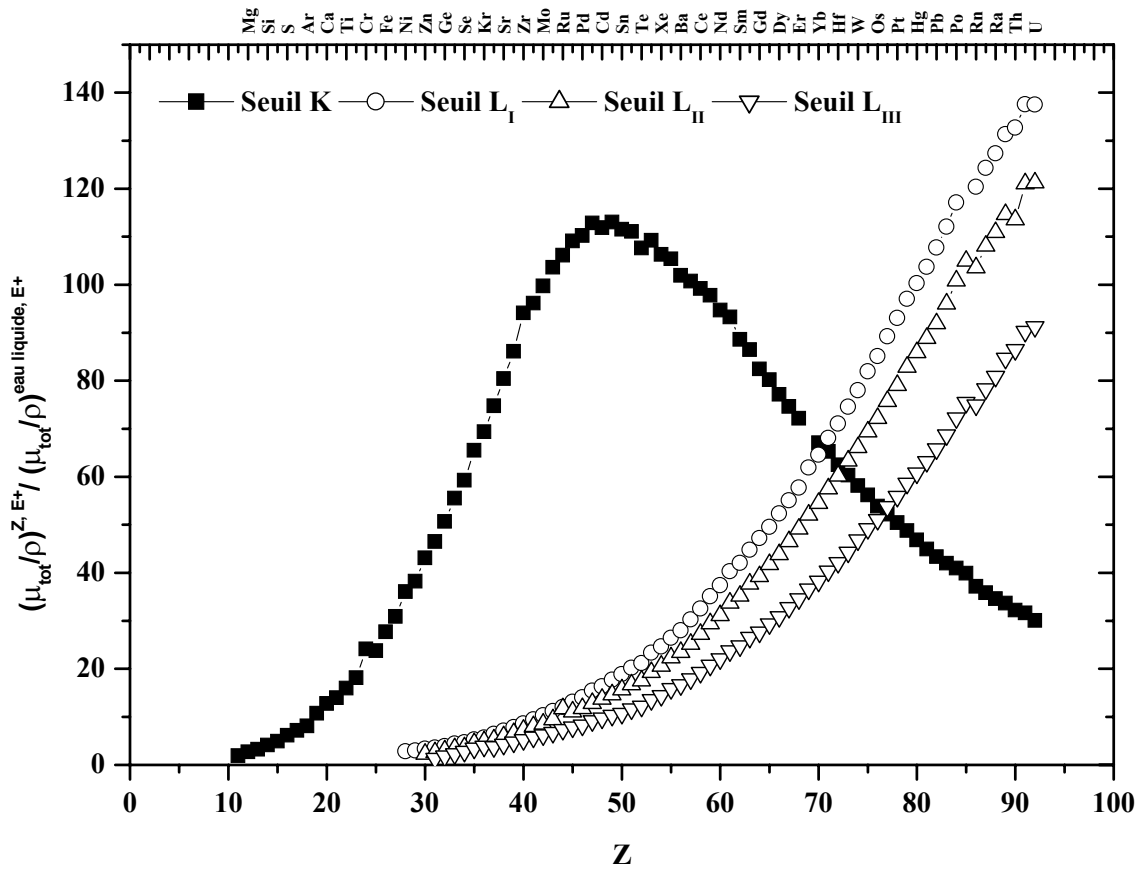


Figure III-6 : Gain du coefficient massique d'atténuation totale au-dessus des seuils K, L_I , L_{II} , L_{III} pour les différents éléments entre $Z = 11$ et 92 par rapport à l'eau liquide d'après [Hubb97]

III.1.3. Pouvoir de pénétration dans les milieux biologiques

La capacité des rayonnements photoniques à pénétrer suffisamment dans les milieux biologiques est un paramètre important pour le choix du seuil et de l'élément lourd cible de l'interaction photoélectrique.

III.1.3.1. Énergies d'excitation des seuils

Les énergies des seuils d'excitation des discontinuités K, L_I, L_{II}, et L_{III} des éléments dont le numéro atomique est compris entre 11 et 92 sont représentées ci-dessous (Figure III-7). Les énergies d'excitation des différents seuils sont d'autant plus importantes que le matériau est lourd. Globalement les couches électroniques L possèdent une énergie d'excitation comprise entre 0.030 et 10 keV. Les énergies de liaison des couches K se répartissent entre 1 et 100 keV.

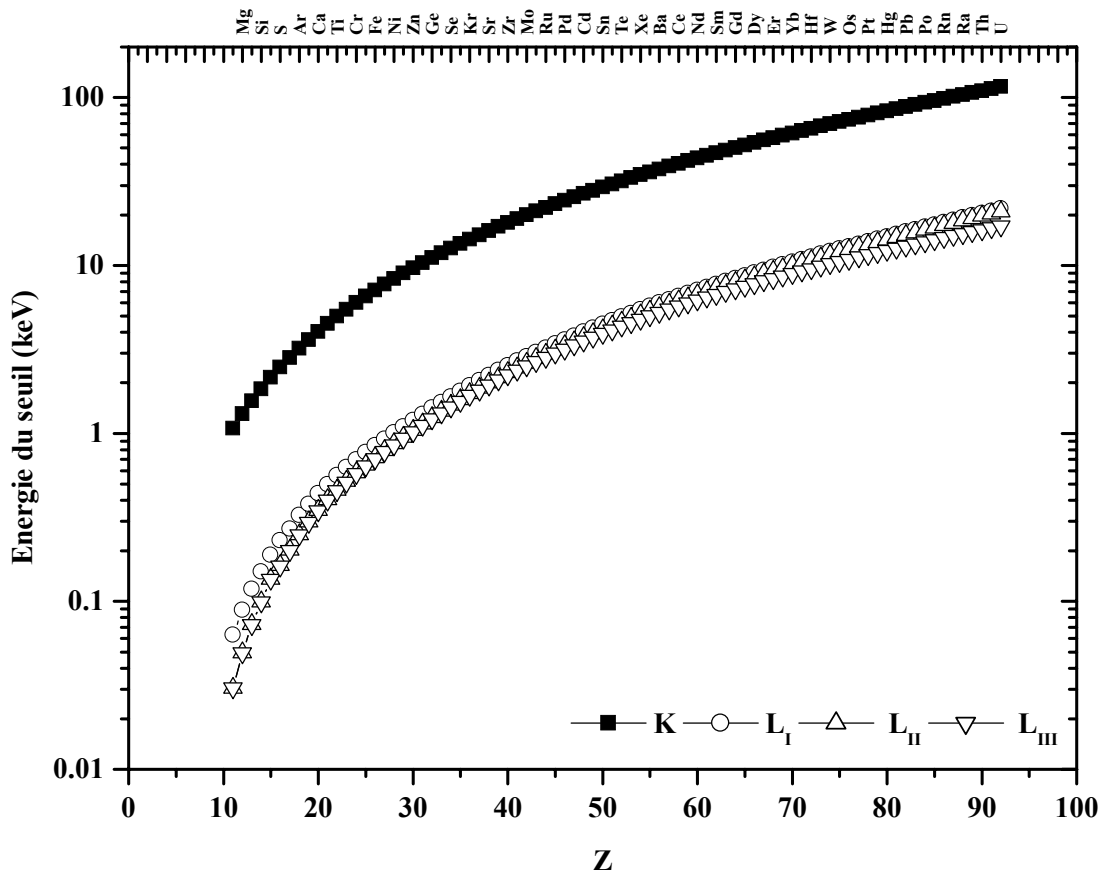


Figure III-7 : Énergie des seuils d'excitation K, L_I, L_{II} et L_{III} pour les éléments dont le numéro atomique Z est compris entre 11 et 92. Source : [Hubb97]

III.1.3.2. Atténuation par les milieux biologiques

Ces différentes énergies présentent des comportements différents lorsqu'elles traversent un milieu biologique donné, supposé équivalent eau. Comme illustré sur la figure ci-dessous (Figure III-8), l'atténuation des photons de très basse énergie est trop importante pour permettre d'envisager une éventuelle irradiation d'un patient. Si 1 cm d'eau suffit pour absorber la moitié des photons de 22 keV, l'irradiation externe d'une tumeur humaine avec des photons d'énergie moindre semble difficilement réalisable : les épaisseurs à imager ou traiter sont en effet bien trop conséquentes et conduiraient à des surdosages cutanés totalement prohibitifs. Il semble donc difficilement concevable d'exploiter les propriétés des discontinuités L pour une application *in vivo*.

C'est pour cette raison que nous nous sommes principalement intéressés dans le cadre de ce travail au renforcement de l'effet photoélectrique par des éléments dont le Z est supérieur à 30 et dont l'énergie d'intérêt pour l'irradiation devrait être supérieure à 20 keV.

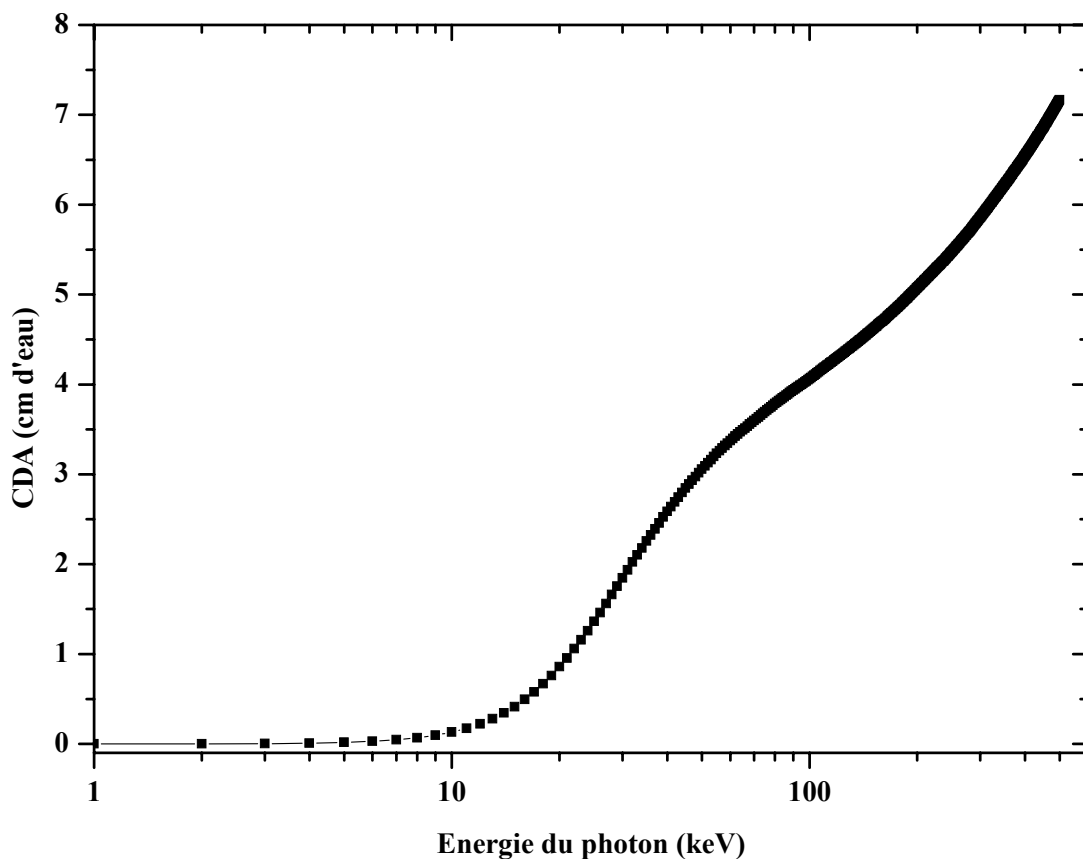


Figure III-8 : Calcul de l'épaisseur d'eau atténuant de moitié un rayonnement primaire constitué de photons d'énergies comprises entre 1 et 500 keV

III.1.4. Qualité et coût d'une image

La qualité de l'image radiologique a été étudiée en évaluant numériquement quelle quantité de signal serait mesurable par rapport au bruit environnant, si un objet donné, contenant une certaine concentration d'élément lourd, était imagé grâce à une technique de soustraction de 2 signaux transmis. Les énergies monochromatiques d'irradiation ont été choisies de part et d'autre du seuil K de l'élément lourd ou juste au-dessus du seuil K si une image de référence sans élément lourd est préalablement enregistrée. Le coût de l'image résultante à quant à lui été estimé à partir de la dose absorbée à l'entrée de l'objet.

III.1.4.1. Signal en transmission et rapport signal/bruit

Considérons la traversée d'un faisceau de $N_{0,E}$ photons d'énergie E dans un matériau composé de n éléments d'épaisseurs respectives x_n . Le nombre de photons transmis est donné par la relation :

(Eq. III-1) :

$$N = N_{0,E} \exp\left(- \sum_{\substack{n \\ \text{éléments}}} \mu_{tot}^{n,E} x_n\right)$$

Dans le cas particulier d'une épaisseur constituée d'un mélange d'eau contenant un élément lourd de numéro atomique Z , distribué de manière homogène dans le volume (cf. Figure III-9):

(Eq. III-2) :

$$N = N_{0,E} \exp(-\mu_{tot}^{eau,E} x_{eau} - \mu_{tot}^{Z,E} x_Z)$$

où x_Z représenterait l'épaisseur de l'élément Z s'il était présent à l'état pur. La solution aqueuse possédant la même densité surfacique, il vient :

(Eq. III-3) :

$$\rho_Z x_Z = x_{Zaq} C_{Zaq}$$

où ρ_Z est la densité volumique de l'élément lourd pur [g.cm^{-3}]; C_{Zaq} est la concentration de l'élément lourd mélangé à l'eau [g.cm^{-3}] et x_{Zaq} est l'épaisseur de mélange traversée.

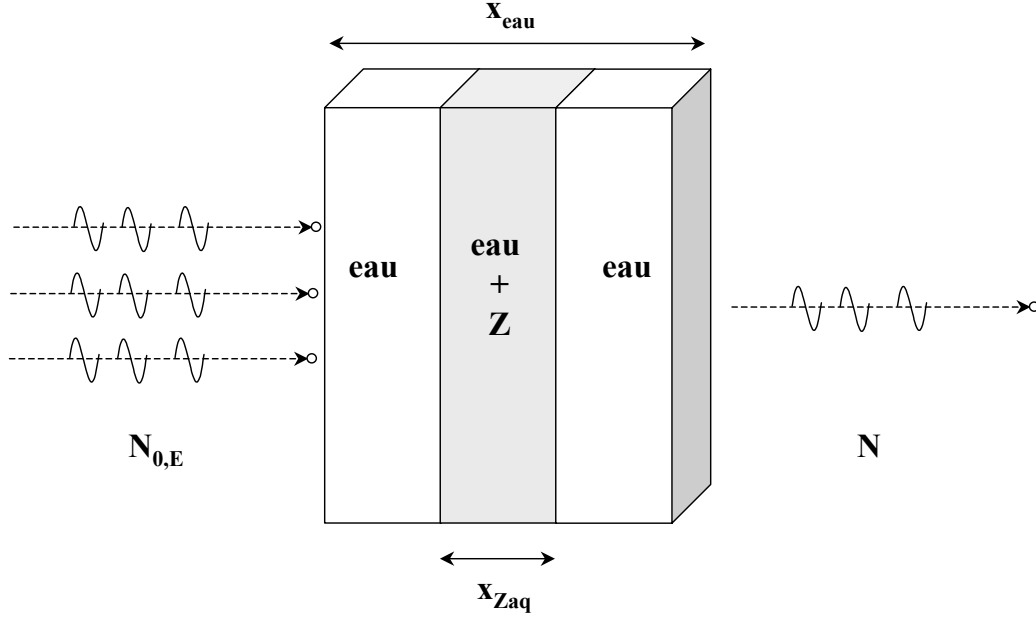


Figure III-9 : Illustration de la géométrie étudiée : un faisceau de rayons X traverse un objet constitué de plusieurs épaisseurs de milieux biologiques équivalents-eau, parmi lesquelles une correspond à un mélange homogène avec un élément lourd de numéro atomique Z.

Pour deux signaux transmis 1 et 2 différents (pouvant correspondre à des énergies photoniques ou des temps d'acquisition différents) :

(Eq. III-4) :

$$\begin{cases} N_1 = N_{0,E,1} \exp(-\mu_{tot}^{eau,E,1} x_{eau} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E,1} x_{Zaq,1} C_{Zaq,1}) \\ N_2 = N_{0,E,2} \exp(-\mu_{tot}^{eau,E,2} x_{eau} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E,2} x_{Zaq,2} C_{Zaq,2}) \end{cases}$$

Si le signal d'intérêt S résulte d'une soustraction logarithmique des deux images transmises précédentes, normalisées par rapport au flux incident, il vient :

$$S = \ln\left(\frac{N_1}{N_{0,E,1}}\right) - \ln\left(\frac{N_2}{N_{0,E,2}}\right) = \Delta\mu_{tot}^{eau,E,2-1} x_{eau} + \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E,2} x_{Zaq,2} C_{Zaq,2} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E,1} x_{Zaq,1} C_{Zaq,1}$$

Le bruit affectant chaque mesure dans les conditions 1 et 2 est dominé par le bruit photonique.

Le nombre de photons mesurés N est entaché de l'erreur moyenne $\sqrt{N}$. La fluctuation moyenne du signal après soustraction logarithmique est :

(Eq. III-5) :

$$\sigma_S = \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

et le rapport Signal/Bruit (RSB) est donné par la relation suivante :

(Eq. III-6) :

$$RSB = \frac{S}{\sigma_s}$$

Nous nous sommes intéressées à deux conditions d'acquisition différentes (cf. Tableau III-1):

- La première suppose l'acquisition simultanée des deux images transmises, réalisées à deux énergies différentes situées juste en dessous et juste en dessus du seuil K de l'élément lourd. Le contraste dans l'image est dû uniquement à la variation brutale du coefficient d'atténuation totale de l'élément lourd au niveau de son seuil K. Le contraste des tissus équivalents eau est en effet négligeable dans la mesure où leur coefficient d'atténuation varie très peu au passage du seuil K de l'élément lourd, si les énergies sont suffisamment proches.
- La seconde propose de soustraire à l'image réalisée avec élément lourd, une image de référence prise avant son introduction. Pour obtenir un maximum de signal, l'énergie d'acquisition sera choisie juste au-dessus de son seuil K.

Tableau III-1: Comparaison de l'expression analytique des signaux obtenus pour deux types de soustraction logarithmique

Méthode	K-edge	Temporelle
Conditions	Acquisition simultanée ($t_1 = t_2$) $E_1=K^-$ et $E_2=K^+$ (E_1 et E_2 très voisines)	t_1 = avant et t_2 = après l'introduction élément lourd $E_1= E_2= K^+$
N_1	$N_{0,E^-} \exp(-\mu_{tot}^{eau,E^-} x_{eau} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E^-} x_{Zaq} C_{Zaq})$	$N_{0,E^+,t_1} \exp(-\mu_{tot}^{eau,E^+} x_{eau})$
N_2	$N_{0,E^+} \exp(-\mu_{tot}^{eau,E^+} x_{eau} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E^+} x_{Zaq} C_{Zaq})$	$N_{0,E^+,t_2} \exp(-\mu_{tot}^{eau,E^+} x_{eau} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E^+} x_{Zaq} C_{Zaq})$
Signal $S=$	$\left(\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E^+} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E^-} \right) x_{Zaq} C_{Zaq}$	$\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,E^+} x_{Zaq} C_{Zaq}$

Pour une fluence photonique fixée (10^7 photons/pixel) le rapport signal/bruit a été évalué pour les deux types de soustraction, en fonction du numéro atomique de l'élément lourd, pour la géométrie suivante : 20 cm d'épaisseur d'eau avec une inclusion de 1 cm d'épaisseur contenant 10 mg.cm^{-3} de l'élément lourd étudié (cf. Figure III-10).

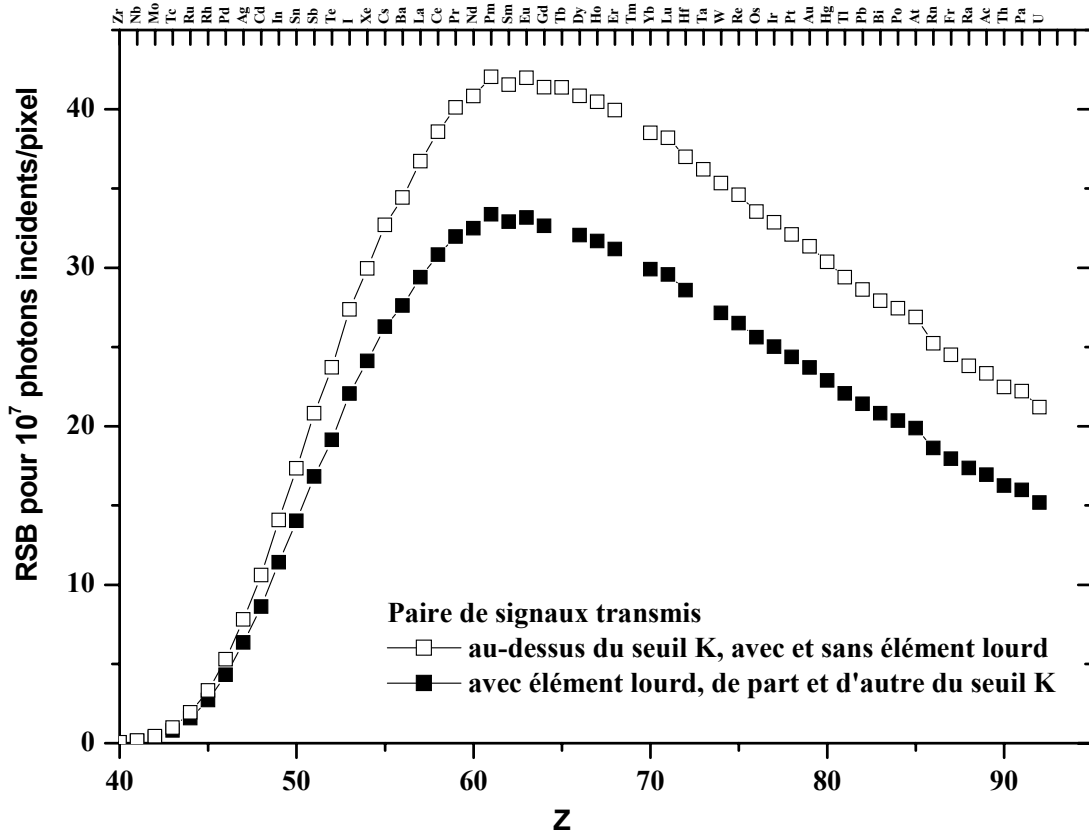


Figure III-10 : Rapports signal/bruit calculés pour 10^7 photons/pixel incidents traversant 20 cm d'eau dont 1 cm contenant 10 mg.cm^{-3} d'un élément lourd de numéro atomique Z , compris entre 40 et 92. Comparaison d'une irradiation réalisée au-dessus puis en dessous du seuil K de l'élément considéré avec une irradiation uniquement au-dessus du seuil K, avec et sans l'élément lourd.

Il apparaît clairement sur cette figure que pour la fluence et la géométrie choisies, les éléments dont le numéro atomique est inférieur à 40 possèdent une discontinuité K dont l'énergie est trop basse pour assurer un signal de sortie suffisant pour la formation d'une image. Le rapport RSB s'annule donc. D'autre part, quelque soit le mode de soustraction choisi, une gamme d'élément semble être plus favorable pour optimiser le rapport signal/bruit : celle-ci est centrée autour de $Z = 61$ (prométhium, lanthanoïde). Trop augmenter le numéro atomique de l'élément lourd ne conduit pas à une amélioration du rapport signal/bruit. Ceci s'explique par l'augmentation de l'énergie des seuils d'absorption K des éléments avec le numéro atomique (cf. Figure III-7 p. 75) combinée avec la diminution des coefficients massiques d'atténuation totale des photons aux plus hautes énergies (cf. Figure III-1, p. 67). Enfin, la soustraction d'images enregistrées avec et sans agent de contraste conduit à un rapport signal sur bruit en moyenne 25% plus élevée que la soustraction d'images simultanément enregistrées de part et d'autre du seuil K. Cette amélioration de la qualité d'image croît avec le numéro atomique de l'élément lourd irradié à son seuil K. Une diminution plus rapide de la différence des coefficients massiques d'atténuation totale de part

et d'autre des seuils K des éléments lourds en fonction du numéro atomique (cf. Figure III-2), par rapport à celle du coefficient massique d'atténuation totale juste au-dessus du seuil K explique cette différence.

III.1.4.2. Dose nécessaire à la surface de l'objet

Évaluons à présent la fluence de photons Φ_0 nécessaire par unité de surface au niveau de l'objet à imager pour obtenir un rapport signal/bruit RSB donné après la double exposition au rayonnement photonique:

$$(Eq. III-7) : \quad \Phi_0 = \frac{\exp(\mu_{tot}^{eau,E} x_{eau})}{\varepsilon p} \left(\frac{2 RSB}{S} \right)^2$$

où ε est l'efficacité du détecteur pour l'énergie considérée ; p est la surface d'un pixel ; $\mu_{tot}^{eau,E}$ est le coefficient linéique d'atténuation de l'eau à l'énergie E ($E \approx K^+ \approx K^-$ pour l'eau) ; RSB est la valeur du rapport signal sur bruit désirée dans le pixel ; S est le signal évalué après soustraction logarithmique des deux images (cf. Tableau III-1). La dose absorbée à la peau du patient se déduit de la fluence calculée précédemment grâce à la relation (Eq. II-20) p. 26 :

$$(Eq. III-8) : \quad D_{surface} = 1.6 \cdot 10^{-13} E \Phi_0 \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{eau,E}$$

où $D_{surface}$ est la dose à l'entrée de l'objet (Gy) ; E est l'énergie des photons en keV ; Φ_0 est la fluence photonique nécessaire pour obtenir un rapport signal/bruit donné (photons.cm⁻²) ;

$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{eau,E}$ est le coefficient massique d'absorption de l'eau à l'énergie E (cm².g⁻¹).

La dose surface nécessaire pour obtenir, après traversée de 20 cm d'épaisseur d'eau dont 1 cm contient 10 mg.cm⁻³ de l'élément lourd, un rapport signal/bruit de 3, a été évaluée pour les deux types de soustraction, en fonction du numéro atomique de l'élément lourd (cf. Figure III-11). Le calcul a été réalisé pour un détecteur supposé parfait ($\varepsilon = 100\%$) et possédant des pixels de 350 μ m x 1 cm.

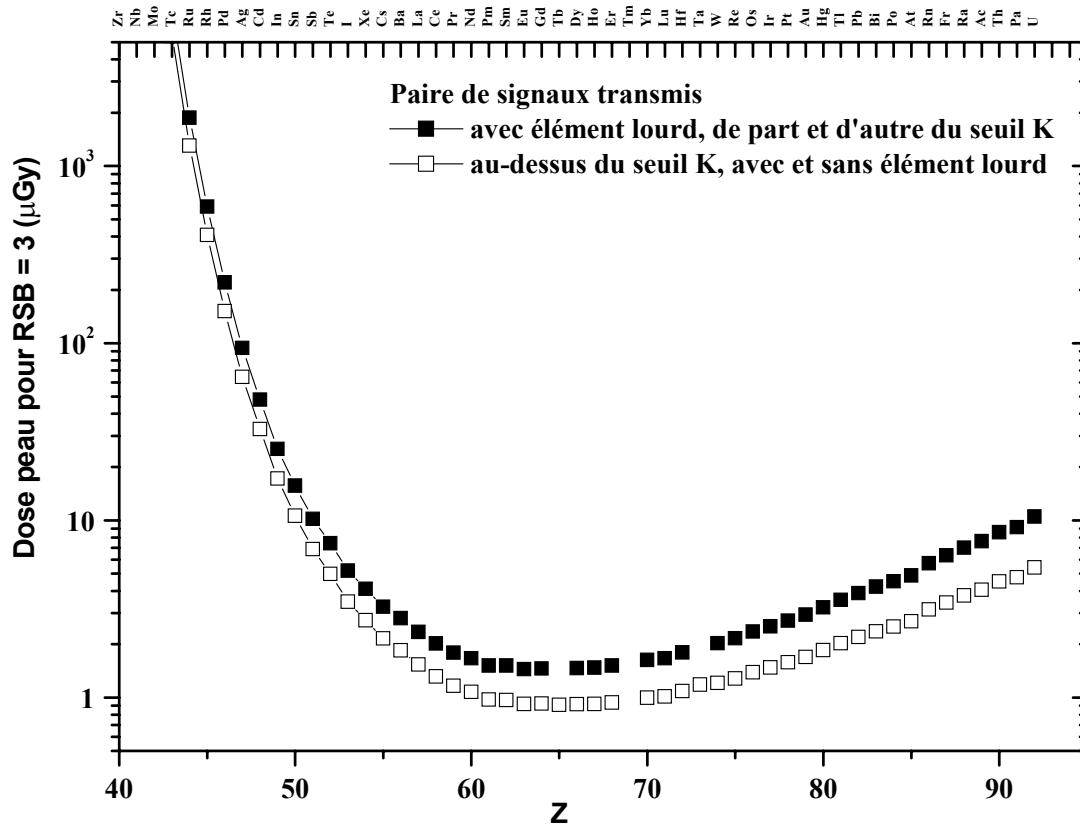


Figure III-11 : Pour différents éléments lourds ($Z = 40 - 92$), calcul de la dose nécessaire à l'entrée d'un objet pour obtenir un rapport signal/bruit de 3, pour des irradiations réalisées soit au-dessus puis en dessous du seuil K de l'élément considéré soit uniquement au-dessus du seuil, avec et sans l'élément lourd. Cet objet possède une épaisseur équivalente à 20 cm d'eau, et contient sur 1 cm d'épaisseur 10 mg.cm^{-3} de l'élément lourd. Le détecteur est supposé parfait ($\epsilon=100\%$), avec une dimension de pixel de 0.035 cm^2 .

La gamme d'élément dont le numéro atomique est compris entre 60 et 70 minimise le manifestement la dose nécessaire à l'entrée de l'objet pour obtenir un rapport signal/bruit équivalent. D'autre part, la méthode soustraction d'images au-dessus du seuil avant et après introduction d'un élément lourd est légèrement plus favorable à la radioprotection de l'objet à imager ce qui semble normal étant donné que cette technique s'est déjà avérée être plus favorable que l'autre alternative pour améliorer le rapport signal/bruit : pour des RSB égaux, un peu moins de photons sont nécessaires par la technique de soustraction temporelle.

III.1.5. Comparaison de l'iode et du gadolinium comme agents de contraste

L'iode ($Z=53$) est usuellement utilisé comme agent de contraste en radiodiagnostic. Comme illustré sur la Figure III-4 (p. 72) et la Figure III-6 (p. 74), l'emploi de cet élément pour une technique d'imagerie monochromatique avec une irradiation au-dessus du seuil K de l'iode (33.169 keV) conduit manifestement à une maximalisation de l'effet différentiel réalisable par rapport à l'atténuation massique de l'eau. Pour les deux techniques de

soustraction d'images numériques envisagées, l'iode fait partie des éléments lourds conduisant à des rapports signal sur bruit convenables, sans toutefois l'optimiser (cf. Figure III-10). L'énergie du seuil d'absorption K de l'iode étant situé relativement bas en énergie, l'atténuation par les tissus mous du corps humain est importante et conduit à des doses nécessaires à la peau du patient pour obtenir une image de qualité suffisante relativement importantes (cf. Figure III-11). Enfin, l'emploi des composés iodés n'étant pas sans risque pour la santé puisqu'une personne sur dix est allergique à l'iode, il est aujourd'hui nécessaire de rechercher de nouveaux agents de contraste de numéro atomique plus élevé, moins toxique et pouvant assurer une qualité d'image au moins aussi bonne qu'avec l'iode.

Sans doute peu d'éléments lourds de la classification périodique peuvent être administrés dans l'organisme humain sans risque. Les éléments dont le numéro atomique est compris entre 60 et 65 semblent particulièrement intéressants pour augmenter la qualité d'image tout en diminuant la dose à l'entrée de l'objet à imager (Figure III-10 et Figure III-11). Le gadolinium (Z=64) s'impose de lui-même pour investiguer une nouvelle voie d'imagerie par soustraction numérique d'images monochromatiques. Le tableau ci-dessous établit une comparaison des caractéristiques physiques de ces deux éléments lourds.

Tableau III-2: Comparaison des caractéristiques physiques de l'iode et du gadolinium, d'après [Hubb97] et [Nowo98]

	Iode (I)	Gadolinium (Gd)
Numéro atomique	53	64
Masse atomique (g.mol ⁻¹)	126.9	157.25
Densité (g.cm ⁻³)	4.93	7.9
Énergie du seuil K (keV)	33.169	50.239
$\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,K^+}$ (cm ² .g ⁻¹)	35.8	18.6
$\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,K^-}$ (cm ² .g ⁻¹)	6.5	3.8
$\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,K^+} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{Z,K^-}$ (cm ² .g ⁻¹)	29.3	14.8
$\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{eau,K^+=K^-}$ (cm ² .g ⁻¹)	0.328	0.226
$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)^{eau,K^+=K^-}$ (cm ² .g ⁻¹)	0.116	0.042

Malgré une différence des coefficients massiques d'atténuation totale de part et d'autre du seuil K deux fois moindre dans le cas du gadolinium que pour l'iode, sa plus forte énergie du seuil K et la plus faible atténuation des tissus équivalents eau à cette énergie-là en font un candidat théoriquement très intéressant, à étudier comme alternative aux composés iodés. Ces considérations théoriques ayant été faites pour des concentrations d'éléments lourds égales, il sera donc nécessaire d'obtenir des concentrations de gadolinium dans les tumeurs proches de celles accessibles avec les composés iodés.

III.2. DEPOSER PLUS D'ÉNERGIE DANS DES TISSUS CHARGES EN AGENTS DE CONTRASTE

L'effet photoélectrique, en induisant une atténuation du rayonnement primaire, contribue à la mise en mouvement d'électrons secondaires dans le milieu. Ce dernier absorbe l'énergie cinétique des électrons grâce aux ionisations et excitations qu'ils provoquent : la dose reflète cette quantité d'énergie absorbée. Nous avons évoqué précédemment la relation directe existant entre la dose absorbée et le coefficient massique d'absorption d'énergie (Eq. II-20 p. 26). A fluences d'énergie égales, il semble logique de penser que la dose absorbée dans un matériau sera plus élevée s'il est composé d'éléments de numéros atomiques élevés : la forte augmentation du coefficient d'atténuation totale du rayonnement photonique doit nécessairement aboutir à cette augmentation. Mais que devient alors l'énergie optimale d'irradiation ? Est-ce qu'une énergie de photons située juste au-dessus du seuil K reste intéressante pour déposer un maximum d'énergie malgré une énergie cinétique du photoélectron K pratiquement nulle ? Quelles quantités d'éléments lourds sont réellement nécessaires dans les milieux biologiques équivalents-eau pour obtenir un gain notable de dose absorbée ?

III.2.1. Coefficient massique d'absorption d'énergie et discontinuités: première approche

Dans cette réflexion concernant l'augmentation d'énergie déposée dans des milieux plus lourds que l'eau, il convient de prendre comme référence l'eau et d'étudier en fonction de l'énergie d'irradiation le gain de dose possible en y ajoutant des éléments de numéro atomique élevé. A titre d'exemple, les variations relatives des coefficients massiques d'atténuation totale et d'absorption d'énergie pour l'iode pure et l'eau sont représentées ci-dessous (Figure III-12).

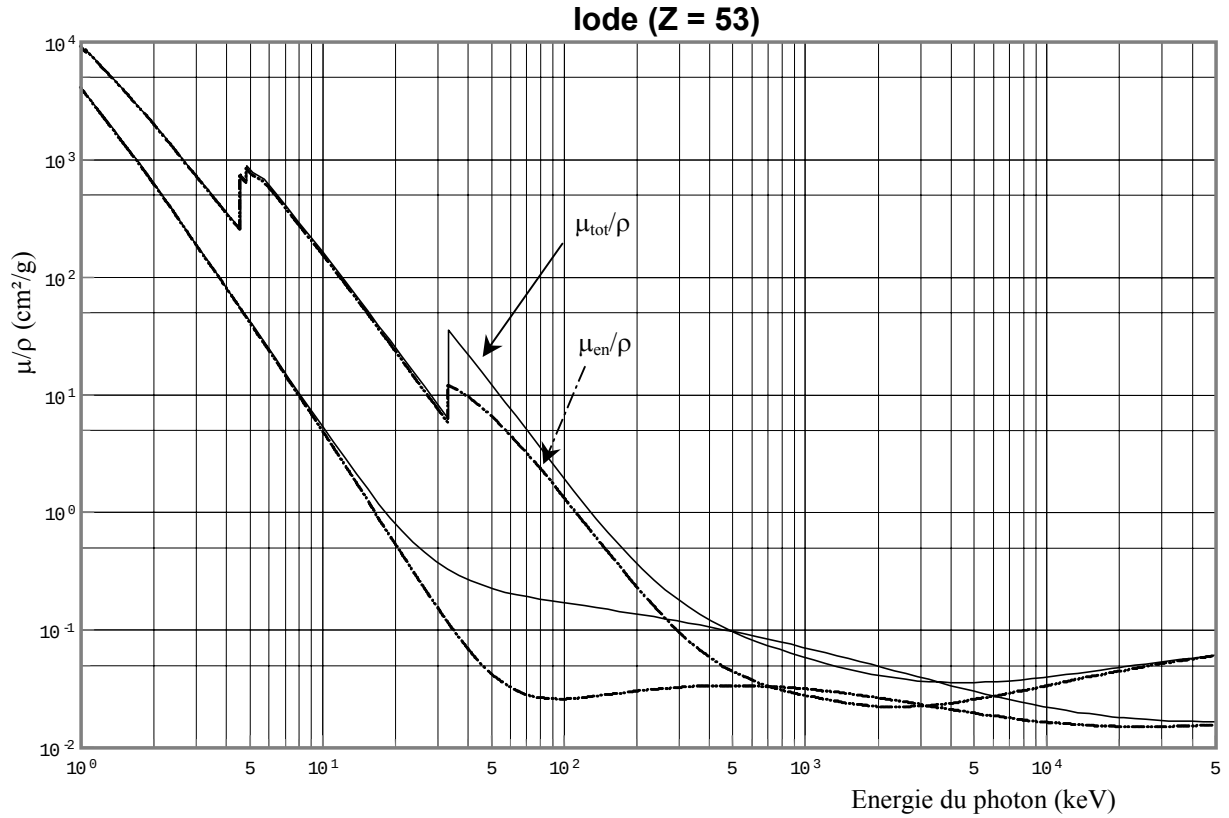


Figure III-12 : Comparaison des coefficients d'atténuation totale et d'absorption d'énergie pour l'iode (haut) et l'eau liquide (bas). Source : [Nowo98]

En première approche, nous remarquons que la discontinuité K de l'iode, qui était relativement importante dans le cas du coefficient massique d'atténuation totale ($29.3 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$), semble a priori moins intéressante du point de vue de l'absorption d'énergie ($6.1 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$). Près de 4/5ème des photoabsorptions dans le milieu iodé lors du passage du seuil d'absorption K ont par conséquent abouti à la formation de photons de fluorescence ou de rayonnement de freinage. En comparaison, ces rayonnements photoniques secondaires n'ont qu'un minime influence aux alentours des seuils L (Tableau III-3).

Tableau III-3: Coefficients massiques d'atténuation totale et d'absorption d'énergie de l'iode pour des énergies de photons situées de part et d'autre de ses seuils K, L_I , L_{II} , et L_{III} d'après [Boon96]

IODE ($\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$)	Seuil K 33.169 keV		Seuil L_I 5,188 keV		Seuil L_{II} 4,852 keV		Seuil L_{III} 4,557 keV	
	+	-	+	-	+	-	+	-
$\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho}\right)^{I,E}$	35.8	6.5	880.6	771.9	891.4	662.8	752.4	255.8
$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)^{I,E}$	11.9	5.8	829	726.4	837.3	628.8	713.2	254.7

III.2.2. Recherche de l'énergie optimale d'irradiation des éléments lourds purs

Si l'énergie située au-delà du seuil d'absorption K ne semble donc à priori pas optimale pour déposer un maximum d'énergies dans les tissus chargés en éléments lourds, la question est à présent de savoir quelle énergie serait plus adaptée à cet objectif. En prenant comme référence l'eau et en formulant l'hypothèse que les fluences d'énergies d'irradiation sont identiques pour l'élément pur et l'eau, nous avons étudié en fonction de l'énergie d'irradiation le gain de dose possible si l'interaction se produit sur des éléments de numéro atomique élevé. Ceci est illustré ci-dessous pour six éléments lourds purs (Figure III-13).

Hormis pour les éléments dont le numéro atomique est proche de 70, l'énergie située juste au-delà du seuil K n'est donc pas optimale pour augmenter le dépôt d'énergie par rapport aux tissus équivalents eau. Cet optimum se situe à des énergies supérieures au seuil K, pour les éléments dont le numéro atomique est inférieur ou égal à 70 (Br : 42 keV, Ag : 47 keV, I : 48 keV, Gd : 60 keV, Yb : 64 keV). Il est inférieur à l'énergie d'excitation du seuil K et supérieur à celle des seuils L pour les éléments plus lourds comme le platine (38 keV).

Il apparaît également sur ces figures que certains éléments sont plus appropriés que les autres pour maximiser l'absorption d'énergie par rapport à l'eau : les échelles des axes des ordonnées de ces 6 figures étant identiques, l'iode s'avère être plus efficace que les 5 autres éléments pour augmenter le dépôt d'énergie comparativement à l'eau, suivie de près par le platine, l'argent et le gadolinium.

Il est intéressant de noter que pour une plage d'énergie centrée sur l'optimum et large d'une dizaine de keV le facteur d'augmentation de dépôt d'énergie ne chute pas au-delà de 5% de la valeur du maximum.

Les valeurs absolues de ces maxima ne seront pas discutées ici dans la mesure où il est illusoire d'imaginer pouvoir incorporer chez l'homme des éléments purs en substitution aux tissus équivalents eau. Il semble donc plus raisonnable de discuter l'effet de dilutions d'éléments lourds dans un milieu aqueux.

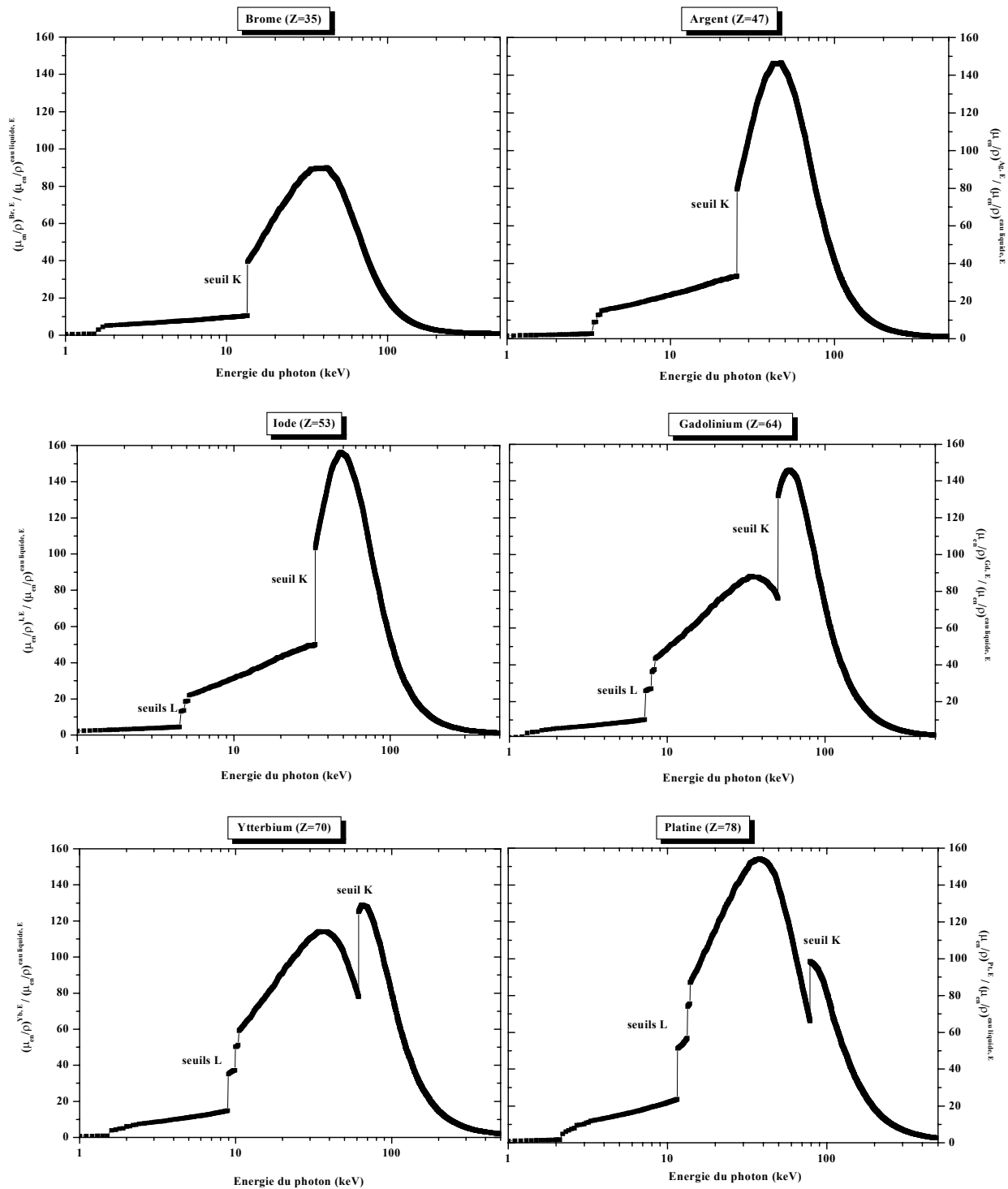


Figure III-13 : Facteurs d'augmentation de dépôt d'énergie de 6 éléments purs (Br, Ag, I, Gd, Yb, Pt) par rapport à l'eau, pour des photons d'énergie comprise entre 1 et 500 keV. Source : [Nowo98]

III.2.3. Capacité des mélanges à augmenter l'énergie déposée

Dans le cas d'un mélange iode + eau, le facteur d'augmentation de dose absorbée due à la présence de l'élément lourd par rapport à l'eau pure peut être défini de la façon suivante :

(Eq. III-9) :

$$DEF = \frac{\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{mélange, E}}{\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{eau, E}} = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{mélange, E}_{eau, E}$$

où le facteur DEF est le facteur d'augmentation de dépôt d'énergie¹³. D'après (Eq. II-18) p.25 :

(Eq. III-10) :

$$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{mélange, E} = \frac{m_I}{m_I + m_{eau}} \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{I, E} + \frac{m_{eau}}{m_I + m_{eau}} \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{eau, E}$$

où m_I et m_{eau} représentent les masses d'iode pur et d'eau présentes dans le mélange.

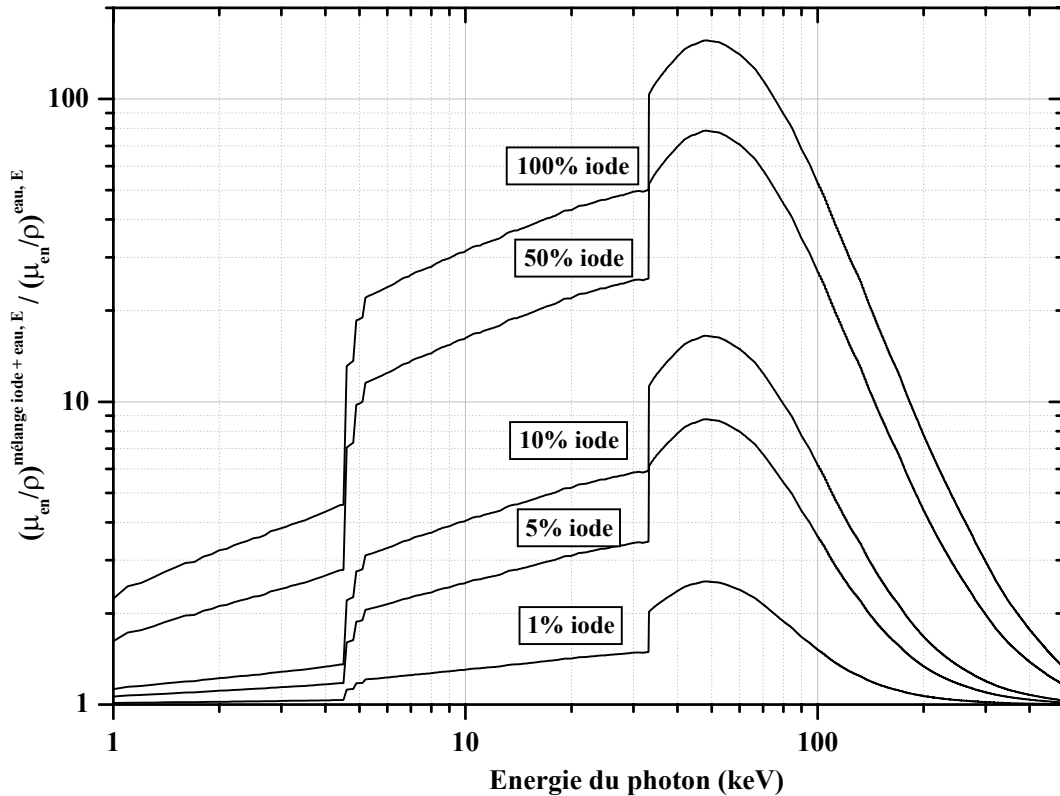


Figure III-14 : Facteurs d'augmentation de dépôt d'énergie dus à l'introduction de différentes proportions massiques d'iode dans de l'eau, pour des photons d'énergie comprise entre 1 et 500 keV. Source : [Nowo98]

¹³ en anglais, Dose Enhancement Factor

La variation de ce facteur en fonction de l'énergie du photon incident est illustrée ci-dessus pour quelques dilutions d'iode (Figure III-14). Pour cet élément lourd, le dépôt maximal d'énergie se produit pour des photons de 48.2 keV. La valeur du maximum varie linéairement en fonction de w_I la proportion massique d'iode dans le mélange :

(Eq. III-11) :
$$DEF_{\max} = 1 + w_I * 1.5527$$

avec $w_I = \frac{m_I}{m_I + m_{eau}} (\%)$.

Pour un mélange constitué en masse de 1% d'iode dans 99 % d'eau, la dose absorbée dans le mélange sera donc multipliée par 2.55 par rapport à l'eau. La relation existant entre la proportion massique d'un élément lourd et sa concentration dans le mélange est établie ci-dessous :

(Eq. III-12) :
$$w_I = \frac{C}{C + \rho_{eau} \left(1 - \frac{C}{\rho_I}\right)} \quad \text{et} \quad w_{eau} = \frac{\rho_{eau} \left(1 - \frac{C}{\rho_I}\right)}{C + \rho_{eau} \left(1 - \frac{C}{\rho_I}\right)}$$

avec C : concentration d'iode dans le mélange ($g(I) / ml_{(mélange)}$)

ρ_I : densité de l'iode atomique, 4.93 g/cm^3 et ρ_{eau} : masse volumique de l'eau.

A titre d'illustration le tableau ci-dessous présente les proportions massiques équivalentes à quelques dilutions d'iode dans un mélange. Le calcul du facteur du DEF associé a été réalisé d'après (Eq. III-11) (Tableau III-4). Une augmentation notable du DEF correspond ainsi à des incorporations importantes d'éléments lourds dans les tissus : il s'agit bel et bien d'un phénomène massique d'augmentation de probabilités de réaction.

Tableau III-4 : Proportions massiques d'iode et d'eau pour des mélanges contenant une certaine concentration d'iode. Calcul du DEF du mélange

$C \text{ (mg(I).ml}^{-1}\text{)}$	$w_I (\%)$	$w_{eau} (\%)$	DEF
10	0.99	99.01	2.5
50	4.81	95.19	8.5
320^{14}	25.5	74.5	40.6

¹⁴ concentration de l'Hexabrix® pur

III.2.4. Vers une compréhension plus fine du dépôt d'énergie : parcours des photoélectrons

En plus des raisons évoquées au paragraphe précédent, un argument supplémentaire plaçant en faveur de l'irradiation à 50 keV d'un milieu iodé est qu'à cette énergie, le photoélectron K possède une énergie cinétique initiale de 17 keV environ ce qui correspond à un parcours de l'électron dans l'eau, calculé dans l'hypothèse du ralentissement continu¹⁵, de 6 micromètres (cf. Figure III-15). Celui-ci est donc du même ordre de grandeur que le diamètre cellulaire. Il est intéressant pour privilégier l'irradiation à visée thérapeutique à des énergies différentes de celles des seuils d'absorption photoélectrique, sans toutefois la justifier. Le photoélectron, par son éjection systématique après un événement photoélectrique, est donc un bon candidat pour le transport de l'énergie d'irradiation.

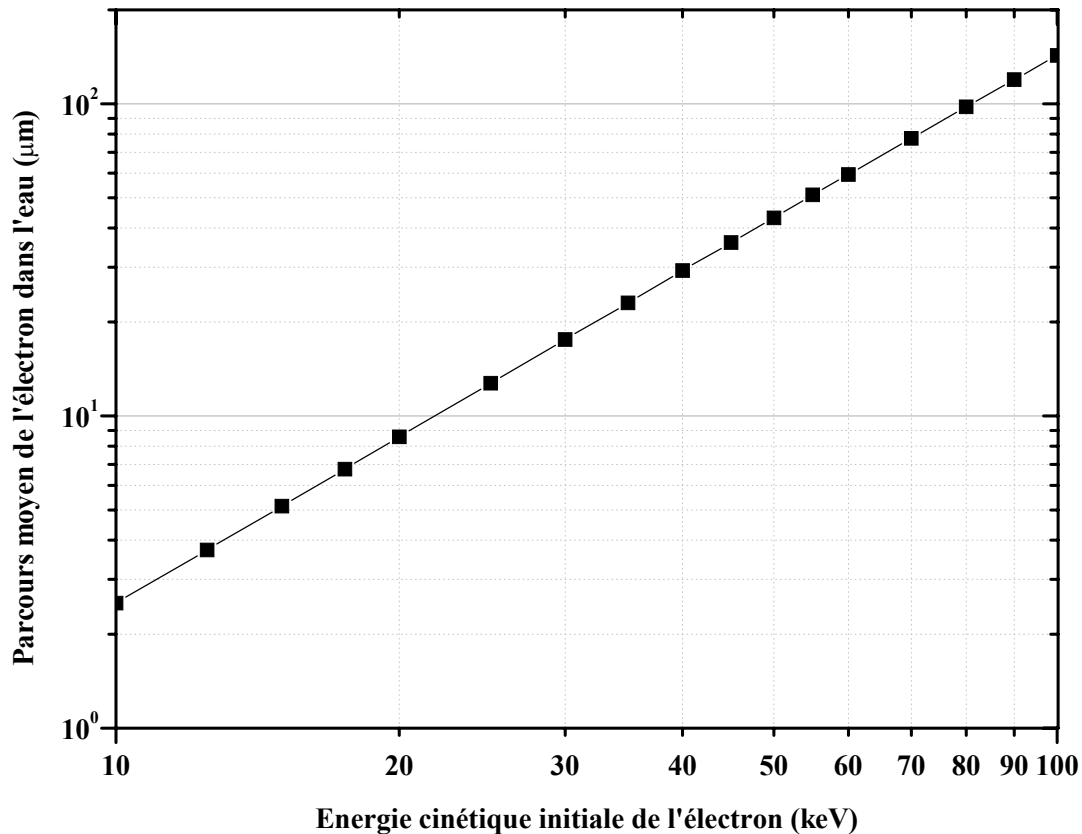


Figure III-15 : Parcours moyen d'un électron dans l'eau en fonction de son énergie cinétique initiale d'après [Berg99]

¹⁵ intégration de l'équation (Eq. II-8) p.19

III.3. CIBLER LE DEPOT D'ENERGIE SUR L'ADN GRACE AUX CASCADES D'ELECTRONS AUGER

Les processus radiatifs et non radiatifs qui permettent aux atomes excités par effet photoélectrique de retrouver leur état fondamental ont été évoqués au paragraphe § II.1.1.3. Dans ce chapitre, nous étudions la possibilité et les contraintes d'exploitation thérapeutiques des électrons Auger. Contrairement à l'approche développée précédemment (§ III.2) il ne s'agit plus cette fois-ci d'augmenter massivement les probabilités de réaction en introduisant suffisamment d'éléments lourds dans des mélanges, mais d'affiner le dépôt d'énergie en faisant en sorte que ce dernier soit critique d'emblée pour les cibles biologiques. Dans ce cadre, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'apport des électrons Auger issus de l'ionisation en couche interne K sur des éléments lourds qui, puisqu'ils devront entrer dans l'ADN, ne pourront pas y être présents en masse pour des raisons pharmacologiques.

III.3.1. Probabilité de création des lacunes dans les différentes couches et mode de dépôt de l'énergie

Pour comprendre les phénomènes physiques liés à la réorganisation du cortège électronique après création d'une lacune par effet photoélectrique, il est essentiel de connaître les probabilités d'interaction entre le photon incident et l'électron d'une couche donnée du cortège électronique. La question est donc à présent de savoir quelle est la couche d'origine du photoélectron éjecté.

Comme illustré sur la figure ci-dessous pour des atomes de platine irradiés par des photons d'énergies comprises entre 10 eV et 1 MeV, les sections efficaces d'interaction des photons en fonction de leur énergie sont également tabulées pour chaque couche des atomes cibles dans des ouvrages tels que [Cull89, Scof73] (Figure III-16). L'électron d'une sous-couche donnée ne peut être éjecté que si l'énergie du photon incident est légèrement supérieure à l'énergie de liaison de l'électron dans la sous-couche considérée (cf § III.1.1 p.66). Pour des énergies inférieures, seuls les électrons moins liés pourront être éjectés. Le passage du seuil K du platine conduit donc à des lacunes différentes selon l'énergie choisie : juste en dessous de ce seuil, les photons incidents provoquent l'éjection d'électrons des couches L (section efficace de 500 barns) tandis qu'au-dessus, ce sont des électrons K qui seront éjectés avec une très forte probabilité relative (2500 barns) tandis que les électrons L conserveront quant à eux la même contribution à la section efficace totale d'interaction, égale à 3000 barns.

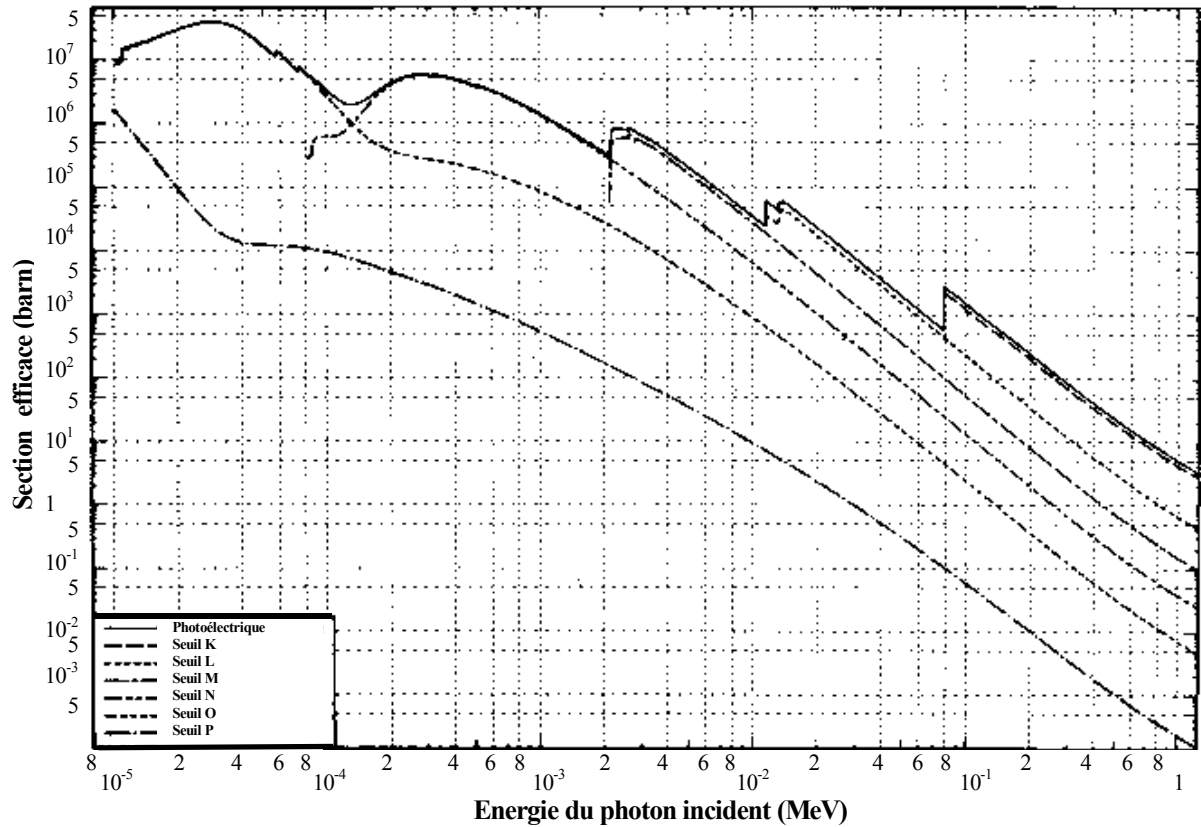


Figure III-16 : Section efficace d'effet photoélectrique sur les différentes couches d'atomes de platine d'après [Cull89]

L'irradiation d'atomes lourds avec des photons d'énergies situées de part et d'autre de leur seuil d'absorption K conduit donc à la génération de lacunes électroniques situées dans des couches différentes. Cette différence essentielle ne risque-t-elle pas de modifier sensiblement les modes de dépôt de l'énergie et donc de contrebalancer l'effet positif attendu par l'augmentation subite de la probabilité d'interaction au-delà du seuil K?

Les deux tableaux ci-dessous illustrent les quantités totales d'énergie libérées selon les différents modes possibles (électronique, fluorescence) après interaction de photons de différentes énergies sur des atomes d'iode (Tableau III-5) et de platine (Tableau III-6). Afin d'introduire un élément de discussion supplémentaire, nous avons rajouté, à titre d'information, la nature de la couche majoritairement ionisée ainsi que l'énergie cinétique initiale du photoélectron créé et les probabilités d'interaction entre le photon et l'atome.

Tableau III-5 : Répartition des modes de dépôt de l'énergie après interaction de photons sur des atomes d'iode, d'après [Cull89]

Iode						
Energie du photon (keV)	Couche ionisée	T_{photoe}^- (keV)	σ_{tot} (cm ² .g ⁻¹)	Energie moyenne (MeV/cm)		
				total	local	fluorescence
< 33.17	L	28	6.5	0.948	0.939	0.009
> 33.17	K	0	35.8	5.74	1.95	3.79
50	K	16.8	12.3	2.95	1.6	1.35
70	K	36.8	5	1.71	1.13	0.58
85	K	51.8	3	1.28	0.90	0.38

Tableau III-6 : Répartition des modes de dépôt de l'énergie après interaction de photons sur des atomes de platine d'après [Cull89]

Platine						
Energie du photon (keV)	Couche ionisée	T_{photoe}^- (keV)	σ_{tot} (cm ² .g ⁻¹)	Energie moyenne (MeV/cm)		
				total	local	fluorescence
33	L	19.1	20.68	14.3	13.04	1.26
50	L	36.1	6.9	6.85	6.46	0.39
< 78.4	L	64.5	2	3.03	2.92	0.11
> 78.4	K	0	9.1	14.99	4.38	10.61
85	K	6.6	7.5	13.08	4.47	8.61

La comparaison de ces données conduit à plusieurs remarques. Pour l'iode comme pour le platine, l'irradiation par des photons d'énergie légèrement supérieure au seuil d'absorption K conduit bien à une énergie totale déposée maximale. Celle-ci est 2.6 fois plus importante pour le platine (15 MeV/cm) que pour l'iode (5.74 MeV/cm), probablement en raison des différences des niveaux énergétiques impliqués. Par contre si pour l'iode, l'énergie déposée localement (électrons) est bien également maximale à cette énergie sur la gamme étudiée (1.95 MeV/cm), ceci n'est pas le cas pour le platine : des énergies bien inférieures (33 et 50 keV) et supérieures (85 keV) au seuil conduisent à des dépôts d'énergie locaux supérieurs à celui généré juste au-dessus du seuil K. La fluorescence joue donc un rôle particulièrement important dans la répartition de l'énergie déposée : celle-ci emporte la majeure partie de l'énergie au-dessus du seuil K pour l'iode comme pour le platine. En dessous du seuil K, par contre, même si les probabilités de générer les événements physiques initiaux sont plus faibles qu'au-dessus du seuil (5.5 fois pour l'iode et 4.5 fois pour le platine), la fluorescence intervient peu et la quasi-totalité de l'énergie est transférée sous forme d'énergie cinétique aux électrons. De plus l'énergie cinétique du photoélectron, qui lui est systématiquement éjecté, n'est plus négligeable puisque le photoélectron L possède un parcours moyen de 15 ou 65 μm juste en dessous des seuils K de l'iode et du platine

respectivement. Il est donc susceptible de générer des dégâts cellulaires, non pas à l'échelle de l'ADN, mais plutôt dans un rayon de plusieurs cellules.

Pour résumer ce paragraphe nous pouvons donc attirer l'attention du lecteur sur le fait que l'irradiation au-dessus et en dessous du seuil K d'un atome lourd conduit à des événements physiques qui, en plus de posséder des *probabilités* différentes, sont de *natures* différentes et conduisent à des *modes de dépôts d'énergies* différents. Toutefois la comparaison d'une irradiation avec des photons d'énergie inférieure au seuil K par rapport à celle avec des photons d'énergie légèrement supérieure permet de s'affranchir de ces différences- en effet les probabilités de générer un événement photoélectrique sur les couches L sont à peu près identiques en dessous et au-dessus du seuil K - pour finalement ne s'intéresser qu'à *l'apport d'énergie* engendré par les lacunes en couche K. D'autres énergies d'irradiation peuvent toutefois être plus intéressantes que celles situées juste au-delà du seuil K, comme par exemple 33 keV pour le platine. Cette constatation a déjà été évoquée au paragraphe § III.2.2 dans le cadre d'une comparaison des coefficients massiques d'absorption d'énergie de l'élément pur par rapport à l'eau. Il est intéressant de constater qu'une réflexion basée sur des données atomiques plus intimistes conduit à des conclusions identiques.

III.3.2. Probabilité de désexcitation non-radiative et énergies moyennes libérées après création d'une lacune

L'objet de notre étude portant sur l'exploitation de l'effet Auger à des fins thérapeutiques et donc destructives pour les cellules, nous nous sommes demandés quel élément serait le plus favorable pour générer un maximum d'électrons potentiellement fortement toxiques. Après création d'une lacune dans une sous-couche S du cortège électronique de l'élément, cible de l'interaction photoélectrique, l'atome ionisé peut se réorganiser soit en émettant des photons de fluorescence (transitions radiatives), soit en expulsant une multitude d'électrons de faibles énergies (transitions non radiatives). La variation de la probabilité de désexcitation non radiative est représentée ci-dessous en fonction du numéro atomique de l'élément ciblé (Figure III-17). Ce graphique confirme le fait que l'effet Auger est prédominant dans les milieux biologiques ($Z < 20$). Les ionisations en couche L sont largement plus favorables que la couche K pour engendrer une désexcitation par voie non radiative : elles conduisent en effet dans le pire des cas ($Z=92$, sous-couches L_{II} et L_{III}) à une probabilité voisine de 0.5 ce qui signifie qu'une ionisation sur 2 est source d'une cascade électronique. Les conséquences des lacunes électroniques dans la sous-couche L_I sont quant à elles remarquables pour l'irrégularité de leur probabilité d'apparition lorsque le

numéro atomique du matériau augmente. Ainsi, si les probabilités sont sensiblement égales pour les sous-couches L_I , L_{II} et L_{III} pour les matériaux dont le numéro atomique est inférieur à 50, la zone comprise entre $Z = 50$ et 75 conduit, après création d'un trou L_I à une amélioration relative du taux de désexcitation par effet Auger. Cette différence est encore plus marquée au-delà de $Z=75$: les ionisations en couches L_I conduisent dans 80 à 90 % des cas à l'émission d'électrons secondaires pour ces matériaux, contre 50 % en couches L_{II} ou L_{III} et 3 % en couche K.

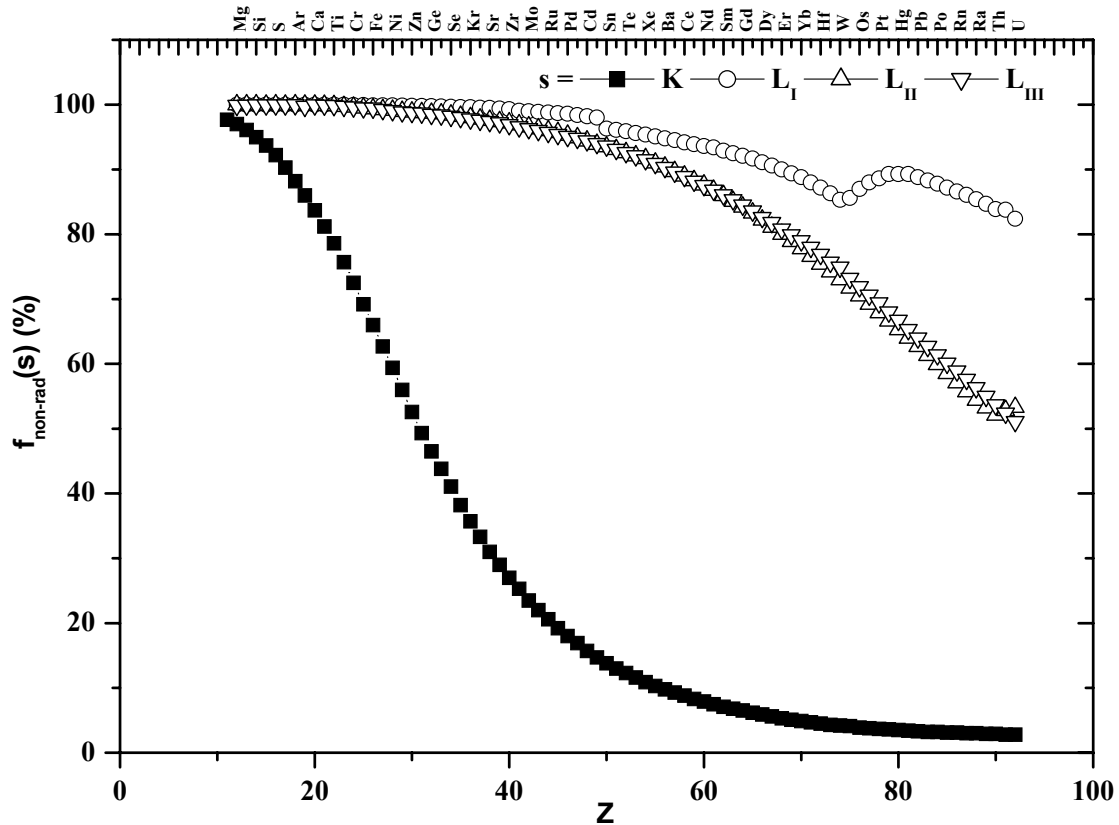


Figure III-17 : Pour les différents éléments de la classification périodique, variation de la probabilité de désexcitation non radiative après création d'une lacune dans les sous-couches K, L_I , L_{II} et L_{III} d'après [Krau79]

Pour le seuil K, il est évident que les matériaux les plus intéressants pour générer une cascade d'électrons Auger sont ceux dont le Z est inférieur à 30. L'énergie nécessaire pour extraire avec une probabilité maximale un électron pour ces éléments étant trop faible pour une éventuelle application clinique (cf. Figure III-7 p. 75), nous avons choisi de ne considérer que les éléments de la classification situés au-delà de ce seuil. Ainsi nous avons préféré étudier les conséquences de l'induction photonique externe de trous en couches K sur des hétéroatomes de l'ADN dont nous étions certains : i) que nous étions capables de les véhiculer dans l'ADN et ii) que nous pourrions les exciter au seuil K in vivo, avec des

rayonnements suffisamment pénétrants. Ceci nous a conduit à considérer des éléments qui, après création d'une lacune en couche K, conduisent à une faible probabilité de désexcitation par voie non-radiative. Ces éléments sont l'iode et le platine ; les valeurs de $f_{\text{non-rad}}(\text{K})$ sont respectivement 11.6 et 3.7 %. Ces valeurs ne nous ont néanmoins pas effrayé dans la mesure où, si l'hypothèse d'extrême toxicité des cascades Auger est validée, une faible proportion peut être suffisante en générant des dégâts dans l'ADN suffisamment complexes pour être létaux pour la cellule.

Les probabilités de créer un mode de désexcitation préférentiel du cortège électronique ionisé ne reflètent finalement que la proportion de photons incidents conduisant à cet effet. Elles n'informent nullement sur les valeurs des énergies libérées après création des lacunes dans le cortège électronique. Celles-ci obéissent bien évidemment à la loi de conservation de l'énergie et les trous en couche K, correspondant à des électrons plus liés, sont donc plus favorables que les L de ce point de vue.

Tableau III-7 : Largeurs de raie du comblement par voie radiative et non-radiative d'une lacune en couche K, L_I , L_{II} ou L_{III} de l'iode et énergies moyennes totales libérée après réorganisation du cortège électronique, d'après [Perk91]

Iode					
Couche	Énergie de liaison (keV)	Γ_{rad} (eV)	$\Gamma_{\text{non-rad}}$ (eV)	Énergies Moyennes totales (keV)	
				Photons	Électrons
K	33.169	9.12	1.26	26.2	6.8
L_I	5.188	0.15	3.25	0.4	4.6
L_{II}	4.852	0.25	2.66	0.4	4.3
L_{III}	4.557	0.23	2.45	0.35	4.05

Tableau III-8 : Largeurs de raie du comblement par voie radiative et non-radiative d'une lacune en couche K, L_I , L_{II} ou L_{III} du platine et énergies moyennes totales libérée après réorganisation du cortège électronique, d'après [Perk91]

Platine					
Couche	Énergie de liaison (keV)	Γ_{rad} (eV)	$\Gamma_{\text{non-rad}}$ (eV)	Énergies Moyennes totales (keV)	
				Photons	Électrons
K	78.395	46.5	1.93	68.6	9.9
L_I	13.88	1.05	12.33	3.4	10.3
L_{II}	13.273	1.83	3.41	4.4	8.7
L_{III}	11.564	1.61	3.6	3	8.4

Les deux tableaux ci-dessus illustrent pour l'iode et le platine les largeurs de raie des transitions radiatives et non-radiatives impliquées dans le comblement d'une lacune en

couche K ou L (Tableau III-7 et Tableau III-8). Celles-ci sont directement reliées aux probabilités $f_{\text{rad}}(S)$ et $f_{\text{non-rad}}(S)$ d'après (Eq. II-3 p.14). Il est intéressant de souligner que, du fait de la conservation de l'énergie et malgré les fortes probabilités de désexcitation par voie non-radiative des couches L (cf. Figure III-17), les énergies totales emportées par les électrons sont finalement à peu près identiques après création de lacunes K ou L. La différence se joue au niveau de rayonnement de fluorescence qui emporte la quasi-totalité de l'énergie lorsque la couche la plus interne a été ionisée.

III.3.3. Spectres des électrons Auger et vacances électroniques : approche simplifiée

Pour savoir quelles énergies possèdent les électrons Auger émis suite à la création d'une lacune dans une sous-couche électronique d'un atome cible et quelles sont leurs probabilités d'apparition, la question devient plus complexe et nécessite des simulations de Monte-Carlo pour y répondre correctement. Ainsi des recherches sont toujours en cours pour pouvoir connaître le spectre d'émission Auger de tel ou tel composé selon le mode de création de la lacune [Step00a, Step00b]. Il s'agit en réalité d'un vaste sujet de recherche en lui-même et de telles méthodes informatiques n'ont pas été utilisées dans le cadre de ce travail. Nous avons voulu néanmoins avoir une idée grossière du spectre d'électrons Auger émis suite à la création d'un trou dans la couche K (photons d'énergie supérieure au seuil K) ou la sous-couche L_1 (photon dont l'énergie est inférieure au seuil K). Pour ce faire, nous avons étudié les données de référence de la plupart des logiciels de simulations : les tables de probabilités de transitions radiatives et non-radiatives des atomes en fonction de la sous-couche ionisée, éditées par le Lawrence Livermore National Laboratory [Perk91].

Cette étude nous a conduit à une liste non exhaustive d'événements dont la probabilité d'apparition est globalement majoritaire après création d'un trou en couche K ou L_1 . Les résultats pour l'iode et le platine sont donnés ci-dessous (Tableau III-9 et Tableau III-10 respectivement). Pour chaque couche, les événements ont été classés par ordre décroissant de probabilité, de gauche à droite. Par exemple, la création d'une lacune en couche K de l'iode conduit dans 88.4% des cas à de la fluorescence. Parmi celle-ci, 47% provient du comblement par un électron de la couche L_3 et conduit à un rayonnement de fluorescence de 28.61 keV ; 25% est un rayonnement photonique de 28.31 keV issu de la transition de l'électron L_2 vers la couche K... etc. De la même manière, sur les 11.6% d'effet Auger créé, l'événement majoritaire est l'éjection d'un électron L_3 avec une énergie de 23.7 keV suite au comblement

par un électron L_2 du trou K (2.8% de probabilité), suivi par l'électron Auger e^-_{KL3L3} dont l'énergie cinétique initiale est de 24.5 keV ... etc.

Ce recensement nous montre que les événements type K conduisent essentiellement à du rayonnement de fluorescence d'énergie légèrement inférieure au seuil d'absorption K et à des électrons Auger, qui, même s'ils sont moins fréquemment produits, sont dans la majorité très énergétiques (plus de 20 keV pour l'iode et plus de 50 keV pour le platine). Cet événement primaire conduit à des ionisations principalement situées dans les couches L_3 , L_2 , M_3 , M_2 et N_3 et L_1 ¹⁶ qui vont à leur tour générer des cascades de photons de fluorescence et d'électrons. En ce qui concerne les lacunes en couche L_1 , elles conduisent essentiellement à l'éjection d'électrons dont l'énergie cinétique initiale est cette fois-ci majoritairement beaucoup plus faible (comprises entre 4 keV et 100 eV). Le rayonnement de fluorescence est globalement d'énergie légèrement inférieure au seuil L et les lacunes engendrées se situent essentiellement dans les couches L_3 , M_2 , M_3 , M_4 , N_2 , N_3 , et N_4 .

¹⁶ probabilité relative faible puisque le trou en couche L_1 n'apparaît ici que pour les processus non-radiatifs

Tableau III-9 : Approche du spectre de photons de fluorescence et d'électrons initialement générés après création d'une lacune en couche K ou L₁ sur des atomes d'iode. Distribution des vacances électroniques.

S	K					L _I				
PROCESSUS RADIATIFS										
f _{rad} (s)	88.4 %					4.4 %				
x	L ₃	L ₂	M ₃	M ₂	N ₃	M ₃	M ₂	N ₃	N ₂	L ₃
f _{rad} (s,x)	47 %	25 %	8.5 %	4.4 %	1.8 %	2.1 %	1.3 %	0.45 %	0.27 %	0.03 %
hν _{sx} (keV)	28.61	28.31	32.29	32.23	33.03	4.29	4.23	5.03	5.01	0.6
PROCESSUS NON-RADIATIFS										
f _{non-rad} (s)	11.6 %					95.6 %				
xy	L ₂ L ₃	L ₃ L ₃	L ₁ L ₃	L ₁ L ₂	L ₁ L ₁	M ₄ M ₅	L ₃ N ₅	L ₃ N ₁	L ₃ N ₃	L ₂ N ₁
f _{non-rad} (s,x,y)	2.8 %	1.4 %	1.3 %	1.06 %	0.9 %	8.04 %	7.6 %	7.4 %	6.2 %	5.6 %
e ⁻ _{sxy} (keV)	23.7	24.05	23.44	23.14	22.84	3.89	0.55	0.416	0.473	0.113

Tableau III-10 : Approche du spectre de photons de fluorescence et d'électrons initialement générés après création d'une lacune en couche K ou L₁ sur des atomes de platine. Distribution des vacances électroniques.

S	K					L _I				
PROCESSUS RADIATIFS										
f _{rad} (s)	96.3 %					11.4 %				
x	L ₃	L ₂	M ₃	M ₂	N ₃	M ₃	M ₂	N ₃	N ₂	L ₃
f _{rad} (s,x)	48 %	28 %	10 %	5 %	2 %	3 %	2.6 %	0.84 %	0.66 %	0.19 %
hν _{sx} (keV)	67.05	65.3	75.98	75.97	78.1	11.22	10.84	13.35	13.26	2.29
PROCESSUS NON-RADIATIFS										
f _{non-rad} (s)	3.7 %					88.6 %				
xy	L ₂ L ₃	L ₁ L ₂	L ₁ L ₁	L ₁ L ₃	L ₃ L ₃	L ₃ M ₅	L ₃ M ₄	L ₃ N ₅	L ₃ N ₄	L ₃ N ₇
f _{non-rad} (s,x,y)	0.74 %	0.66 %	0.43 %	0.41 %	0.32 %	30.8 %	23.4 %	3.5 %	2.9 %	2.6 %
e ⁻ _{sxy} (keV)	53.73	51.44	50.89	53.19	55.48	0.166	0.082	1.98	1.96	2.21

En résumé la comparaison irradiation au-dessus *versus* en dessous du seuil d'absorption K revient à intégrer plusieurs notions qui peuvent au bout du compte se compenser : des probabilités de générer des événements physiques 4 à 5 fois supérieures au-dessus mais dont les conséquences sont foncièrement différentes puisque le trou en couche K conduit à très peu d'électrons Auger très énergétiques et beaucoup de fluorescence d'énergie inférieure au seuil K. Si cette fluorescence est massivement réabsorbée, elle conduirait à la

création massive de trous en couche L, qui eux provoqueront avec une forte probabilité des électrons Auger de faible énergie, susceptibles d'être fortement toxiques à l'échelle nanoscopique s'ils sont éjectés directement au cœur de l'ADN.

Bien évidemment, à ce niveau, une simulation plus complexe des événements et de leurs conséquences s'impose et seule la technique de Monte-Carlo pourra préciser l'origine de la surtoxicité de l'irradiation au-dessus du seuil K comparée à celle réalisée en dessous, si elle est vérifiée expérimentalement. J'espère toutefois que les éléments physiques de ce paragraphe auront permis au lecteur d'appréhender la complexité des processus impliqués dans cette approche.

III.4. CONSEQUENCES POUR LE CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Compte-tenu des éléments évoqués au cours des chapitres précédents, les expériences que nous avons réalisées dans le cadre de ce travail de thèse ont porté sur les points suivants :

- Étude de la faisabilité de la tomographie par rayonnement synchrotron selon deux modes d'acquisition d'un couple d'images : en dessous/au-dessus du seuil d'absorption K d'un élément lourd véhiculé sous forme d'agent de contraste et avant/après injection. La comparaison de l'iode et du gadolinium a été réalisée puisque ce dernier doit théoriquement permettre une diminution de la dose à la peau et une optimisation du rapport signal/bruit, dans la mesure où les concentrations de Gadolinium accessibles peuvent pharmacologiquement être au moins égales à celles des composés iodés ;
- Recherche expérimentale de l'optimum d'énergie après irradiation de modèles (dosimétrique et cellulaire) enrichis massivement (1%) en agent de contraste (iode ou analogues) et mesure du gain de dépôt d'énergie par rapport au modèle non enrichi ;
- Introduction de faibles proportions d'atomes d'iode et de platine dans l'ADN cellulaire et comparaison de l'efficacité des traitements¹⁷ en fonction du choix de l'énergie d'irradiation (de part et d'autre du seuil K mais également pour des énergies différentes).

¹⁷ Différents critères d'efficacité de traitement seront évoqués

IV. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

IV.1. LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON

Le rayonnement synchrotron a été mis en évidence pour la première fois en 1947 au synchrotron de General Electrics. Considéré initialement comme une émission secondaire parasite¹⁸, ce rayonnement particulier est aujourd'hui l'outil privilégié de recherches fondamentales et appliquées dans une cinquantaine d'installations mondiales. Parmi elles, sept possèdent une ligne médicale, dédiée aux recherches concernant les applications médicales du rayonnement synchrotron. L'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble en fait partie des sources de 3^{ème} génération qui produisent un rayonnement d'une très grande brillance. Cet accélérateur d'électrons est uniquement utilisé comme source de rayonnement photonique UV ou X. Sa construction a débuté en 1988 et la mise en fonctionnement des 15 premières lignes de lumière a eu lieu en 1994. L'ESRF est un institut de recherche multinational, associant 16 pays. Plus de 40 lignes de lumières fonctionnent 24h/24, 7 jours par semaine, pour des recherches multidisciplinaires dans les domaines de la

¹⁸ pour les accélérateurs dédiés à l'étude de l'interaction de particules

physique, la chimie, les matériaux, la microélectronique, la pétrochimie, les cosmétiques et les sciences de la vie.

IV.1.1. Généralités

IV.1.1.1. Principe

Selon les équations de Maxwell, toute particule chargée soumise à une accélération émet des photons. Or une particule déviée par un champ magnétique est soumise à une accélération centripète. Par conséquent quand des électrons de haute énergie sont déviés par un champ magnétique intense, ils émettent des ondes électromagnétiques, appelées *rayonnement synchrotron*. Le rayon de la trajectoire circulaire¹⁹ conditionne la brillance et l'énergie du rayonnement synchrotron. Cette dernière dépend donc du diamètre de l'anneau de stockage (Figure IV-1) et son spectre couvre de manière continue le domaine des micro-ondes aux rayons X durs.

La qualité optique de cette source de lumière est caractérisée par sa brillance qui est directement reliée au flux de photons émis, mais également à la dimension du faisceau et à sa divergence. Globalement, une source de rayonnement synchrotron de 3^{ème} génération, comme l'ESRF, est 10^{12} fois plus brillante qu'un tube à rayons X classique (Figure IV-6).



Figure IV-1 : Vue aérienne de l'ESRF

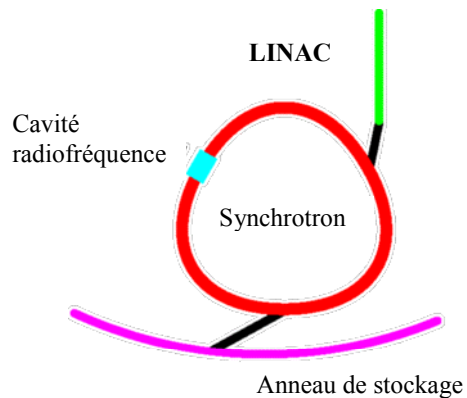


Figure IV-2 : Représentation schématique du système de production du rayonnement synchrotron

¹⁹ il s'agit en réalité d'un polygone à 64 cotés.

IV.1.1.2. Production et modes de fonctionnement

Les électrons sont initialement émis par un canon, puis sont accélérés par deux accélérateurs successifs: tout d'abord un accélérateur linéaire appelé LINAC, long de 16 m, qui amène les électrons à une énergie de 200 MeV ; ensuite, un accélérateur circulaire (ou synchrotron) de 300 m de circonférence qui accélère jusqu'à 6 GeV le paquet d'électrons émis par le LINAC (Figure IV-2). Le paquet d'électrons est alors injecté dans l'anneau de stockage. L'anneau de stockage est un assemblage de tubes en acier pur de la forme d'un polygone avec des aimants de courbure à chacun des sommets du polygone (Figure IV-3). Il fait 840 m de circonférence. A l'intérieur, le faisceau d'électrons circule dans le vide à une vitesse proche de celle de la lumière et est maintenu à une énergie de 6 GeV.

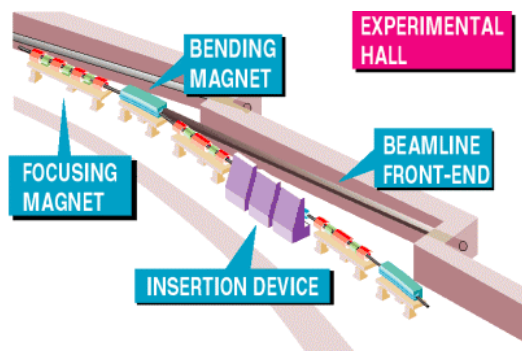


Figure IV-3 L'anneau de stockage et ses composants

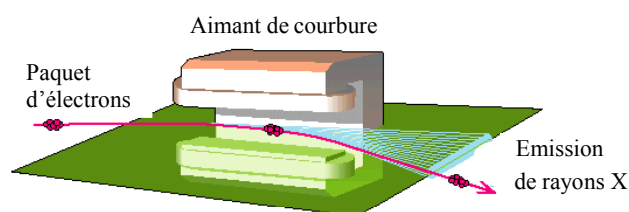


Figure IV-4: Schéma d'un aimant de courbure

L'anneau de stockage contient les éléments fonctionnels de la source de rayonnement X (schématisés sur Figure IV-3 ci-dessus):

- Les *aimants de courbure* : ils forcent les électrons à suivre une trajectoire courbe grâce à la force de Lorentz. C'est donc à leur niveau que la lumière synchrotron est émise, tangentiellement à la courbure de la trajectoire (Figure IV-4). Le rayonnement X est ainsi émis sous la forme d'un cône d'ouverture angulaire vertical très faible. L'anneau de stockage a 64 dipôles, chacun déviant le faisceau de 5.625° .
- Les *éléments d'insertion* : Ceux-ci sont la source de la très grande brillance des synchrotrons de 3^{ème} génération. Placés dans les sections droites de l'anneau de stockage (entre 2 aimants de courbure), ils comprennent une succession de petits aimants permanents dont l'aimantation est alternée de façon à produire un champ magnétique dont la force et l'orientation varient périodiquement le long de la structure magnétique. Le champ magnétique alterné produit par ces aimants force les électrons à osciller autour de leur trajectoire qui reste néanmoins globalement rectiligne. Du fait

que les cônes de lumière émis à chaque courbure se superposent, la lumière émise est beaucoup plus intense qu'à la sortie d'un aimant de courbure simple. Ces aimants permanents sont montés sur deux mâchoires mobiles qui peuvent être écartées ou rapprochées pour augmenter l'intensité du champ magnétique dans l'entrefer et par conséquent modifier le spectre des photons émis. Deux types d'éléments d'insertion sont utilisés : les wigglers, qui fournissent un spectre photonique continu dans la gamme choisie et les onduleurs qui concentrent les photons sur certaines énergies particulières (harmonique), créant ainsi une source de très grande intensité pour une énergie donnée (ajustable).

- Les *aimants de focalisation* : ce sont des lentilles magnétiques qui concentrent les électrons dans un faisceau de très petite taille et très faiblement divergent.
- Les *"front-ends"* : ce sont des obturateurs qui permettent au faisceau de rayons X d'arriver jusqu'à la ligne d'expérimentation (la ligne de lumière) quand ceux-ci sont ouverts.

Différents modes de remplissage de l'anneau de stockage sont possibles. Les plus extrêmes sont les modes multi-paquets (plusieurs paquets d'électrons se répartissent sur la circonférence²⁰ de l'anneau de stockage) et le mode mono-paquet. Le mode multi-paquets est couramment utilisé car il fournit un flux maximal aux lignes de lumières. En fonctionnement normal, l'anneau de stockage procure un courant de 200 mA pour une durée approximative de 50h. Les énergies perdues par le faisceau d'électrons sont compensées par 6 cavités accélératrices, opérant à la fréquence de 352 MHz.

IV.1.1.3. Organisation d'une ligne d'expérimentation

La ligne d'expérimentation, également appelée ligne de lumière, est schématiquement organisée en différents compartiments (Figure IV-5):

- La cabine optique, où le faisceau est conditionné et à l'intérieur de laquelle se trouvent, selon les besoins de la ligne de lumière, des monochromateurs ainsi que des miroirs déterminant la résolution spatiale. Une mise au point extrême peut être obtenue (jusqu'au micromètre) soit par des lentilles réfractives ou de Bragg/Fresnel.
- La cabine expérimentale, contenant le détecteur et les échantillons.
- La cabine de contrôle

²⁰ Par exemple pour le mode « 2/3 de remplissage », 1/3 de la circonférence de l'anneau est vide de paquet d'électrons

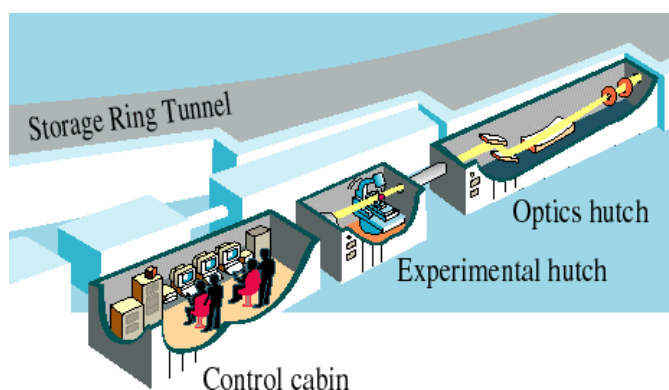


Figure IV-5: Une ligne de lumière et ses différentes cabines

Chacune des 40 lignes de lumière possède une technologie propre à ses applications: BM1A utilise la diffraction par un cristal unique pour étudier les structures des petites molécules, BM7 produit des rayonnements γ , ID18 est dédiée à la résonance nucléaire...

IV.1.1.4. Caractéristiques du faisceau blanc

Le rayonnement synchrotron possède des propriétés particulières qui le définissent :

- sa très grande brillance [Alta99], déjà évoquée précédemment (§ IV.1.1), qui ouvre des possibilités techniquement inaccessibles avec les sources de rayons X classiques (Figure IV-6), comme par exemple le travail en lumière monochromatique avec une résolution en énergie de l'ordre du meV ou encore la focalisation du faisceau sur des échantillons aussi petits que quelques μm^3 ;
- sa structure pulsée, qui permet l'étude de réactions chimiques ou biologiques très rapides puisque l'émission synchrotron générée par les paquets d'électrons est en réalité une succession de flashes lumineux apparaissant toutes les 100 ps environ ;
- son grand flux de lumière, qui associée à la faible divergence du faisceau, permet notamment de diminuer considérablement les durées des expériences ;
- sa polarisation linéaire naturelle (qui peut être également circulaire) favorisant l'étude de certaines propriétés magnétiques de la matière ;
- son large spectre d'énergie. L'ESRF est spécialisé dans les X durs.

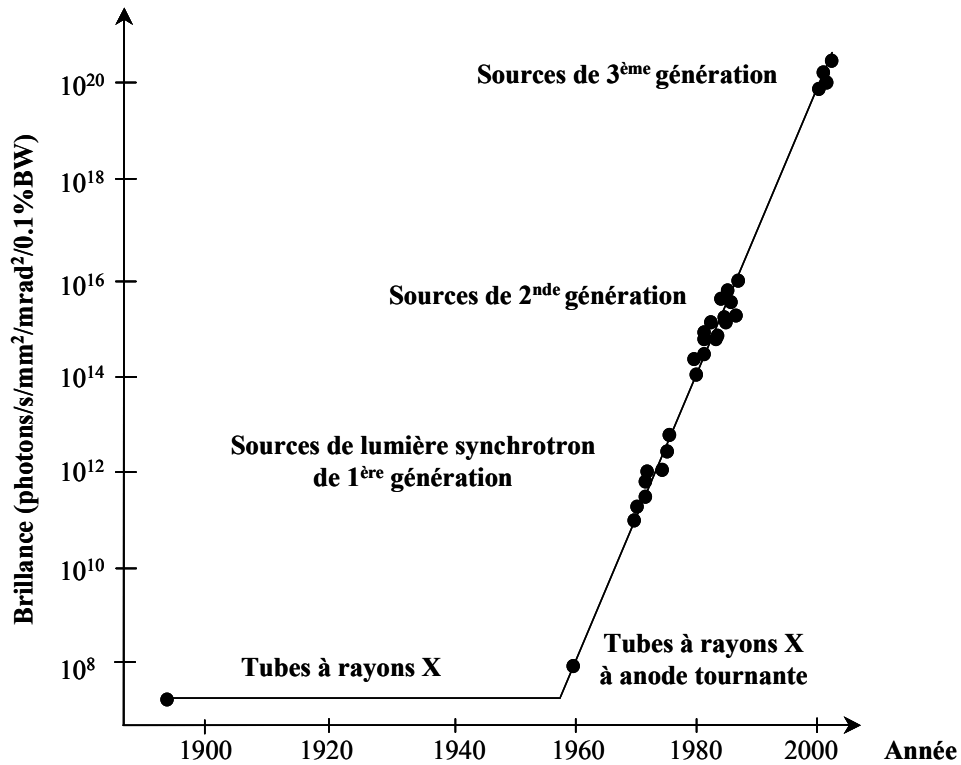


Figure IV-6 : Évolution de la brillance des sources de rayons X au cours du dernier siècle

IV.1.2. La ligne médicale ID17

Cette ligne de lumière est dédiée aux recherches médicales utilisant le rayonnement synchrotron, avec comme objectif ultime de les appliquer à l'homme [Thom00]. Toute l'instrumentation de cette ligne un peu particulière a donc été pensée pour satisfaire aux besoins très spécifiques qui en découlent [Elle99]. Elle se décompose en deux sous-unités prévues pour fonctionner en alternance : l'une d'entre elle, plus proche de l'anneau de stockage, concerne exclusivement la thérapie par micro faisceaux et l'autre, éloignée à 150 m du wiggler dans un bâtiment satellite, l'imagerie médicale (Figure IV-7).

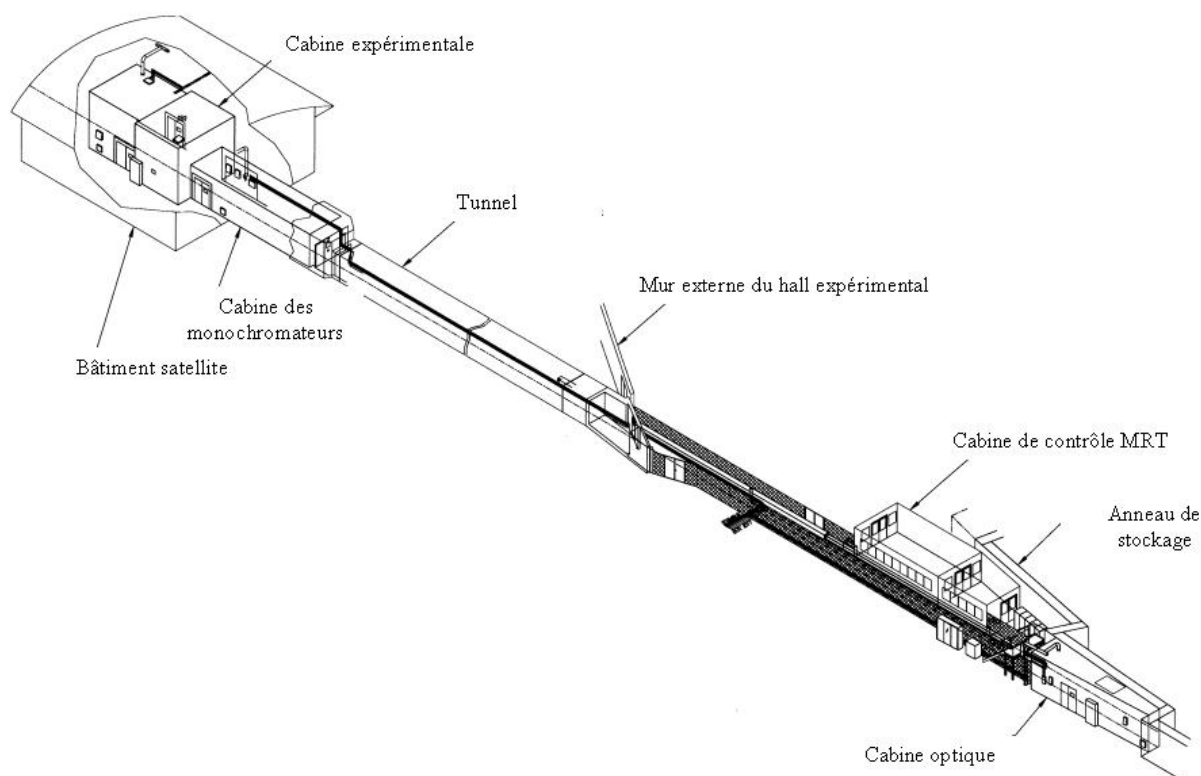


Figure IV-7 : Vue générale de la ligne médicale de l'ESRF (ID17 / BL14) d'après [Elle99].
 La cabine de contrôle MRT se trouve à 40 m de l'anneau de stockage contre 150 m pour le bâtiment satellite

IV.1.2.1. Projets relatifs aux applications médicales du rayonnement synchrotron

Sur la ligne médicale, les programmes de recherches actuels sont axés sur l'utilisation du rayonnement synchrotron en imagerie et en radiothérapie. Dans les deux cas l'objectif visé est bien entendu d'outrepasser les limites et les inconvénients liés à l'usage des sources de rayons X conventionnelles [Char96, LeBa85].

IV.1.2.1.1. Imagerie par rayonnement monochromatique

Le rayonnement *monochromatique* ouvre la voie au développement de nouvelles méthodes d'imagerie. En 1953, Jacobson publia le premier l'idée d'utiliser la variation discontinue de l'absorption des rayons X autour des seuils d'absorption d'éléments tels que l'iode ou le gadolinium, utilisés comme agents de contraste [Jaco53]. Il fallut néanmoins attendre le développement des sources synchrotron, pour rendre possible la production d'un rayonnement X monochromatique avec une intensité suffisante pour l'imagerie médicale. Cette méthode est à présent appliquée en mode radiographique et tomographique sur la ligne médicale.

L'angiographie coronarienne avec injection de produit de contraste par voie veineuse est le seul programme actuellement en cours de validation chez l'homme [Elle00b]. Cette étude concerne l'injection de produit de contraste iodé. Le patient est positionné sur une chaise se déplaçant verticalement. Pendant son déplacement, deux faisceaux de rayons X convergents et monochromatiques, se croisent au niveau du cœur du patient et sont détectés séparément. Deux images sont acquises ligne par ligne, l'une avec une énergie de rayons X réglée en dessous du seuil K du produit de contraste et l'autre au-dessus. Le coefficient d'atténuation total de l'iode étant le seul de tous les éléments présents à varier rapidement au niveau du passage de sa raie K, la soustraction des deux images permet d'obtenir l'anatomie du système vasculaire. En milieu hospitalier l'utilisation d'un cathéter artériel pour injecter le produit de contraste est nécessaire pour obtenir une image de qualité acceptable et comporte donc certains risques. En revanche l'injection intraveineuse possible avec le rayonnement synchrotron, permet de conserver une qualité d'image au moins aussi bonne que les angiographies traditionnelles, tout en étant moins invasive. L'utilisation de gadolinium, moins néphrotoxique que l'iode, comme produit de contraste a été étudié chez le porc [Este02, Fied00] et pourrait représenter un double avantage si son utilisation est validée chez l'homme. De plus le seuil d'absorption K du gadolinium étant d'énergie plus élevée que celui de l'iode, des patients de plus forte stature pourraient être imagés.

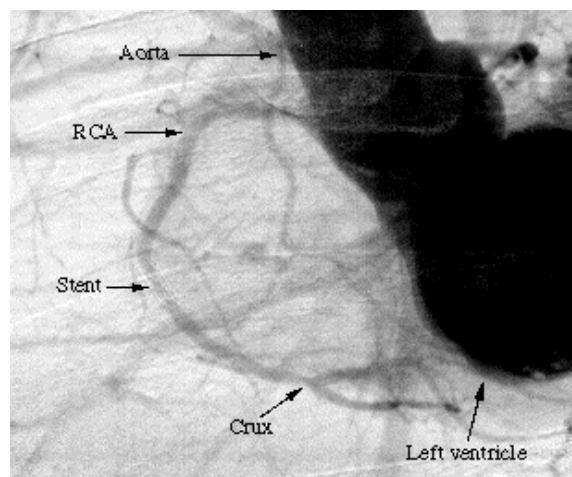


Figure IV-8 : Résultat de la première angiographie coronarienne humaine réalisée à l'ESRF en janvier 2000, d'après [Elle00b]

La tomodensitométrie par rayonnement synchrotron est actuellement dans une phase d'étude préclinique portant sur un modèle de gliome C6 chez le rat [Elle00a, LeDu00]. Pour obtenir les données nécessaires à la reconstruction des images en deux dimensions, le "patient" est installé sur une chaise en rotation alors que le faisceau reste fixe. Pour renforcer le contraste, un produit de contraste (iode ou gadolinium) est injecté afin de mieux visualiser

les néovaisseaux tumoraux. Nous verrons par la suite comment la monochromaticité du rayonnement synchrotron permet une quantification précise de la concentration de l'agent de contraste. En plus d'un outil combinant irradiation et imagerie en temps réel auquel nous aspirons, ce scanner quantitatif pourrait tout simplement devenir une technique de référence, non invasive et globale, permettant un diagnostic précis du degré d'évolution des tumeurs, en accédant à des paramètres fonctionnels tels que le volume sanguin cérébral [Aro94] ou la lésion de la barrière hémato-encéphalique [Legg99]. Ces paramètres de caractérisation de l'angiogenèse sont essentiels dans la mesure ou ils permettent de choisir la modalité thérapeutique adaptée au degré d'agression des tumeurs [Carm00].

Selon le même principe d'injection d'un produit de contraste, des travaux de bronchographie à haute résolution spatiale sont en cours au niveau de la raie K du xénon gazeux inspiré par des lapins [Baya01].

Le dernier domaine de l'imagerie médicale qui pourrait être amélioré par le rayonnement synchrotron est celui de la mammographie. La technique employée propose d'utiliser non seulement l'information transmise par l'objet à imager mais également celle diffractée [Chap97]. Ceci devrait permettre un meilleur discernement des tissus mous de densités proches avec une diminution de la dose à la peau [Moec00], deux finalités cruciales dans le cas du dépistage précoce du cancer du sein.

IV.1.2.1.2. Radiothérapie

Le principal programme de recherche concernant l'application du rayonnement synchrotron en radiothérapie est la radiothérapie par micro-faisceaux (MRT) [Slat95]. Cette technique brevetée [Slat94] se propose d'irradier des tumeurs cérébrales par des séries de micro-faisceaux plans de quelques dizaines de microns d'épaisseur espacés par des distances de l'ordre d'une centaine de microns. Ces micro-faisceaux sont polychromatiques, d'énergies comprises entre 50 et 150 keV. La répartition spatiale de l'irradiation permet de délivrer des doses considérables aux tissus tumoraux (quelques centaines de grays) tout en assurant une parfaite réparation des tissus sains [Lais98]. Les études en cours visent à étudier à plus long terme les effets de ce type d'irradiation sur le cerveau sain, ainsi que les mécanismes impliqués dans l'efficace régénération des zones saines. Elles pourraient aboutir à des protocoles d'irradiation d'enfants porteurs de tumeurs cérébrales puisque c'est pour eux qu'une irradiation du cerveau sain est la plus préjudiciable.

La seconde approche a été développée dans le cadre de cette thèse pour tenter d'exploiter différemment les propriétés du rayonnement synchrotron en radiothérapie

anticancéreuse : il s'agit du renforcement spécifique des interactions photoélectrique dans les tumeurs, grâce à l'application d'agents pharmacologiques.

IV.1.2.2. Caractéristiques du faisceau

Le faisceau synchrotron présente une géométrie parallèle très peu divergente. Ceci explique que la cabine expérimentale de la ligne médicale est située à 150 mètres de l'anneau de stockage pour assurer, dans sa dimension horizontale, une taille du faisceau ajustable de 0 à 150 mm. Par contre sa hauteur n'excède pas 10 mm ; elle est régulièrement réglée à une valeur inférieure au millimètre lors des expérimentations.

La brillance du faisceau synchrotron disponible à la sortie du wiggler de ID17 est comparée à celle d'un tube à rayons X sur l'illustration ci-dessous (Figure IV-9). En pratique, l'intensité et donc le débit de dose dans la cabine expérimentale sont également réglables grâce à l'interposition de blocs de Plexiglas.

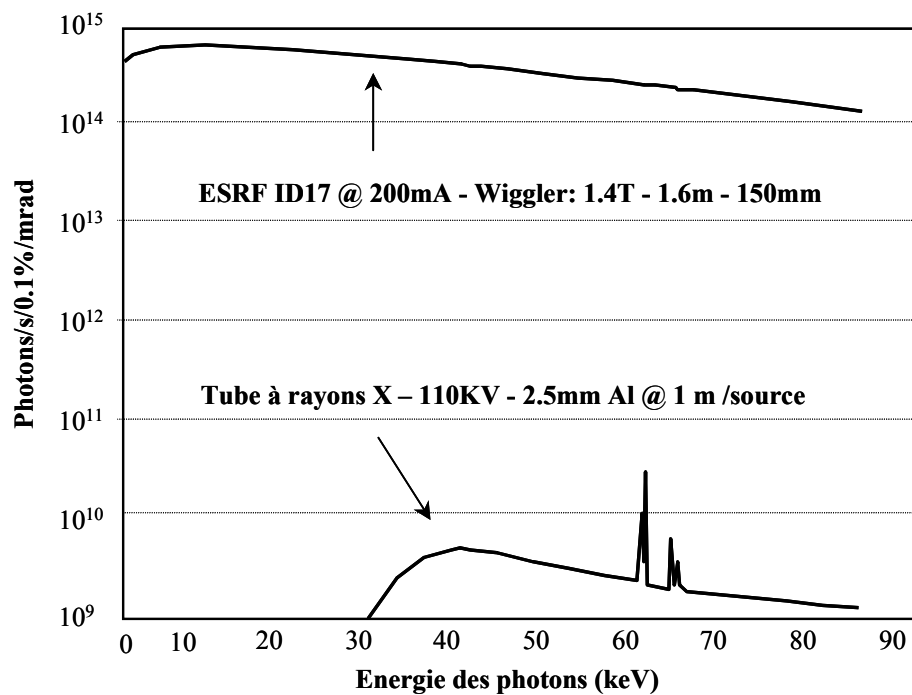


Figure IV-9 : Comparaison des spectres en énergie entre un tube à rayons X classique et le faisceau synchrotron disponible à la sortie du wiggler de ID17

IV.1.2.3. Instrumentation

L'ensemble de l'instrumentation du bâtiment satellite de la ligne médicale est prévue pour fonctionner dans deux configurations distinctes : angiographie et tomographie.

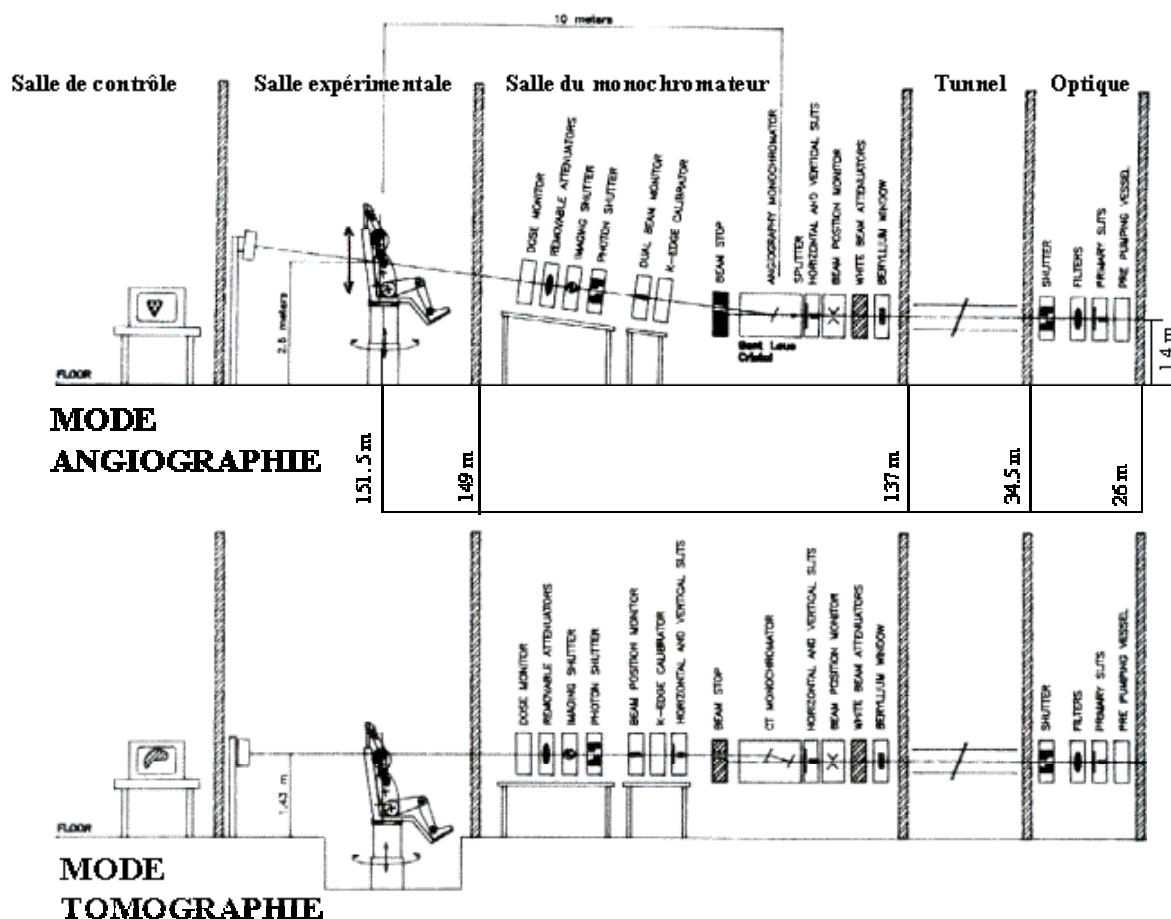


Figure IV-10 : Configurations possibles de la ligne médicale

IV.1.2.3.1. Monochromateurs

Les monochromateurs sont des systèmes optiques complexes qui permettent de sélectionner une bande d'énergie étroite (quelques centaines d'électron-Volts). Dans notre cas, ils sont constitués de cristaux de silicium Si (1 1 1) légèrement courbés et utilisés en géométrie de Laue, c'est-à-dire en transmission (Figure IV-11).

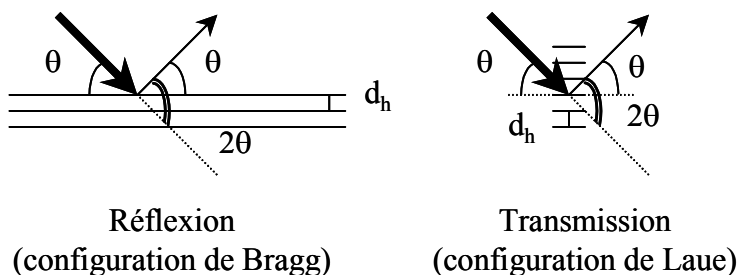


Figure IV-11 : Loi de Bragg, pour les géométries de Bragg et Laue

Le monochromateur surnommé *d'angiographie* utilise un seul cristal de silicium légèrement courbé, monté en géométrie de Laue et centré verticalement. Le faisceau blanc est diffracté par le cristal selon la loi de Bragg :

$$(Eq. IV-1) \quad 2 d_h \sin \theta = n \lambda = n \frac{hc}{E}$$

où d_h représente la distance réticulaire du réseau, soit $3.13542 \cdot 10^{-10} \text{m}$ pour Si (111) ;

θ est l'angle entre le faisceau incident et le cristal ;

n est un entier supérieur ou égal à 1 ;

λ (m) et E (J) sont respectivement la longueur d'onde et l'énergie du faisceau X diffracté ; h est la constante de Planck, $6.62 \cdot 10^{-34} \text{J.s.}$;

c est la vitesse de la lumière dans le vide.

Finalement l'angle de déviation entre le faisceau monochromatique résultant et le faisceau polychromatique initial est égal à 2θ (Figure IV-13). Un mince bloc de plomb localisé derrière le cristal, divise le faisceau convergent résultant en deux faisceaux qui se croisent exactement au niveau du patient. Les énergies des deux faisceaux sont très voisines séparées de quelques centaines d'électron-Volts seulement : elles peuvent donc être réglées de sorte à être situées de part et d'autre du seuil K d'un élément.

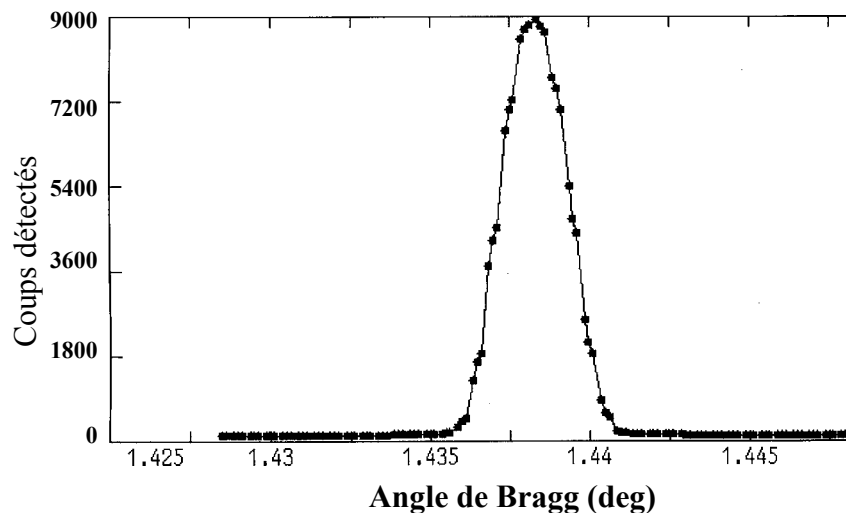


Figure IV-12 : Distribution spectrale d'un faisceau monochromatique réglé au-dessus du seuil K du platine (78.8 keV) avec le monochromateur de tomographie. La largeur totale à mi-hauteur de ce spectre est de 0.00249 pour un maximum situé à 1.438 degrés, soit 150 eV.

Pour le mode tomographie, le faisceau est ramené dans le plan horizontal après avoir traversé deux monocristaux de silicium parallèles et également légèrement courbés. Le faisceau transmis par le premier cristal possède un spectre centré sur la longueur d'onde λ mais de bande passante non nulle du fait de la courbure du cristal (cf. Figure IV-12). Le

second cristal affine la sélection et renvoie un faisceau quasi-monochromatique de longueur d'onde λ parallèle au faisceau polychromatique incident. Les deux faisceaux sont inclinés du même angle θ par rapport au faisceau incident (Figure IV-13).

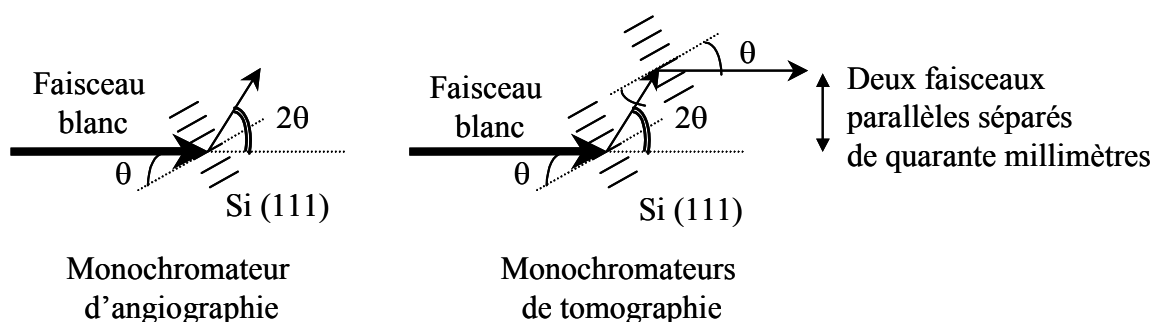


Figure IV-13 : Schéma de principe des monochromateurs d'angiographie et de tomographie

Pour une valeur de θ donnée, la formule de Bragg autorise la réflexion de tous les multiples de l'énergie E du fondamental ($n=1$). Ces harmoniques contaminent le faisceau monochromatique et limite ainsi la sélectivité énergétique du dispositif. La proportion d'harmoniques peut être diminuée en modifiant le gap entre les deux éléments du wiggler c'est à dire en contrôlant le faisceau polychromatique en amont du monochromateur. En effet, plus le gap est grand, plus le champ magnétique diminue. Il faut toutefois trouver un compromis entre un flux de photons suffisant et l'élimination des harmoniques. L'influence de ces harmoniques peut également être ressentie à la sortie d'objets très épais pour lesquels elles sont bien moins atténuées que le fondamental, ce qui modifie la proportion harmonique/fondamental.

La plage d'énergie couverte par les monochromateurs s'étend de 17 à 51 keV pour le mode angiographique et de 20 à 90 keV pour le mode tomographique [Suor00]. En raison des changements de configuration technique imposés par les différentes expériences, l'angle des cristaux par rapport au faisceau synchrotron n'est pas précisément fixé dans l'espace. Une calibration expérimentale de l'énergie est donc nécessaire à chaque expérience. Celle-ci est réalisée au moyen de l'enregistrement de l'intensité transmise par un échantillon de référence, constitué d'atomes dont le seuil d'absorption K correspond à l'énergie souhaitée (iode pour 33 keV, gadolinium pour 50 keV, platine pour 78 keV...). De légères variations de l'angle des cristaux monochromateurs autour de la valeur théorique permettent de mesurer les différences importantes d'absorption liées au passage du seuil et de déterminer expérimentalement l'angle de Bragg correspondant à l'énergie souhaitée (cf. Figure IV-14).

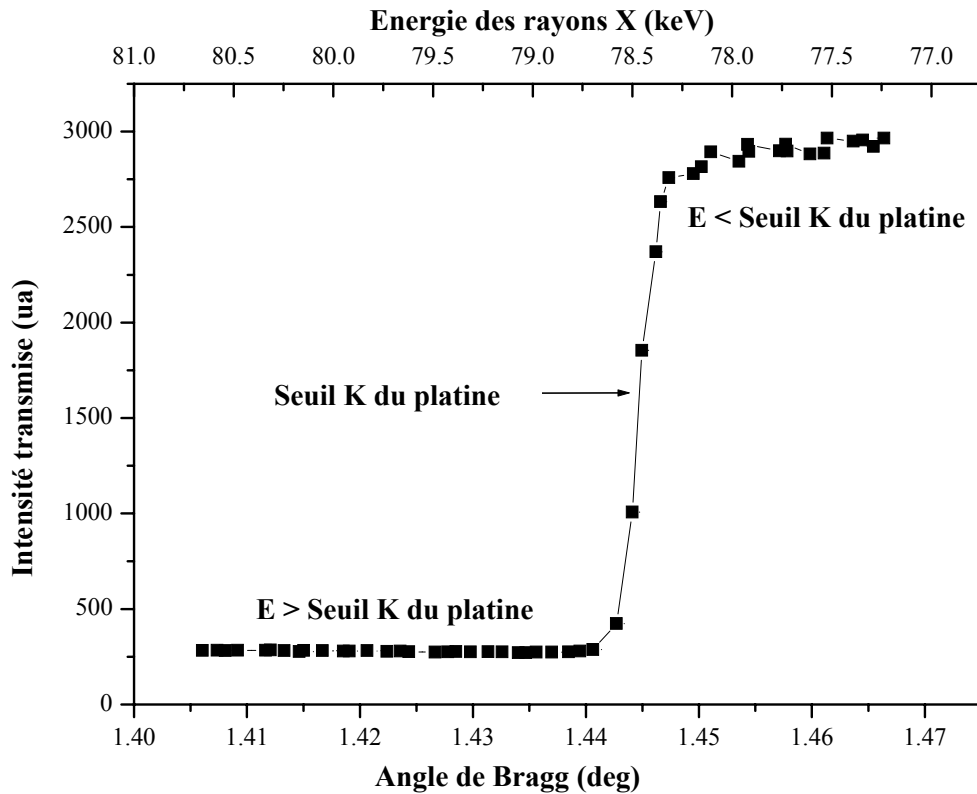


Figure IV-14 : Réglage de l'énergie du faisceau synchrotron au seuil d'absorption K du platine par enregistrement de l'intensité transmise au travers d'un échantillon de platine Goodfellow® de grande pureté lors du déplacement angulaire des monochromateurs de tomographie

IV.1.2.3.2. Système de positionnement du patient

Le faisceau produit par le monochromateur est linéaire et statique. Pour obtenir une image complète du système cardio-vasculaire, il est donc nécessaire de *déplacer* le patient devant le faisceau (après injection d'un produit de contraste). Une succession de déplacements verticaux permet d'obtenir plusieurs images à différents temps vasculaires. En tomographie, le patient doit effectuer une rotation pour obtenir les profils d'atténuation selon toutes les incidences nécessaires à une reconstruction tomographique. Le système de mobilisation du patient a du répondre aux spécifications très particulières de ces deux programmes. Il présente une très grande rigidité mécanique, permet de pré-positionner le patient selon sept degrés de liberté, et de le mobiliser devant le faisceau pendant l'acquisition de l'image (en translation pour l'angiographie et en rotation pour la tomographie). Les spécifications des deux modes d'imagerie ont abouti à la définition d'une structure mécanique complexe (4.5 tonnes !) qui permet de maintenir l'axe de rotation dans un cylindre de confusion de moins de 400 microns en mode tomographie avec une vitesse de rotation maximale de 180 degrés/s. En mode angiographie, la vitesse maximale de déplacement est de

50 cm/s sur une hauteur de 200 mm. Cette vitesse permet d'acquérir les images pendant la durée d'une diastole.

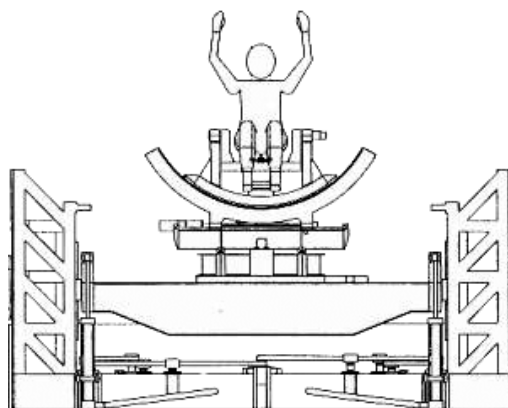


Figure IV-15 : Système de positionnement du patient

IV.1.2.3.3. Le système de détection

Le système de détection et d'acquisition de données est constitué d'un détecteur germanium haute pureté (Eurisys Mesures[®], Lingolsheim, France) et d'une électronique de mesure de grande dynamique (16 bits) (Novelec[®], Meylan) tous deux spécialement développés pour ces applications. Les deux modes d'imagerie nécessitent une grande dynamique de mesure car les variations d'atténuation du corps humain sont importantes aux énergies considérées (33 à 80 keV). Le bruit sur la mesure ne doit pas excéder le niveau de signal produit par quelques photons de 33 keV et la linéarité de la mesure doit être excellente puisque les différences de signaux entre les deux images soustraites ne dépassent pas quelques pourcents.

Le détecteur germanium a été conçu à partir d'un cristal de Germanium type P monolithique. Il est constitué d'une seule barrette, électriquement segmentée en deux lignes de 430 pixels de 1 cm de haut et 350 microns de large (Figure IV-16). En mode angiographie, les deux rangées espacées de 5 mm assurent la mesure simultanée des faisceaux aux deux énergies. En mode tomographie, une seule des barrettes est utilisée (un exemple de profil enregistré est donné sur la Figure IV-17). Long de 15 cm, il rassemble les avantages suivants: très bonne efficacité de détection (100% à 33 keV et 45% à 99 keV); grande dynamique de mesure ; conversion directe photons-courant ; effet photoélectrique dominant le processus d'absorption photonique ; parcours moyen des photo-électrons négligeable.

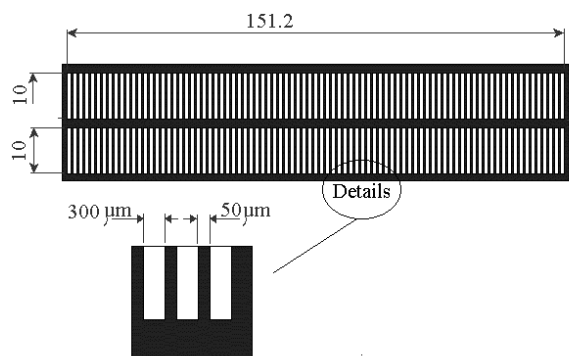


Figure IV-16 : Vue schématique du détecteur germanium

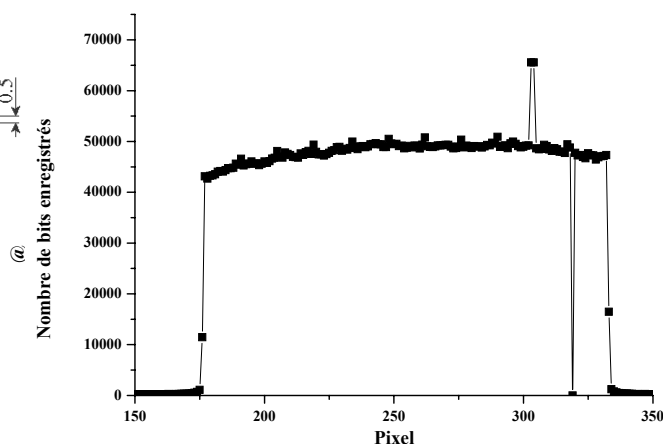


Figure IV-17 : Profil horizontal d'un faisceau monochromatique de 78 keV enregistré avec le détecteur Germanium à gain 1 pour 1 ms de temps d'intégration.

IV.2. LES AGENTS PHARMACOLOGIQUES ET COMPOSES CHIMIQUES

Le choix des paramètres expérimentaux (éléments lourds renforçateurs de l'effet photoélectrique, énergie d'irradiation) a fait l'objet de plusieurs compromis, basés certes sur des critères de sélection physique évoqués au chapitre III, mais également biologique, pharmacologique et pharmacotoxicologique. L'agent pharmacologique devait en outre absolument être compatible avec un usage *in vivo* et présenter si possible une certaine affinité pour les tumeurs. Le choix a donc été finalisé sur des critères de disponibilité sur le marché d'agents adaptés à ces contraintes. Certains composés non encore commercialisés ont néanmoins pu être obtenus grâce à la collaboration d'industriels, tels que Guerbet ou Schering.

IV.2.1. Les agents de contraste

Les agents de contraste décrits ci-dessous sont ceux classiquement utilisés en imagerie médicale, notamment en radiologie conventionnelle (à base d'iode ou de baryum) et en IRM (à base de gadolinium). Le mécanisme d'action des premiers est direct : ils atténuent les rayons X incidents et conduisent donc la formation d'un hyposignal sur l'image radiologique. Le mode d'action des agents de contraste en IRM est au contraire indirect puisque l'hypersignal détecté est produit par les interactions de l'agent de contraste avec les noyaux d'hydrogène du milieu, eux-même source du signal.

IV.2.1.1. Produits de contraste iodés

Les agents de contraste iodés actuellement disponibles peuvent être divisés en quatre classes : les monomères ioniques (les plus anciens, développés dans les années 1950), les monomères non-ioniques, les dimères ioniques et les dimères non-ioniques (les plus récents) [Stac01]. La structure de base de ces agents de contraste iodés est un cycle benzénique, sur lequel sont fixés trois atomes d'iode. Les monomères sont des molécules porteuses de trois atomes d'iode au total tandis que les dimères en possèdent six. Les propriétés physico-chimiques les plus importantes de ces agents sont leur solubilité, leur viscosité, leur osmolalité, leur hydrophilie ou encore leur charge électrique. Leur concentration en iode s'échelonne entre 150 et 400 mg/ml selon les composés. Les monomères non ioniques et les dimères ioniques sont des agents de contraste à faible osmolalité en comparaison des monomères ioniques, à haute osmolalité. Ils font partie de la gamme des produits iodés mieux tolérés et donc plus sûrs pour le patient. Les dimères non ioniques présentent quant à eux une iso-osmolalité. Le tableau ci-dessous présente les agents iodés testés dans le cadre de notre étude et leur mode d'utilisation habituel (Tableau IV-1).

Tableau IV-1 : Présentation des agents de contraste iodés utilisés

Marque	Laboratoire	Structure	Teneur en iode	Composé actif	Mode d'administration Posologie
Telebrix [®] 35	Guerbet France	Monomère ionique	350 mg/ml	Ioxitalamate de méglumine	Injection IA ou IV de 100 ml en TDM chez l'adulte
Hexabrix [®] 320	Guerbet France	Dimère ionique	320 mg/ml	Ioxaglate de Méglumine	Injection IA de 300 ml max chez l'adulte
Ioméron [®]	Byk France	Monomère non ionique	350 mg/ml	Iomeprol	Injection IV de 250 ml max chez l'adulte
Visipaque [®] 320	Nycomed S.A.	Dimère non ionique	320 mg/ml	Iodixanol	Injection IA, IV ou IC 150 ml TDM corps entier adulte

IV.2.1.2. Produit de contraste baryté

Le sulfate de baryum est un produit de contraste opaque aux rayons X utilisé principalement en radiologie digestive. Il peut être administré par voie orale (dose habituelle

chez l'adulte : 150g en suspension dans l'eau) ou rectale (400g). Nous avons choisi d'utiliser du Micropaque[®] comme substitut aux produits de contraste iodés : en effet, les propriétés dosimétriques du baryum sont voisines de celles de l'iode mais la réactivité chimique et la structure de la molécule différentes en faisaient un candidat attrayant pour la confection des dosimètres chimiques de type gel de Fricke. Le sulfate de baryum est pratiquement insoluble dans l'eau et les solvants organiques.

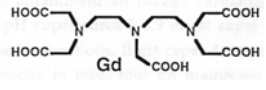
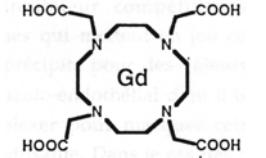
Tableau IV-2 : Présentation de l'agent de contraste baryté utilisé

Marque	Labo.	Structure	Formule	Teneur en baryum	Composé actif	Mode d'administration Posologie
Micropaque [®]	Guerbet France	Monomère ionique	100 g de BaSO ₄ dans 500 ml solution F _w =233.4 daltons	117.6 mg/ml	Sulfate de Baryum	Voie orale ou rectale – 500 ml de produit pur max

IV.2.1.3. Produits de contraste paramagnétiques

Le gadolinium est le métal paramagnétique qui contient le plus grand nombre d'électrons non appariés (7); c'est pour cette raison qu'il a été choisi comme agent rehausseur de contraste en IRM avec le fer et le manganèse [LeDu96]. Néanmoins le gadolinium ne peut être injecter sous sa forme libre (chlorure de gadolinium) du fait de sa toxicité aiguë. Il est cependant possible de le complexer, notamment par des chélates, pour masquer cette toxicité tout en gardant son efficacité. Différents agents de contraste à base de gadolinium sont disponibles sur le marché. Dans le tableau ci-dessous sont indiqués les agents utilisés dans le cadre de cette étude (Tableau IV-3). Ces agents de contraste ne sont pas purement intravasculaires, ils diffusent dans le liquide interstitiel. Injectés par voie intraveineuse, les complexes de gadolinium tels que le gadopentate ou le gadotérate de méglumine se répartissent dans le système vasculaire et l'espace interstitiel, sans augmenter la volémie, ni perturber l'équilibre hémodynamique. Ils ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique saine. Chez les patients à fonction rénale normale, sa demi-vie plasmatique est d'environ 90 minutes. Ils sont éliminés par voie rénale sous forme inchangée et ne franchissent la barrière placentaire que très lentement.

Tableau IV-3 : Présentation des agents de contraste paramagnétiques utilisés

Marque	Laboratoire	Formule	Teneur en gadolinium	Composé actif	Mode d'administration Posologie
Magnevist®	Schering Allemagne		0.5 mol/l 78.5 mg/ml	Gadopentetate de méglumine	Injection IV 0.1 mmol/kg chez l'adulte (0.2 ml/kg)
Dotarem®	Guerbet France		0.5 mol/l 78.5 mg/ml	Gadoterate de méglumine	Injection IV 0.1 mmol/kg chez l'adulte (0.2 ml/kg)
Gadovist®	Schering Allemagne	$C_{18}H_{31}N_4O_9Gd$	1 mol/l 157 mg/ml	Gadobutrol	En cours d'étude

IV.2.2. Les vecteurs d'atomes étrangers dans l'ADN

Atteindre l'ADN d'une cellule pour y déposer des atomes lourds n'est pas un objectif facile à atteindre. Il n'est pas sans conséquence non plus : perturbée, la cellule peut voir son comportement se modifier ou même ne pas survivre à cette agression. Pour trouver des vecteurs susceptibles d'y parvenir, nous nous sommes intéressés à des agents pharmacologiques essentiellement utilisés comme drogues de chimiothérapie ou radiosensibilisant. Nous soulignerons toutefois qu'un marqueur de fluorescence nous a également servi de modèle, d'autant plus attrayant que sa toxicité envers les cellules était nulle.

IV.2.2.1. L'IUdR, un analogue de base de l'ADN

L'iodo-désoxyuridine (IUdR) est un analogue de thymidine pour lequel le groupement méthyl situé en position 5 de l'anneau pyrimidine a été remplacé par de l'iode (Figure IV-18).

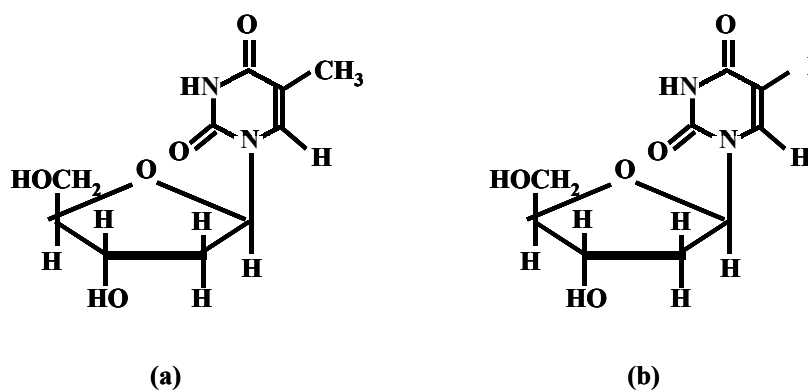


Figure IV-18 : Structures de la thymidine (a) et de son analogue, l'iodo-désoxyuridine (b) d'après [Pomp94]

Ce composé a été synthétisé par Prusoff en 1959, pour l'utiliser comme agent antinéoplasique [Prus59]. Il s'incorpore dans l'ADN des cellules en cycle (phase S) (cf. § II.4.3.3 p.53). Du fait de leur croissance cellulaire rapide, les tumeurs sont donc une cible potentielle privilégiée, tout comme les tissus normaux à division rapide (moelle osseuse par exemple). Si l'utilisation de l'IUdR seul n'entraîne qu'une cytotoxicité limitée, il provoque par contre une radiosensibilisation s'il est intégré à l'ADN avant l'irradiation [Kap61]. Cette action radiosensibilisante semble être due à la libération du radical halogéné après attaque par un radical libre, ce qui provoque une instabilité dans l'architecture de l'ADN [Prus59]. A ce jour la rapide déhalogénéation *in vivo* de ces composés [Klec85] combinée à la radiosensibilisation gênante de l'ensemble des tissus sains à fort pouvoir de prolifération empêche une utilisation fiable par injection intraveineuse et pousse à la recherche d'autres modes d'injection [Mair00, Sgou98]. L'efficacité d'une administration loco-régionale a ainsi pu être montrée [Kass00b, Kass96].

Tableau IV-4 : Présentation de l'analogue de thymidine utilisé

Nom	Fournisseur	Conditionnement	Formule	Teneur en iode	Mode d'administration Posologie
IUdR	Pharmacie du CHUV de lausanne	Lyophilisée 200 mg à réhydrater dans 10 ml	$C_9H_{11}IO_5N_2$ $F_w=354.1$ daltons	0.0565 mol/l 7.16 mg/ml	Injection IV – collyre – local 100 mg/kg/jour

Les principales propriétés de l'iodo-désoxyuridine reconnues en clinique à ce jour sont l'action de cet agent sur certains adénovirus, cytomégalovirus et virus herpétique ; le marquage de l'activité métabolique du fait de la structure analogue à celle de la thymidine et enfin son action antimétabolique. Le marquage de l'IUdR par des radio-isotopes de l'iode, notamment émetteurs Auger tels que l'iode 123 ou 125 a été fréquemment reporté dans la littérature [Kass96, Kass99, Nesh98, Smit01].

IV.2.2.2. Agents à comportement alkylant

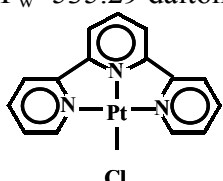
Sous cette formulation nous avons réuni des agents capables de réagir avec la structure de l'ADN et d'y former des liaisons covalentes.

IV.2.2.2.1. Le chloroterpyridineplatinum

Le chloro(2,2' :6',2''-terpyridine)platinum(II) chloride dihydrate (PtTC) est un marqueur de fluorescence, principalement utilisé au laboratoire pour marquer les lésions de

l'ADN après irradiation. Notre intérêt pour ce composé chimique s'explique par sa capacité à s'insérer dans la double hélice de l'ADN [Jenn74]. Celle-ci a déjà été exploitée par d'autres auteurs pour montrer sur des plasmides (secs puis hydratés) que l'excitation, autour de leur seuil L_{III} (11.5 keV environ), des atomes de platine ainsi fixés induit une augmentation du nombre de cassures simple et double brins de l'ADN [Koba02, LeSe01].

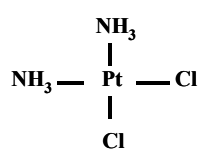
Tableau IV-5: Présentation du chloroterpyridine platinum utilisé

Dénomination	Fournisseur	Conditionnement	Formule	Teneur en platine
PtTC	Fluka	Lyophilisé 25 mg à réhydrater dans 2.5 ml	$C_{15}H_{11}Cl_2N_3Pt_2H_2O$ $F_w=535.29$ daltons 	18.7 mmol/l soit 3.64 mg/ml

IV.2.2.2.2. Le cis-diamminedichloroplatinum (II)

Le cisplatine ou cis-diamminedichloroplatinum est un agent antinéoplasique cytostatique dont les principales indications thérapeutiques sont les cancers du testicule, de l'ovaire, des voies aérodigestives supérieures et du poumon. Le tableau ci-dessous présente le produit commercial utilisé pour notre étude.

Tableau IV-6 : Présentation du cisplatine utilisé

Marque	Labo.	Présentation	Formule	Teneur en platine	Mode d'administration Posologie
Cysplatyl®	Bellon France	Solution 1 mg à réhydrater dans 10 ml	$PtH_6N_2Cl_2$ $F_w=300$ daltons 	3.36 mmol/l soit 0.65 mg/ml	Injection IV ou IP ²¹ 100 mg/m ²

Historique

La découverte dans les années 60 de l'activité anti-tumorale des sels de platine est le résultat d'une observation fortuite de Rosenberg *et al.* pendant l'étude de l'effet du courant

électrique sur la croissance bactérienne. Quand un courant alternatif est délivré par des électrodes en platine dans un bouillon de culture, la division des cellules est stoppée, les cellules forment alors de longs filaments. Comme ces filaments se forment quand les bactéries sont traitées avec des agents alkylants ou bien quand elles sont irradiées, Rosenberg suspecta la présence d'une substance active dans le milieu de culture. Les sels de platine sont en fait libérés des électrodes par l'électrolyse de l'hexachloroplatine qui en présence de sels d'ammonium, génère un complexe platiné $\text{Pt(II)(NH}_3)_2\text{Cl}_2$, aujourd'hui connu sous le nom de cisplatine (CDDP ou cis-diamminedichloroplatinum). Quelque temps plus tard il mit en évidence l'activité antitumorale de ces sels de platines [Rosen69], dont le cisplatine s'avère le plus actif. Son isomère, le trans-diamminedichloroplatinum, présente à ce titre une activité antiproliférative pratiquement nulle ce qui laisse suggérer une nature régiospécifique de leur fixation sur les molécules cibles. Les dérivés du platine (cisplatine, carboplatine et oxaliplatine) ont par la suite constitué un progrès majeur dans le traitement des tumeurs solides ... une fois maîtrisée l'importante néphrotoxicité du cisplatine.

Réactivité du cisplatine et pharmacologie cellulaire

Le mécanisme d'action du cisplatine n'est pas totalement élucidé. Toutefois il a été montré que l'effet biologique des complexes aminés du platine résulte principalement de leur interaction avec les acides nucléiques. En effet la fixation préférentielle sur les sites nucléophiles intracellulaires, et en particulier les bases nucléotidiques, permet de supposer que l'ADN constitue la cible critique du cisplatine [Rosen85]. Un des arguments les plus convaincant fut sans doute la mise en évidence d'une cytotoxicité accrue du cisplatine sur des lignées cellulaires déficiente en système de réparation de l'ADN [Robe78].

L'entrée du CDDP dans la cellule se fait par simple diffusion ou par transport actif. Les deux atomes de chlore sont stables dans le milieu extracellulaire, mais le passage dans le milieu intracellulaire dans lequel la concentration en chlore est beaucoup plus faible (~3-20 mM), facilite l'échange des chlores contre des groupements hydroxyles ou une molécule d'eau (Figure IV-19) [Reed90]. Il existe plusieurs cibles pour le CDDP : l'ADN, l'ARN ou les composés soufrés comme le glutathion. Mais la cible moléculaire la plus affectée par les dérivés du platine est l'ADN génomique. La liaison du CDDP à l'ADN entraîne la formation d'adduits qui conduisent à la mort cellulaire s'ils ne sont pas éliminés.

²¹ *Intrapéritonale*

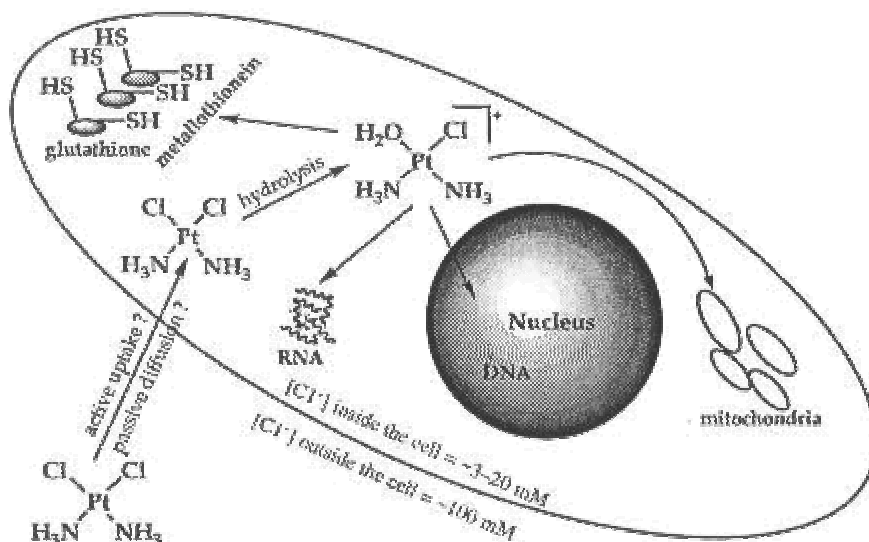


Figure IV-19 : Cibles cellulaires du cisplatine

Interactions cisplatine – ADN

Certains dérivés du platine présentent des propriétés similaires à celles des agents alkylants. La cytotoxicité de ces composés est étroitement liée au taux de platine de l'ADN. Le CDDP sous sa forme hydratée interagit principalement avec l'atome d'azote N⁷ de la guanine. La plupart du temps, cet adduit monofonctionnel ne constitue qu'un état de transition. Rapidement un deuxième site de fixation est touché, conduisant à la formation d'adduits (ou ponts) intrabrins, interbrins et intermoléculaires (cf. Figure IV-20) [Ree87].

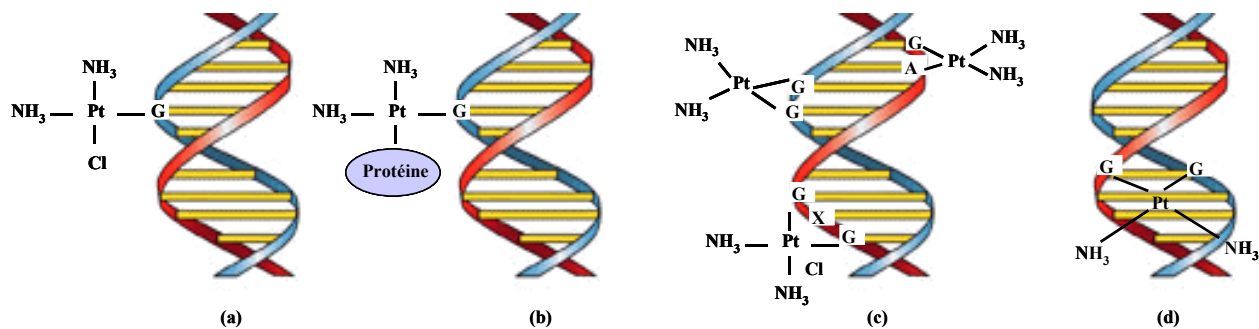


Figure IV-20 : Types d'adduits possibles après exposition de l'ADN au cisplatine. Monofonctionnel (a) et Bifonctionnel : sur protéine (b), intrabrins (c) et interbrins (d)

Des études sur ADN purifié, aussi bien que sur des cellules en culture, ont montré que les proportions relatives des lésions provoquées par le cisplatine se répartissent comme suit [East90, Fich85] :

- environ 65 % d'adduits intrabrins entre deux guanines adjacentes [d(GpG)] ;
- environ 25 % d'adduits intrabrins entre une adénine et une guanine voisines d(ApG) ;

- environ 10% d'adduits intrabrins entre deux guanines séparées par une base d(GpXpG)
- moins de 1% de pontages interbrins.

Tous ces adduits se caractérisent par une forte stabilité chimique [Ree91]. A forte dose de cisplatine, ils sont considérés comme responsables de sa cytotoxicité [She96]. Comme pour de nombreux autres poisons, la molécule d'ADN est à ce point altérée que les mécanismes de transcription (synthèse de protéines) sont perturbés et conduisent à la mort cellulaire. Ce type d'action n'explique toutefois pas l'efficacité sélective du cisplatine pour les cellules tumorales.

Activité antitumorale

Aucun des médicaments antinéoplasiques utilisés en chimiothérapie n'est véritablement spécifique des cellules tumorales : ils agressent également les cellules normales. En effet, la sélectivité dans leur toxicité provient généralement d'un mode d'action faisant intervenir la division cellulaire. L'activité antinéoplasique *sélective* du cisplatine pourrait quant à elle découler de l'instabilité génétique des cellules tumorales, caractérisant leur mutabilité. Les adduits formés dans leur ADN les rendent plus vulnérables que les cellules normales et provoquent l'arrêt de la croissance tumorale. Les principales hypothèses formulées pour expliquer cette interaction sont l'inhibition de la synthèse de l'ADN, l'introduction de défauts dans les systèmes de réparation cellulaire ou encore l'activation de l'apoptose [East90].

En combinaison avec les radiations ionisantes

La première évidence de l'interaction entre le cisplatine et le rayonnement a été décrite par Zak et Drobnik [Zak71]. Ils ont montré que le cisplatine influençait la létalité post-irradiation chez des souris en fonction de l'heure d'administration de la drogue et de la dose de rayonnement. Aujourd'hui, plusieurs études ont été publiées sur les associations concomitantes du cisplatine et de la radiothérapie [Dewi87, Doup80]. Des résultats contradictoires y sont reportés et à ce jour aucun accord général n'existe sur la dose, le moment et l'ordre d'administration entre la chimiothérapie et la radiothérapie [Dewi87]. Les mécanismes impliqués dans l'interaction cisplatine rayonnement restent hypothétiques, étant donné que les altérations induites par le cisplatine dans la cellule sont complexes au point d'ignorer les processus qui déterminent son activité cytotoxique finale. Des études de radiolyse pulsée ont montré que le cisplatine réagissait avec les électrons aqueux donnant des intermédiaires Pt(I) qui se stabilisent en Pt métallique Pt(0) conduisant à l'hydrolyse des

complexes de CDDP [Rich81]. Ceux-ci fixeraient ainsi un dégât de l'irradiation qui aurait pu être réparé en l'absence de cisplatine. La présence d'oxygène [Rich78] et la quantité de thiols non liés aux protéines semblent également jouer un rôle [Biag83]. D'autre part, la formation d'adduits est considérée comme un événement létal à part entière [Bar85]. Un modèle, développé par Chadwick *et al.*, suggère d'ailleurs une analogie entre la théorie moléculaire de la mort cellulaire radio-induite et l'effet des composés platinés [Chad76]. L'effet de la drogue combiné à celui du rayonnement serait donc supra-additif. Le complexe platiné fixé sur l'ADN gêne voire inhibe l'action des systèmes de réparation cellulaire. La présence d'adduits dus au cisplatine semble empêcher la réparation des dégâts par suture non-homologue [Myin02] en rendant impossible le coulisement sur l'ADN de la sous-unité Ku du complexe DNA-PK [Turc00]. D'ordinaire minoritaire chez l'homme (cf. § II.3.1.2 p.31), la recombinaison homologue devient donc le seul mode de réparation possible pour la cellule traitée au cisplatine.

Toxicité

La forte toxicité du cisplatine pour certains tissus sains (oreille interne, reins par exemple) pose un sérieux problème clinique et pousse aux recherches d'utilisation d'autres dérivés platinés, comme le carboplatine ou l'ipropaltine [O'ha86, Scal99, Yang95a]. Ceux-ci pourraient même, grâce à des profils toxiques différents permettant une forte concentration intracellulaire, permettre d'augmenter l'action cytotoxique des rayonnements ionisants dans une plus grande mesure que le cisplatine [Scal99].

IV.2.3. Bilan

Les agents pharmacologiques et les agents chimiques étudiés possèdent donc non seulement des modes d'action différents, mais sont de plus porteurs de quantités d'atomes lourds très différentes. Si les agents de contraste iodés sont pris arbitrairement comme référence (teneur en iode = 300 mg/ml), nous retiendrons que :

- le sulfate de baryum véhicule des quantités de baryum trois fois moindre ;
- les agents de contraste paramagnétiques usuels transportent des quantités de gadolinium quatre fois moindre ;
- l'iodo-désoxyuridine contient quarante fois moins d'iode ;
- le PtTC possède une teneur en platine cent fois moins élevée ;
- le cisplatine, enfin, minimise le tout en affichant une masse volumique de platine 450 fois moindre.

La localisation subcellulaire de ces agents pourra éventuellement compenser leur faible teneur en élément lourd, dans l'hypothèse où celle-ci favoriserait un dépôt d'énergie beaucoup plus localisé. Par contre, il est bien évident que pour des agents à comportements semblables, la quantité d'atomes lourds véhiculés sera un élément essentiel de notre étude et pourra conduire à l'administration de quantités d'agents pharmacologiques beaucoup plus élevées pour observer des iso-effets.

IV.3. TECHNIQUES DE DOSAGE DES ELEMENTS LOURDS

L'élément crucial de notre étude fut d'être en mesure de pouvoir répondre à cette question : en quelle quantité l'agent pharmacologique était-il présent dans sa cible ? Cette connaissance de la biodistribution de l'élément lourd assurait ainsi une double sécurité : elle donnait tout d'abord la certitude que la cible de l'irradiation était atteinte et pouvait ensuite informer de la quantité d'événements physiques déclenchés sur les atomes cibles. Dans la mesure où la réponse à cette question était proprement donnée, le renforcement de l'irradiation par effet photoélectrique sur l'élément lourd véhiculé par l'agent pharmacologique pouvait alors être étudié, sans crainte qu'un biais expérimental ne vienne fausser les résultats et surtout avec l'espoir qu'une relation puisse être prouvée entre la quantité d'élément lourd présent et la radiotoxicité du traitement. A l'inverse, cette relation, si elle existe, pourra devenir un facteur prédictif de l'efficacité d'une radiothérapie binaire par rayonnement synchrotron, rehaussée par interaction photoélectrique.

IV.3.1. *In vivo* : Objectifs de la SRCT

Les objectifs de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron (SRCT pour Synchrotron Radiation Computed Tomography) ont été décrits au paragraphe § IV.1.2.1.1. p.107. Celle ci est originellement le principal thème de recherche de l'équipe d'accueil RSRM. Chronologiquement, c'est donc à cette thématique que nous nous sommes tout d'abord intéressé, avant de vouloir l'utiliser comme l'outil d'une irradiation à visée thérapeutique, dont nous devons montrer l'efficacité *in vitro*. Nous présentons dans ce paragraphe le principe général de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron, qui permet l'obtention de cartographies de la pathologie cérébrale tumorale, résolues en concentrations d'agents de contraste.

IV.3.1.1. Principe général de la méthode

IV.3.1.1.1. Tomodensitométrie conventionnelle : rappels

La tomodensitométrie (ou scanner) est une technique d'imagerie numérique tridimensionnelle. Elle est basée sur l'enregistrement multi-angulaire des profils d'atténuation de rayons X classiques²², transmis au travers du corps humain (cf. Figure IV-21). L'information obtenue est un *sinogramme* ou ensemble des profils d'atténuation enregistrés en fonction de l'angle de la projection (voir à titre d'illustration le sinogramme de la Figure IV-25 p.132).

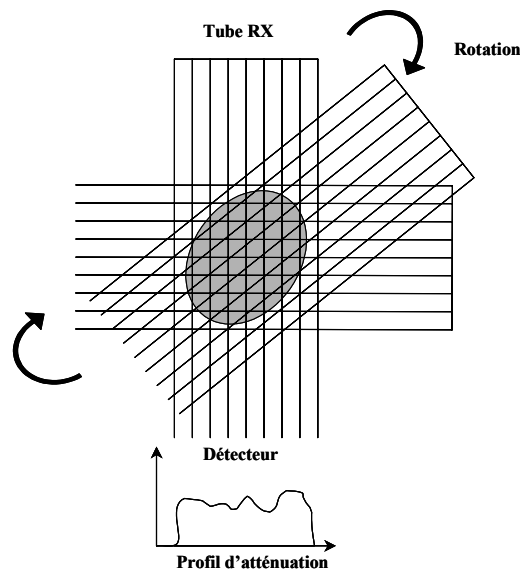


Figure IV-21 : Principe d'acquisition d'une image tomographique

Pour chaque projection, l'information enregistrée par le détecteur numérique est donc le profil d'intensité de rayons X transmise par l'épaisseur du patient, constitué d'une infinité d'éléments hétérogènes. En généralisant l'équation (Eq. III-1) p.77, celle-ci est donnée par la relation :

(Eq. IV-2) :
$$I = I_0 \exp\left(-\int \mu_{tot}(z) dz\right)$$

où I_0 est l'intensité des rayons X incidents (enregistrée par un détecteur de référence) et $\mu_{tot}(z)$ est le coefficient linéique d'atténuation totale de l'élément volumique d'épaisseur dz , pour l'énergie moyenne des photons vus à cette profondeur.

²² et donc polychromatiques, d'énergie effective supérieure à 60 keV

L'image anatomique transverse est reconstruite par un algorithme de rétroprojection filtrée. Cette reconstruction mathématique réalise une rétropropagation de chaque profil selon son angle d'incidence dans une matrice de pixels vierges et élimine, grâce à la convolution de chaque projection par le filtre rampe, la contribution de cette rétropropagation dans les pixels non concernés de l'image.

En scanographie, le paramètre physique à la base du contraste dans l'image est le coefficient linéique d'atténuation totale μ . Une échelle standardisée, l'échelle de Hounsfield, est utilisée sur l'ensemble des tomographes pour s'affranchir des variabilités dans les qualités des différents faisceaux :

(Eq. IV-3) :

$$N_H = 1000 \frac{\mu_{\text{tissu}} - \mu_{\text{eau}}}{\mu_{\text{eau}}}$$

Cette échelle repose sur deux valeurs particulières : -1000 pour l'air et 0 pour l'eau. En pratique elle s'étend au-delà de +1000 pour l'os dense. Une dynamique de 12 bits (4096 niveaux) est ainsi disponible. Sur l'écran vidéo, celle-ci est ramenée aux 16 niveaux de gris usuels par fenêtrage adapté au contraste recherché et aux tissus examinés.

IV.3.1.1.2. Avantages et inconvénients du rayonnement monochromatique en tomodensitométrie

Lors de la traversée du patient par les rayons X issus d'un tomographe conventionnel, les photons de plus basse énergie sont relativement plus atténués que les photons de plus haute énergie du spectre. Ce phénomène appelé *durcissement du faisceau* conduit en profondeur à des atténuations par unité de longueur de plus en plus faible pour un même tissu. Dans les algorithmes de reconstruction, l'absorption est décrite par l'équation d'atténuation d'un rayonnement monochromatique (d'énergie égale à l'énergie effective ou moyenne du spectre) ce qui induit des artéfacts, comme par exemple la mauvaise estimation du coefficient d'atténuation en profondeur. Le principal avantage du rayonnement synchrotron monochromatique est donc de s'affranchir pratiquement²³ totalement de ce phénomène de durcissement : quelque soit l'épaisseur de l'objet traversé, l'énergie du rayonnement X est connue. C'est de cette propriété fondamentale qu'est rendue possible la détermination de la concentration absolue en agent de contraste dans chaque pixel de l'image. D'autre part, la très faible divergence du faisceau (cf. § IV.1.2.2 p.110) procure une nette diminution de la

contribution du rayonnement diffusé à la formation de l'image du fait de l'éloignement du système de détection par rapport à l'objet à imager (6 mètres).

Même si l'évolution technologique permet d'espérer qu'un jour des micro-sources synchrotron pourront exister dans chaque hôpital, l'utilisation du rayonnement synchrotron demeure actuellement très coûteuse et d'accès très limité. Ceci est probablement son principal inconvénient. D'autres limitations existent, telles qu'une résolution temporelle assez faible puisqu'elle est limitée par la vitesse de rotation acceptable pour la physiologie du patient : en effet, contrairement aux scanners classiques, le rayonnement synchrotron n'est pas en mesure de tourner autour de l'objet à imager. Le détecteur représente également un paramètre critique puisque ses dimensions déterminent la taille maximale de l'objet à imager ainsi que la résolution spatiale.

IV.3.1.2. Description du matériel d'étude

L'étape de validation de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron a porté sur deux modèles d'études : d'une part un fantôme, pour contrôler l'accord entre les concentrations mesurées et nominales et d'autre part *in vivo* chez un modèle d'animaux porteurs de tumeur cérébrale.

IV.3.1.2.1. Fantômes

Pour évaluer le seuil de détection et la précision de la technique d'imagerie, un fantôme en Lucite cylindrique de 10 cm de diamètre a été utilisé. Celui-ci comporte huit séries de trous de quatre diamètres différents (0,3, 0,5, 1 et 2 cm). A l'intérieur de ces trous sont placés des tubes de même composition, remplis de solution aqueuse désionisée contenant des concentrations connues d'agents de contraste (iode ou gadolinium).

²³ aux harmoniques près. Même si la proportion d'harmoniques est relativement faible dans le faisceau incident (de l'ordre de 1%) elles perturbent d'autant plus la mesure que l'objet traversé est épais [Chap92].

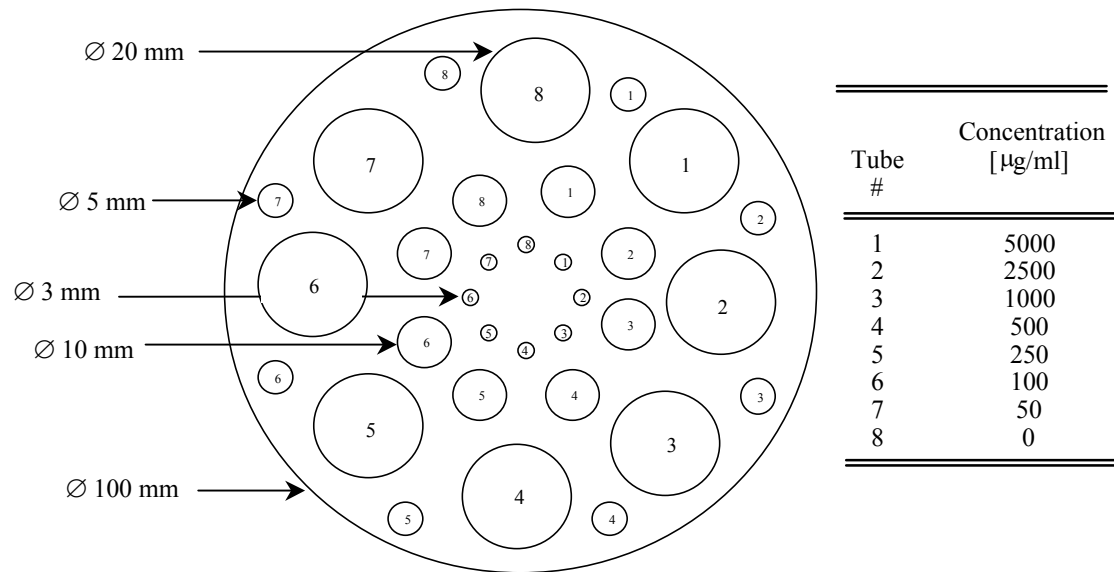


Figure IV-22 : Fantôme en Lucite de 10 cm de diamètre : 8 dilutions différentes d'agent de contraste peuvent être introduites dans 4 tubes de diamètre compris entre 3 et 20 mm.

Une variante de ce fantôme, de diamètre plus important (16.5 cm) a également été utilisé pour simuler une tête d'homme. Un anneau en aluminium (0.5 cm) amovible a été rajouté autour de ce dernier pour simuler l'effet de l'atténuation de os du crane.

IV.3.1.2.2. Modèle de gliome C6 chez le rat femelle Wistar Wag

Plusieurs séries de rats femelles Wistar Wag ont été utilisées dans le cadre de cette étude. Le volume sanguin total de cette race de rat est d'environ 55 ml/kg et le poids de chaque animal est de 200 grammes. Le modèle de gliome C6 a été établi par Benda *et al.* [Bend71]. 10^5 cellules suspendues dans 5 µl ont été injectées dans le noyau caudé droit du cerveau du rat (cf. Figure IV-24) (9 mm au-dessus de la ligne inter aurale²⁴, 3.5 mm à droite de la suture médiane de la voûte crânienne et 3.5 mm en profondeur par rapport à la dure-mère), selon une méthode d'implantation en conditions stéréotaxiques développée à l'unité INSERM U438 de Grenoble [Bena86]. Une des caractéristiques de ce modèle de gliome chez le rat est de présenter une importante zone de néovascularisation, ce qui le rend attractif pour les recherches en imagerie concernant la biologie des tumeurs cérébrales (croissance tumorale, invasion et migration, rupture de la barrière hémato-encéphalique, perméabilité des capillaires... [Bart98]). Ainsi les principales régions d'intérêt que nous avons retenues pour notre étude sont pour la zone tumorale : la zone péri-tumorale hypervascularisée, la zone

²⁴ Ligne imaginaire reliant les tympans

nécrotique centrale et la tumeur dans sa globalité ; pour la région controlatérale : le noyau caudé et le cortex fronto-pariétal.

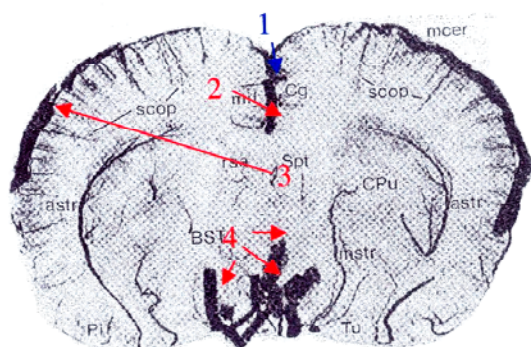


Figure IV-23 : Structures artérielles du cerveau de rat

(9.2 mm au-dessus de la ligne inter aurale)

1 : sinus veineux sagittal supérieur ; 2 : artère interne médiane frontale ; 3 : artère cérébrale médiane ; 4 : tronc artériel issu de la carotide interne

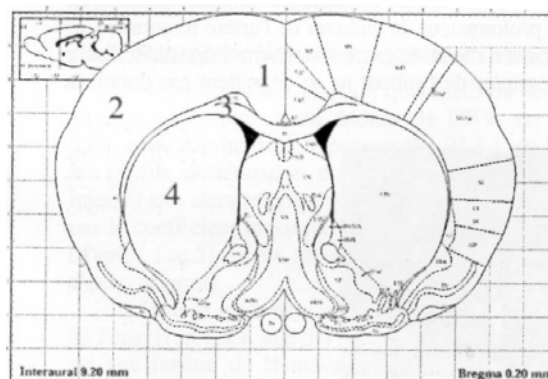


Figure IV-24 : Structure neurologiques du cerveau de rat

(9.2 mm au-dessus de la ligne inter aurale)

1 : « cingulate cortex » ; 2 : cortex fronto-pariétal ; 3 : corps calleux ; 4 : noyaux caudés

Avant les séquences d'imagerie SRCT, la présence du gliome a été contrôlée par IRM conventionnelle (Philips NT system 1 Tesla), à l'aide d'une séquence spin-écho pondérée en T₁ (temps de répétition = 500 ms ; durée de l'écho = 20 ms ; épaisseur de coupe = 2 mm) associée à l'injection intraveineuse de gadolinium (Magnevist®, Guerbet, France). La séquence d'imagerie SRCT a eu généralement lieu entre 34 et 38 jours après l'implantation de la tumeur, c'est-à-dire à un stade avancé de la pathologie tumorale.

IV.3.1.3. Protocole d'imagerie SRCT

Les rats, préalablement endormis à l'halothane, ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'hydrate de chloral (400 mg/kg). Ils ont été ensuite placés en position verticale sur un cadre stéréotaxique en plexiglas. Celui-ci maintenait immobile la tête des rats grâce à deux barres d'oreilles fixées dans les conduits auditifs externes. Ces barres servaient également de référence, puisque le centre présumé de la tumeur était exactement situé 9 mm au-dessus de la ligne inter aurale. Le cadre stéréotaxique est fixé sur un couplage de moteurs assurant la rotation et la translation de l'échantillon dans le faisceau. Les produits de contraste ont été manuellement injectés dans la veine saphène : les doses étaient de 0.4 ml/100g pour l'iode (Hexabrix®) (soit 128 mg d'iode/100g ce qui correspond à quatre fois la dose clinique), 0.5 ml/100 g et 0.25 ml/100g pour le gadolinium respectivement injecté sous forme de Magnevist® ou de Gadovist® (40 mg de Gd/100g, ce qui correspond à 25 fois la dose clinique)

(cf. § IV.2.1). Des petits tubes témoins contenant des concentrations connues de l'agent de contraste étudié ont été placés dans le champ de l'image, pour améliorer la précision de la quantification.

Pour les soustractions bi-énergie de part et d'autre du seuil K de l'agent de contraste injecté (33.169 keV pour l'iode et 50.269 keV pour le gadolinium), le rat était simultanément exposé aux deux rayonnements, qui se croisaient physiquement à son niveau. Les angles de déviation des faisceaux issus du monochromateur d'angiographie faisaient respectivement un angle de 6.84° et 4.51° par rapport à la direction du faisceau incident (cf. § IV.1.2.3).

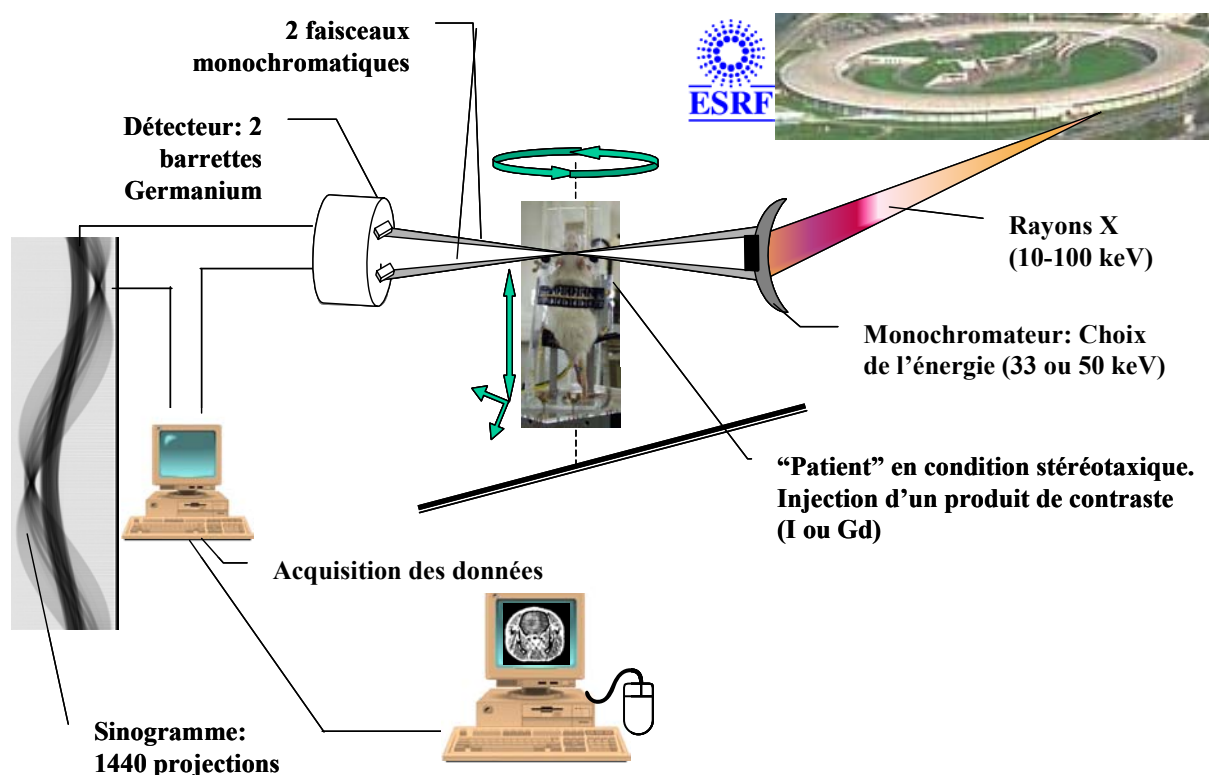


Figure IV-25 : Tomographie quantitative par rayonnement synchrotron : illustration du dispositif expérimental pour une séquence d'imagerie bi-énergie de part et d'autre du seuil K d'un agent de contraste

Des coupes jointives²⁵ de 800 μm d'épaisseur ont été réalisées sur 1 cm de haut de sorte à échantillonner l'intégralité de la tumeur (12 coupes transverses). La cinétique de distribution de l'agent de contraste a été suivie dans les 3 heures suivant l'injection, selon les modalités suivantes : toutes les 10 minutes durant la première heure puis toutes les 20 minutes ensuite. La dose de rayons X reçue par les rats était minimale, de l'ordre de grandeur de celles susceptibles d'être reçues avec un tomographe conventionnel (5 cGy/paire d'images).

²⁵ l'acquisition hélicoïdale permettant la translation et la rotation simultanée de l'échantillon est en cours de développement

Après l'imagerie SRCT les rats ont été euthanasiés, leurs cerveaux prélevés et fixés dans une solution de formol à 10%. Des coupes de 5 µm d'épaisseur incluses en paraffine ont été colorées selon une technique classique d' HES (Hematoxyline Eosine Safran).

IV.3.1.4. Traitement des données

Les données sont collectées pendant la rotation complète de l'échantillon (durée de la rotation comprise entre 24 et 2 secondes selon le moteur utilisé): la formation d'une coupe axiale correspond à l'enregistrement d'environ 1000 projections. L'acquisition de chaque sinogramme est précédée de l'enregistrement du courant d'obscurité du détecteur ainsi que du profil des faisceaux « blancs », c'est-à-dire non atténués par l'objet. Les cartographies quantitatives résolues en concentrations d'agent de contraste découlent des opérations de traitement d'images suivantes : i) soustraction du courant d'obscurité du détecteur aux sinogrammes et aux profils de références des faisceaux blancs ; ii) normalisation des données par un pixel de référence vierge de milieu atténuant pour corriger l'image de fluctuations temporelles du rayonnement X ; iii) normalisation des sinogrammes avec le faisceau de référence pour corriger les profils de la réponse non-uniforme inter-pixels du détecteur et pour prendre en compte l'allure gaussienne du faisceau ; iv) Soustraction logarithmique de la paire de sinogrammes (deux énergies ou avant et après injection). Les sinogrammes sont filtrés par un filtre de Hamming de paramètres (0.5, 5) et rétroprojetés. La reconstruction est réalisée par un algorithme standard développé par l'université de Pennsylvanie (code SNARK [Herm89]). L'image reconstruite est une cartographie des coefficients linéiques d'atténuation totale de l'objet. Sa taille est typiquement de 432x432 pixels. Le type de soustraction réalisé détermine ensuite le mode d'obtention des concentrations absolues en agent de contraste.

Celles-ci sont obtenues au moyen d'un programme développé sous IDL[®] (Interactive Data Language) permettant la sélection de régions d'intérêt circulaires de diamètres variable dans une des images reconstruites de la cinétique. En fonction de la modalité d'acquisition étudiée les valeurs des concentrations C d'agent de contraste (en mg/cm³ de tissu) s'obtiennent par les relations suivantes (cf. § III.1.4.1 p.77):

- soustraction bi-énergie de part et d'autre du seuil K :

(Eq. IV-4) :

$$C (mg.cm^{-3}) = \frac{10^4 [pix - \Delta\mu_{tot}^{eau, E^+ - E^-}]}{\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho} \right)^{Z, E^+} - \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho} \right)^{Z, E^-}}$$

- soustraction temporelle :

(Eq. IV-5) :

$$C(mg.cm^{-3}) = \frac{10^4 \text{ pix}}{\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho} \right)^{Z,E+}}$$

où pix est l'information contenue dans le pixel de l'image reconstruite (mm^{-1}) ; $\Delta\mu_{tot}^{eau,E^+-E^-}$ est la différence des coefficients d'absorption linéique de l'eau pour des énergies situées de part et d'autre du seuil de K de l'élément lourd (mm^{-1}) et $\left(\frac{\mu_{tot}}{\rho} \right)^{Z,E}$ est le coefficient massique d'absorption d'énergie de l'élément lourd à doser pour l'énergie E ($cm^2.g^{-1}$).

Pour un niveau de coupe transverse donnée, la région d'intérêt sélectionnée se propage ensuite automatiquement sur la totalité des coupes de la cinétique temporelle. En pratique, une seule coupe transverse a été exploitée sur la dizaine de coupes disponibles. Elle correspondait au centre théorique de la tumeur.

IV.3.2. A l'échelle de quelques millions de cellules: ICP-MS

La spectrométrie de masse est utilisée pour réaliser des analyses chimiques d'échantillons d'origine humaine ou minérale ou pour mesurer l'abondance relative des isotopes. Elle repose sur l'utilisation successive de champs électriques et magnétiques : les particules à étudier sont tout d'abord ionisées, puis accélérées sous l'action du champ électrique et enfin introduites dans un champ magnétique dont la direction est perpendiculaire à celle de leur vitesse. La trajectoire des particules devient donc circulaire et le point d'impact sur un détecteur après un demi-tour complet dépend de la masse des particules. Des différences de masse inférieures à la masse d'un électron peuvent être discernées.

Aujourd'hui, de nombreuses techniques basées sur la spectrométrie de masse existent, se différenciant les unes des autres par les méthodes d'ionisation des échantillons (impact électronique, chimique, electrospray, fast atom bombardment) ou les filtres de masse (à temps de vol, magnétique, quadripolaire, transformée de Fourier). Nous avons utilisé l'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer), reposant sur le couplage d'une torche à plasma avec un spectromètre de masse quadripolaire. Un des avantages de ce type de spectromètre est qu'il ne nécessite pas d'aimant et est donc très compact. Les mesures ont été effectuées sur l'ICP-MS VG Plasmaquad-PQ2+ (Fisons® instruments) au laboratoire IGRM de la maison des Géosciences (1381 rue de la Piscine, Domaine universitaire de St Martin d'Hères) par Véronique Ducros et Laurence Puillet.

transmis. Le faisceau ionique est alors amené sur un détecteur de type multiplicateur d'électrons. L'ensemble du système est dirigé par informatique.

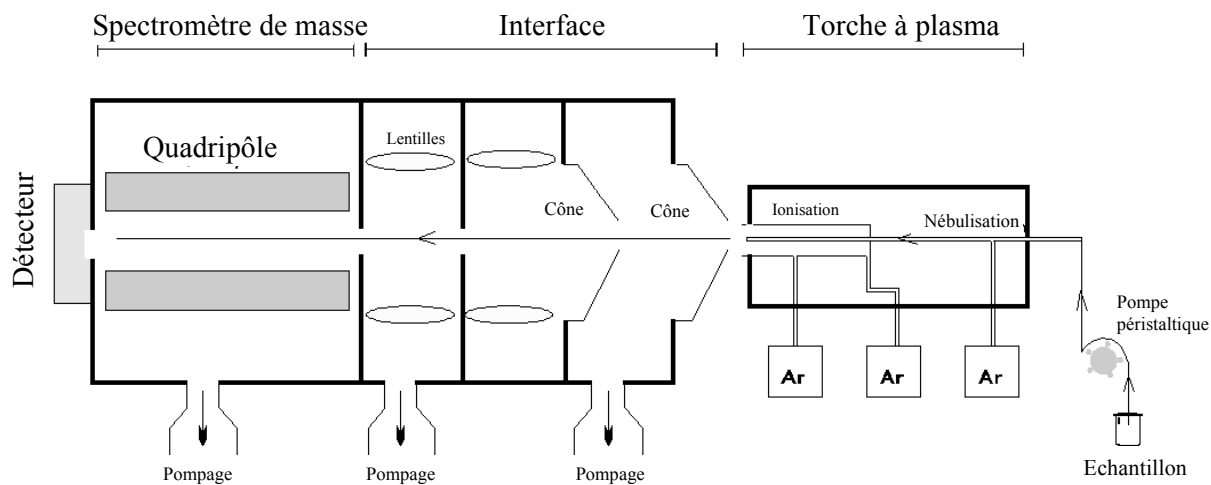


Figure IV-27 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse quadripolaire

IV.3.2.2. Préparation des échantillons

Pour chaque échantillon, quelques millions de cellules (préalablement exposées à un composé platiné ou non) ont été rincées au PBS (Gibco-BRL[®]), trypsinées et centrifugées (1500 tours/min pendant 5 minutes). Après élimination du surnageant, le culot de cellules a été resuspendu dans du PBS et recentrifugé. Après une nouvelle élimination du surnageant, le culot cellulaire a été resuspendu dans 1 ml de PBS (sans bicarbonate de sodium, ni calcium, ni magnésium). Cette suspension monocellulaire a été titrée à l'aide d'un hématimètre, puis lysée avec 100 µl de solution de Suprapur[®] HNO₃. Le volume final de la solution à doser a été ramené à 5 ml par dilution dans de l'eau doublement distillée.

IV.3.2.3. Étalonnage du spectromètre

Une gamme d'étalonnage a été systématiquement réalisée à partir de dilutions de l'agent à doser. Des échantillons témoins, de concentrations connues (comprises entre 0 et 195 ppb = 1 µM de platine), ont été analysés par le spectromètre pour établir une courbe d'étalonnage. La régression linéaire de ces données permet d'établir la formule qui sera utilisée pour les échantillons suivants pour convertir les mesures du détecteur (en coups/s) en quantité de platine (ppb) (Figure IV-28).

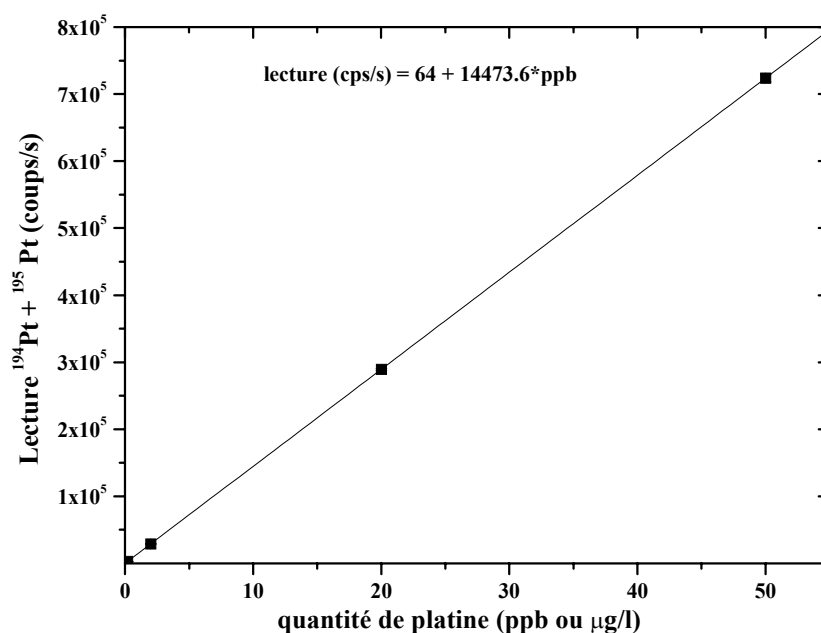


Figure IV-28 : Exemple de gamme d'étalonnage du spectromètre de masse

Les résultats étant décomposés en quantités de ^{194}Pt et de ^{195}Pt , nous avons choisi de systématiquement sommer les deux isotopes, qui sont de toute façon présents en quantité équivalentes. L'exemple de gamme d'étalonnage donnée ci-dessus montre que des concentrations de platine aussi petites que $1/100^{\text{e}}$ de ppb (soit 10 ng de Pt par litre) fournissent un signal deux fois plus important que le bruit de fond de l'appareil.

IV.3.2.4. Analyse des résultats

Pour chaque échantillon, les résultats obtenus se présentaient sous la forme d'un taux de comptage des isotopes platinés, moyennés sur une série de 5 mesures. La quantité de platine présente dans l'échantillon par unité de volume a été déduite de l'équation de calibration et ramenée à un nombre moyen d'atomes de platine par cellule.

IV.3.3. A l'échelle d'une cellule unique : SR-XRF

Cette technique de microanalyse repose sur l'induction par rayonnement synchrotron de fluorescence X (Synchrotron-Radiation induced X-Rays Fluorescence). L'irradiation d'un échantillon par un faisceau de photons conduit à la création d'ionisations dans les couches électroniques profondes des atomes le constituant. Le spectre de fluorescence X émis au cours du réarrangement du cortège électronique est caractéristique de l'espèce atomique ionisée et son intensité est liée à la quantité d'atomes de cette espèce présents dans l'échantillon. L'étude du spectre de fluorescence X constitue donc une méthode d'analyse qualitative et

quantitative. En balayant point par point un échantillon avec un microfaisceau on peut établir les cartes de répartition des éléments traces avec une résolution spatiale correspondant à l'élément de surface sondé.

Les progrès dans les systèmes de focalisation de rayons X permettent actuellement de disposer de microfaisceaux de rayons X possédant une résolution spatiale de l'ordre du micron. La technologie des microsondes SR-XRF est relativement récente. Moins d'une dizaine de tels instruments ont été développés dans les principales sources de rayonnement synchrotron mondiales [Chen90]. Les hautes performances (spectre d'émission électromagnétique très intense, continu en énergie et polarisé) d'une source de rayonnement synchrotron permettent d'atteindre par microfluorescence X les limites de sensibilité requises pour l'analyse des éléments traces ($\sim \mu\text{g/g}$ de matière sèche ou ppm) au sein de cellules. De plus, les sections efficaces de diffusion élastique et inélastique des photons dans un matériau sont dépendantes de la polarisation de la lumière incidente. Le rayonnement synchrotron étant fortement polarisé, on minimise l'apparition sur le spectre des phénomènes de diffusion, contribuant au bruit de fond, en plaçant le détecteur perpendiculairement à la direction du faisceau incident et dans le plan de polarisation (plan de l'orbite des électrons). L'échantillon est placé à 45 degrés pour l'analyse. L'utilisation d'un monochromateur permet de sélectionner une bande d'énergie adaptée à la fluorescence X. A l'ESRF, cette technique a été mise en place sur la ligne de lumière ID22 de micro-fluorescence, -imagerie et -diffraction $\mu\text{-FID}_{22}$ et elle a été adaptée à l'analyse cellulaire et tissulaire par le Dr Sylvain Bohic [Bohi01b].

Non destructive pour l'échantillon, la microsonde SR-XRF présente l'avantage supplémentaire de pouvoir cartographier avec une très haute résolution (de l'ordre du micron, i.e. à l'échelle subcellulaire) la distribution multiélémentaire de l'ensemble des atomes présents dans l'échantillon, même à l'état de trace (de l'ordre du ppb) [Chol01].

IV.3.3.1. Dispositif expérimental

Les lentilles du visible focalisant par réfraction étant inefficaces dans les X, l'imagerie dans ce domaine a longtemps été limitée à l'utilisation de miroirs courbes sous incidence rasante ou de sténopés. Les études de Fresnel puis de Soret avaient montré qu'il existait un autre moyen de focaliser la lumière visible : la diffraction. Il était alors possible, une fois les technologies de fabrication développées, de transposer ces optiques fonctionnant en transmission dans le domaine X. Si la réflexion de Bragg est associée à la réfraction de Fresnel, on obtient une optique focalisante gravée sur un miroir multicouche ou un cristal.

Ces systèmes optiques, appelées lentilles de Bragg-Fresnel, permettent de focaliser des faisceaux de rayons X durs en spots de taille micrométriques (voire submicrométriques). Cette technologie a beaucoup progressé ces dernières années grâce aux outils actuels de micro-fabrication. Les lentilles multicouches de Bragg Fresnel, les lentilles de Fresnel à zones plates ou les lentilles paraboliques réfractives (transmissives) CRL (Compound Refractive Lens) [Snig98] assurent aujourd'hui une microfocalisation X suffisamment performante pour permettre la micro-spectroscopie à rayons X.

Les lentilles CRL ou de Fresnel à zone plate utilisées sur ID22 assurent un flux de 10^{10} ph/s/ μm^2 pour un faisceau de $1 \times 10 \mu\text{m}^2$ (vertical x horizontal) [Bohi01a]. Elles sont situées en sortie d'un monochromateur permettant de travailler si nécessaire entre 4 et 70 keV. Ainsi il est possible de cartographier avec une grande sensibilité l'ensemble des éléments dont le seuil K est inférieur à celui du gadolinium (50.2 keV). Pour les autres éléments, les signaux issus des seuils L ou M seront exploités. Ceux-ci sont enregistrés à l'aide d'un détecteur Si(Li) (Eurysis® Mesures, France), placé à 90° par rapport à la normale au plan à imager. Une caméra CCD haute résolution (Princeton Scientific instruments, USA) est utilisée pour l'alignement de l'échantillon et l'imagerie en transmission. Ce dernier est également assuré par un vidéo microscope (Figure IV-29). Le déplacement de l'échantillon dans le faisceau est assuré par des moteurs de très haute précision ($\pm 0.1 \mu\text{m}$ dans les deux directions du plan de focalisation et $\pm 50 \text{ nm}$ en profondeur).

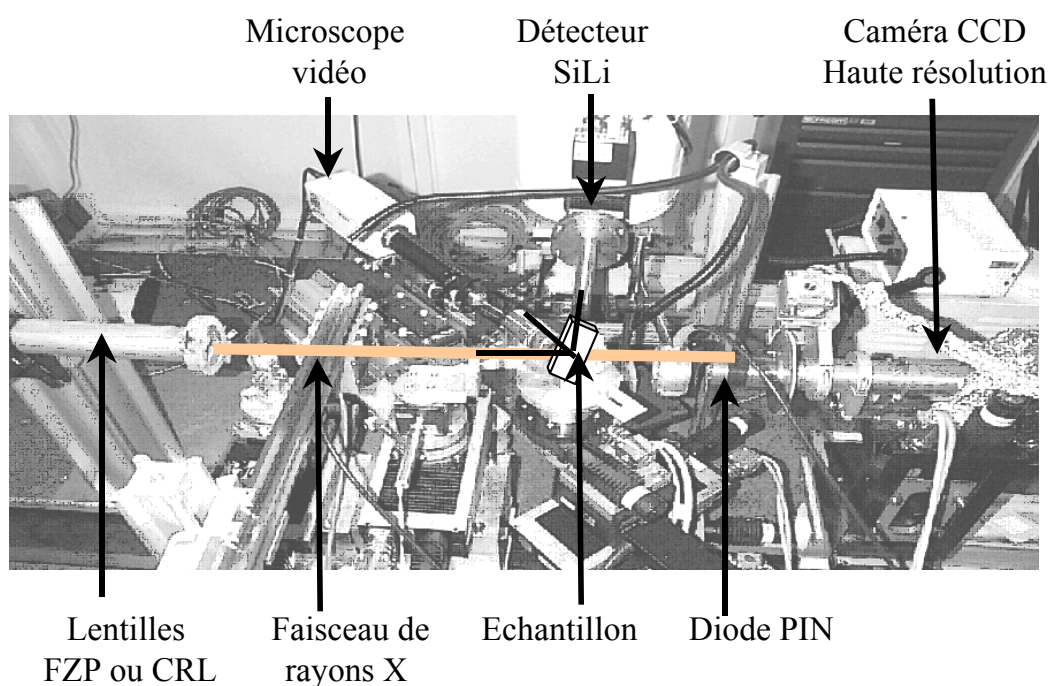


Figure IV-29 : Montage expérimental du microscope par fluorescence induite par rayonnement synchrotron d'après [Bohi01b].

IV.3.3.2. Préparation des échantillons

Les cellules à analyser ont été cultivées dans du milieu complet sur des fines lamelles de silice qualité Suprasil[®] (dimensions : 22 x 22 x 0.2 mm Heraeus[®], ZI Courteboeuf, Les Ulis, France), déposées au fond de boîtes de Pétri (Falcon[®]). L'incubation a été réalisée à 37°C en atmosphère humide comme à l'accoutumée (cf. § IV.5.1 p.160 pour plus de détails sur les conditions de culture cellulaire). La méthode employée pour préparer les échantillons à la microanalyse fut semblable à celle utilisée pour les méthodes d'analyse en microscopie nucléaire [Re99]. Après aspiration du milieu de culture, les lamelles ont été rincées tout d'abord avec du DMEM non additionné de sérum de veau, puis très rapidement avec quelques gouttes d'eau. Au bout de 5 secondes, la surface de chaque lamelle a été délicatement époncée avec une membrane en polysulfone à faible taux de rétention des protéines, habituellement utilisée pour les ultrafiltrations (Omega Membrane, Biotrace, Gellman[®]). Le séchage des échantillons a duré une nuit entière dans le flux d'air d'une hotte à flux laminaire vertical.

IV.3.3.3. Choix de la cellule à cartographier

Le pré-positionnement de la cellule à cartographier est un véritable problème pour cette technique où le microscope confocal utilisé possède une résolution de l'ordre de 20 microns tandis que les dimensions du faisceau synchrotron sont de l'ordre de 1 x 5 microns. Une procédure de contrôle a néanmoins été utilisée pour systématiquement recentrer la mire du microscope (fil d'or de 5 microns sur lamelle de quartz) sur le centre géométrique du faisceau synchrotron. Les cellules ont été choisies à partir de l'image vidéo de l'échantillon retransmise par le vidéo microscope. De courtes acquisitions ont été faites pour estimer le signal dû au platine détectable. Lorsque celui-ci semblait convenable²⁷, un bref balayage de l'échantillon était réalisé dans les deux dimensions (horizontal, vertical) pour déterminer les limites à fixer pour l'acquisition de la cartographie finale et s'assurer également que la géométrie de la cellule était bien reproduite.

²⁷ nous pouvons souligner ici que nous avons constaté lors de ces expériences une très grande hétérogénéité de concentration du platine d'une cellule à l'autre.

IV.3.3.4. Acquisition d'une cartographie

Les cartographies cellulaires bi-dimensionnelles ont été réalisées dans les conditions suivantes : mode de remplissage : 2/3 filling, intensité 200 mA, 22.4 mm de gap, flux nominal : 10^{10} photons/s/ μm^2 , énergie : 12 keV²⁸, résolution de l'image : 1 x 3 ou 1 x 4 microns² (vertical x horizontal, ce qui revient à un spot de faisceau focalisé de taille 1 x 6 ou 1 x 8 microns). Entre 300 et 500 points d'acquisition ont été nécessaires pour cartographier une cellule et le temps d'acquisition par point était de 100 secondes. La durée totale d'enregistrement pour une cartographie d'une cellule était comprise entre 8 et 14 heures.

IV.3.3.5. Traitements des spectres de fluorescence

Pour chaque pixel des cartographies obtenues, les spectres de fluorescence enregistrés ont été traités avec le logiciel WinAxil [Veke94], dans le triple objectif de soustraire le bruit de fond (« continuum ») aux signaux détectés, d'ajuster les spectres aux modèles et d'intégrer l'aire sous la courbe des pics de fluorescence (Figure IV-30). La calibration du logiciel a été faite au moyen d'un spectre de référence au niveau de la cellule cartographiée dont le temps d'acquisition (plus long : 1000 secondes), permettait de repérer manuellement l'identification et la position de chaque pic de fluorescence. Un second spectre de référence, réalisé quant à lui sur un échantillon constitué d'une solution étalon de cisplatine (195 ppm²⁹) et d'un capillaire en quartz ($\Phi=100\ \mu\text{m}$) devait permettre de quantifier les quantités de platine intracellulaire.

²⁸ De sorte à avoir une énergie supérieure à tous les seuils K des éléments constituant la cellule et le seuil L du platine

²⁹ un laboratoire spécialisé, (LCIE, CNRS, Villeurbanne) a dosé la solution restante et confirmé cette valeur.

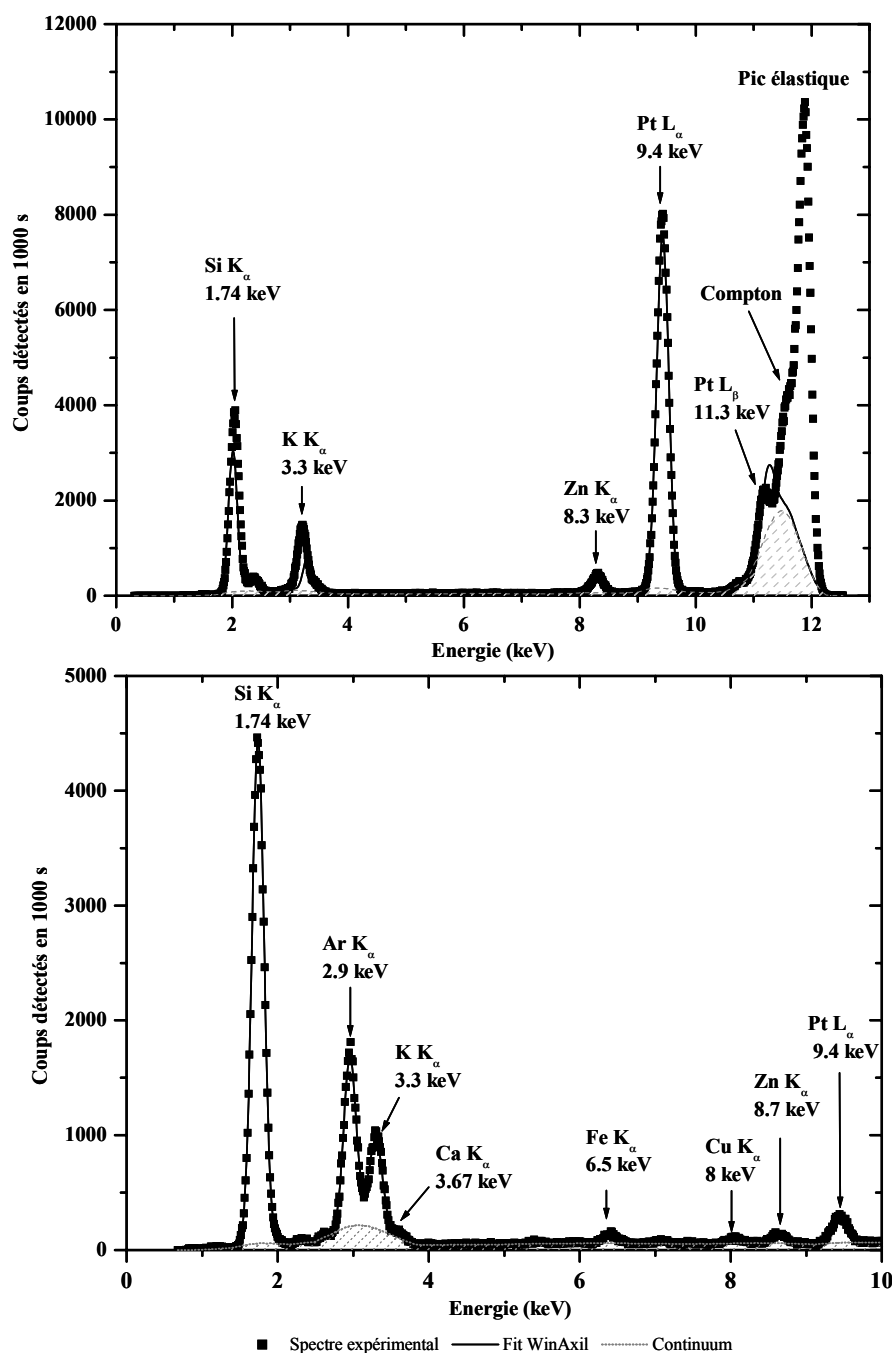


Figure IV-30 : Exemple de spectres de références : (sup.) Acquisition de 1000 secondes avec faisceau focalisé au centre d'un capillaire en quartz de 100 μm de diamètre contenant une solution de 195 ppm (1 mM) de platine ; (inf.) Acquisition de 1000 secondes avec faisceau focalisé sur une cellule SQ20B traitée avec 100 μm de CDDP pendant 6 heures

Pour chaque pixel, les quantités de potassium, calcium, zinc et platine obtenues ont ensuite été corrigées de la décroissance temporelle du faisceau, qui conduisait à de plus forts taux de comptage pour les intensités plus élevées. Ceci a été réalisé grâce à la présence de diodes PIN enregistrant le flux photonique avant chaque mesure.

IV.4. DOSIMETRIE

Quelle que soit la finalité de l'étude réalisée (imagerie, radiothérapie), la prévision et la connaissance des doses délivrées à nos échantillons ont toujours été un élément essentiel, auquel nous nous sommes efforcés d'apporter un maximum de précision et de rigueur. La problématique des mesures des doses délivrées par les rayons X synchrotron était essentiellement liée aux trois points suivants :

- les énergies photoniques impliquées, qui demeurent faibles en comparaison de celles pour lesquelles les détecteurs sont habituellement étalonnés ;
- le caractère monochromatique du rayonnement, qui entachait d'erreur l'utilisation des coefficients d'étalonnage des fournisseurs, adaptés aux spectres photoniques polychromatiques ;
- la taille du faisceau, enfin, dont la hauteur était de l'ordre de grandeur du millimètre ce qui est à nouveau faible pour les détecteurs de références conventionnels comme les chambres d'ionisations, dont le volume sensible doit théoriquement être entièrement vu par la radiation à caractériser pour s'assurer de la validité des mesures.

Pour garantir la fiabilité de nos mesures nous avons donc été amenés à utiliser plusieurs dosimètres différents et à comparer leurs réponses respectives. Le détecteur choisi comme détecteur de référence a ensuite permis de calibrer des détecteurs secondaires, dont la présence constante dans le champ d'irradiation permettait de contrôler *a posteriori* les doses réellement délivrées aux échantillons.

IV.4.1. Calibration du faisceau synchrotron avec un détecteur de référence

Pour calibrer un faisceau, il est nécessaire de disposer d'un outil de mesure dont nous sommes certains de la réponse dans nos conditions expérimentales. Aux énergies étudiées, ni les chambres d'ionisation classique, ni le détecteur Germanium haute pureté ne nous garantissaient une réponse certifiée. Nous avons néanmoins utilisé ces deux types de détecteurs comme référence pour nos calibrations et comparé leurs réponses respectives afin de s'assurer de leur cohérence.

IV.4.1.1. Détecteur Germanium haute pureté

Lorsque le détecteur Germanium de la ligne médicale a été choisi comme détecteur de référence, le facteur de calibration a été calculé de la façon suivante :

$$(Eq. IV-6) : F_{cal} \text{ (Gy.mA}^{-1}.\text{scan}^{-1}) = D_{zref}^{eau} \text{ (Gy.mA}^{-1}.\text{scan}^{-1}) = \frac{F_{att}}{I} E n_0 \frac{Bits}{p v G \tau} \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{eau, E}$$

où F_{att} représente l'atténuation des éléments insérés entre l'entrée du faisceau et la profondeur d'intérêt (z_{ref}) pour une énergie de rayons X égale à E (J) ; I est l'intensité du faisceau au moment de la calibration (mA) ; n_0 est le nombre de photons intégré par le cristal de Germanium par bit à l'énergie E ; Bits est la réponse moyenne enregistrée au niveau des pixels du détecteur au gain G , pendant τ secondes d'acquisition; p est la taille horizontale du pixel (0.035 cm); v est la vitesse de translation du support des cellules (cm.s^{-1}) ; $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)^{eau, E}$ est le coefficient massique d'absorption d'énergie de l'eau à l'énergie E ($\text{cm}^2.\text{kg}^{-1}$).

En regroupant dans cette expression l'ensemble des termes qui ne dépendent que de l'énergie ou qui sont indépendants des conditions expérimentales sous la forme d'un facteur K , il vient :

$$(Eq. IV-7) : F_{cal} \text{ (Gy.mA}^{-1}.\text{scan}^{-1}) = D_{zref}^{eau} \text{ (Gy.mA}^{-1}.\text{scan}^{-1}) = \frac{F_{att}}{I} K(E) \frac{Bits}{v G \tau}$$

ou encore, lorsqu'il est préférable de raisonner en débit de dose et en durée d'irradiation (cas de l'imagerie ou de l'irradiation de cellules dans des petits contenants) :

$$(Eq. IV-8) : \dot{F}_{cal} \text{ (Gy.mA}^{-1}.\text{s}^{-1}) = \dot{D}_{zref}^{eau} \text{ (Gy.mA}^{-1}.\text{s}^{-1}) = \frac{F_{att}}{I} K(E) \frac{Bits}{h G \tau}$$

où h est la hauteur du faisceau (mm).

La variation de $K(E)$ en fonction de l'énergie des rayons X est représentée ci-dessous.

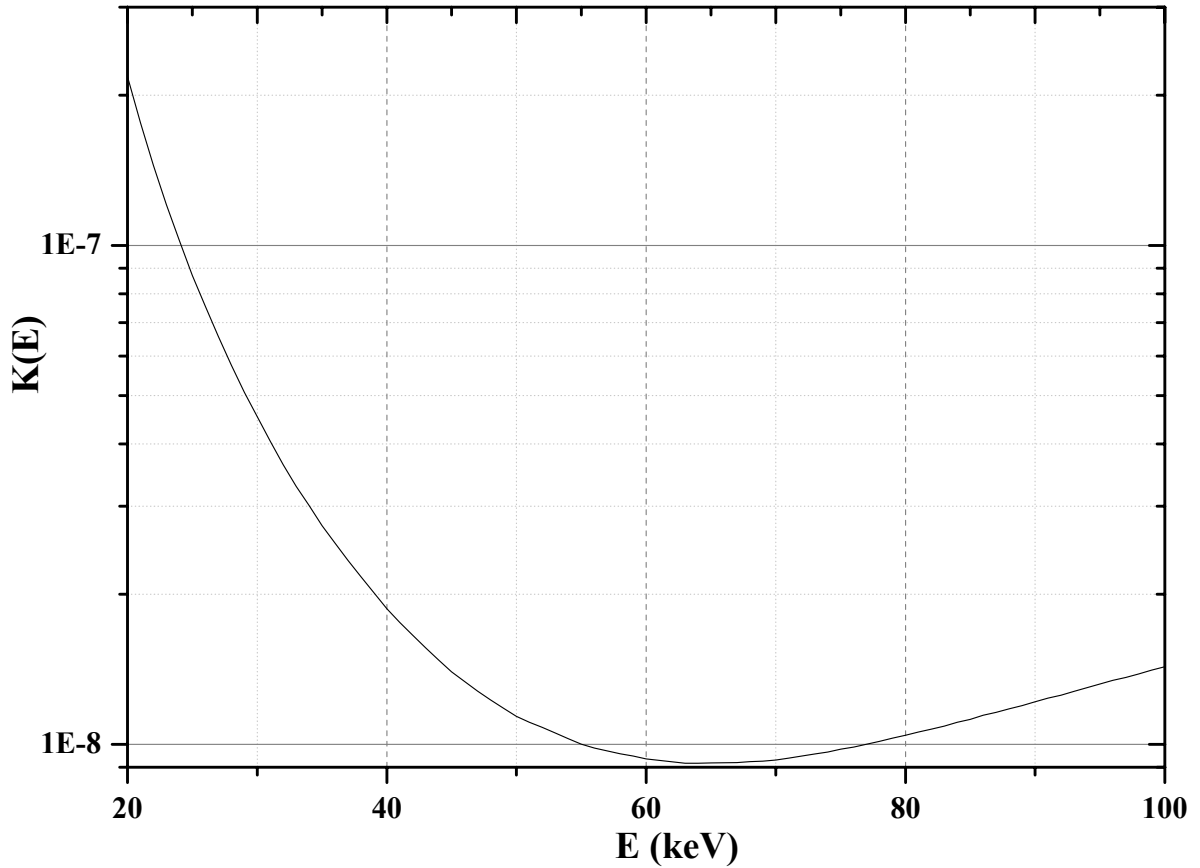


Figure IV-31 : Variation du facteur K en fonction de l'énergie d'irradiation

L'avantage d'utiliser le détecteur germanium comme détecteur de référence réside dans sa simplicité d'utilisation, liée à l'absence de montage expérimental particulier.

IV.4.1.2. Chambre d'ionisation

Les chambres d'ionisation cylindriques utilisées comme dosimètres de référence dans le cadre de ce travail ont successivement été une Catinpec[®] PR-05, puis une PTW 31002 couplées à l'électromètre Unidos[®]. Le facteur de calibration F_{cal} a été mesuré pour chaque énergie utilisée, dans les conditions expérimentales d'irradiation:

$$F_{cal} \text{ (Gy.mA}^{-1}.\text{scan}^{-1}) = \frac{L}{I} N_K \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{air, E}^{eau, E}$$

où L est la lecture de l'électromètre pour une translation de la chambre (C) ; I l'intensité (mA); N_K est le facteur d'étalonnage de la chambre d'ionisation en terme de Kerma dans l'air

(Gy.C⁻¹); et $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{air, E}^{eau, E}$ est le rapport du coefficient massique d'absorption d'énergie de l'eau

à l'énergie E, comparé à celui de l'air.

IV.4.1.3. Comparaison des réponses des détecteurs de référence

Une comparaison de la réponse des détecteurs de référence a été réalisée pour plusieurs énergies en procédant simultanément à la mesure d'un profil du rayonnement X non atténué avec le détecteur Germanium et à l'enregistrement de la chambre d'ionisation PTW 31002 après translation dans le faisceau à la vitesse de 50 mm.s^{-1} dans un faisceau de 1 mm de hauteur. Cette dernière a été placée en position verticale sur un support de plexiglas et la mesure a été intégrée³⁰ uniquement sur son volume de détecteur (35 mm de haut). Le mode de remplissage de l'anneau de stockage était le mode uniforme, et l'intensité au moment des mesures légèrement inférieure à 90 mA.

Tableau IV-7 : Pour plusieurs énergies, comparaison des débits de doses de référence mesurés par la chambre d'ionisation PTW 31002 ou le détecteur Germanium haute pureté.

Energie (keV)	Gap (mm)	PTW 31002 $\dot{D}_{\text{surface}}^{\text{eau}} (\text{mGy} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Germanium $\dot{D}_{\text{surface}}^{\text{eau}} (\text{mGy} \cdot \text{mA}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Différence (%)
33.5	60	1.755	1.742	- 0.7
50	50	2.428	2.472	- 1.8
65	50	1.842	1.892	- 2.7
80	40	2.393	2.834	+ 18

Ces résultats montrent une bonne concordance des mesures dans la gamme d'énergie étudiée dans ce travail. Il est toutefois illusoire d'estimer que nos mesures de dose de référence possèdent une précision inférieure à 10%, ce qui est de l'ordre de grandeur des imprécisions rencontrées en radiodiagnostic. Une simulation Monte Carlo du comportement de ces détecteurs aux énergies utilisées serait intéressante et pourrait assurément permettre de gagner en précision.

IV.4.2. Calibration des détecteurs secondaires

Simultanément à la calibration du faisceau de rayons X synchrotron, un autre dosimètre a été étalonné par le détecteur de référence. Leur étalonnage est réalisé en terme de doses absorbées dans l'échantillon : il est par conséquent « montage expérimental

³⁰ Une étude a montré un manque évident de reproductibilité de la réponse de ce type de chambre lorsque celle-ci est irradiée en mode statique par un faisceau plus petit que le volume détecteur. Si plus de 50 % de différence de réponse ont été constatés, la chambre bâton PTW 77336 offre quant à elle une excellente reproductibilité de la mesure, quelque soit la portion irradiée (moins de 3% de différence le long du volume détecteur, en mode statique)

dépendant » (l'amplitude et la vitesse de balayage des échantillons dans le faisceau modifient ce facteur de calibration).

IV.4.2.1. Dosimètres thermoluminescents

Des pastilles de fluorure de lithium (LiF) carrées de 3 mm de côté et de 1 mm d'épaisseur ont été placées à l'arrière du support de plexiglas servant à l'irradiation des flacons de culture, pendant la mesure de la dose absorbée au niveau des cellules avec la chambre d'ionisation. La réponse du dosimètre relatif a ainsi été étalonnée grâce à la réponse du détecteur de référence et toutes les données obtenues suite à la lecture des dosimètres LiF placés identiquement à l'arrière du support de plexiglas pendant les irradiations des échantillons cellulaires ont pu ainsi être converties en doses réellement absorbées par les cellules.

IV.4.2.2. Chambres d'ionisation à azote

De la même manière, un couple de chambre d'ionisation à azote toujours présentes dans le faisceau de la salle d'expérimentation ont été étalonnées en enregistrant leur réponse lors de la calibration du faisceau par le détecteur de référence.

IV.4.3. Rendements en profondeur

La distribution de dose en profondeur dans un fantôme d'eau a été étudiée pour plusieurs énergies. Ceci a notamment permis de prendre en considération la contribution du milieu diffusant à l'énergie déposée en profondeur dans nos calculs pré- et post-dosimétriques.

IV.4.3.1. Protocole d'acquisition

Un explorateur automatique de fantôme d'eau a été confectionné, en motorisant le déplacement d'une chambre d'ionisation standard (PTW 31002, 0.125 cm^3) dans une cuve à eau en plexiglas (parois de 5 mm d'épaisseur, dimensions : $20 \times 20 \times 25 \text{ cm}^3$). L'interfaçage de l'électromètre de la chambre d'ionisation (UNIDOS[®], PTW, Freiburg) via une liaison par câble RS232 a permis de commander directement les mesures et d'en relever les valeurs à partir des stations UNIX disponibles dans la salle de commande de la ligne médicale.

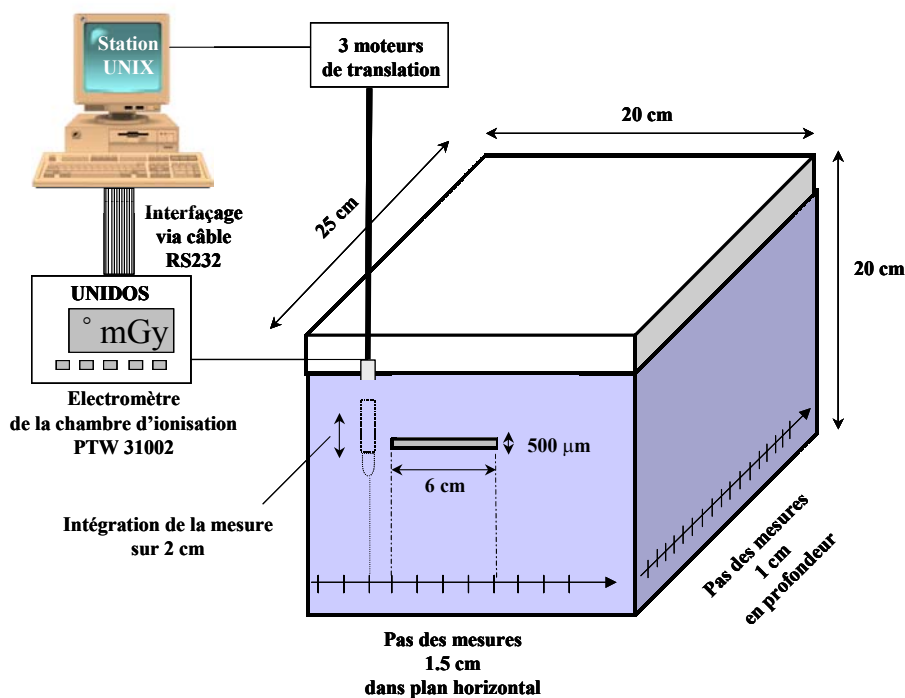


Figure IV-32 : Dispositif expérimental d'exploration automatique d'un fantôme d'eau irradié par un faisceau de rayons X de 500 µm de haut et 6 cm de large

Pour les trois énergies étudiées (33, 50 et 80 keV), la taille du faisceau était de 6 cm dans le plan horizontal et de 500 µm de hauteur. L'homogénéité du profil de l'intensité a été vérifiée avant le début des acquisitions. Le mode de remplissage de l'anneau de stockage était le mode uniforme, avec une intensité maximale de l'ordre de 200 mA. Le gap du wiggler était de 50 mm pour les énergies de 33 et 50 keV, et il a été resserré à 45 mm pour le plus haute énergie, soit 80 keV. Le monochromateur de tomographie a été utilisé, la gamme d'énergie disponible étant plus grande (cf. § IV.1.2.3.1 p.111).

La chambre d'ionisation a été placée dans l'eau en position verticale. Afin de s'affranchir des inhomogénéités de réponse de celle-ci en fonction de la partie irradiée, nous avons choisi d'intégrer chaque mesure sur 2 cm de haut, ce qui correspondait à 20 s de temps d'intégration (vitesse de déplacement = 1 mm.s⁻¹). Cette dernière a été choisie de sorte à ce que la mesure soit significative, même dans les conditions extrêmes de mesure (profondeur maximale, hors du champ d'irradiation). En effet, l'électromètre UNIDOS® présente l'avantage de fournir une indication sur la pertinence des mesures réalisées. En position haute, le volume sensible de la chambre d'ionisation était situé 2.5 cm sous la surface de l'eau (cf. Figure IV-32). Chaque mesure a de plus été réalisée deux fois, pour correspondre aux deux calibres disponibles dans notre mode de mesure (High et Low). Ainsi la meilleure mesure a pu être choisie *a posteriori*. L'échantillonnage de la cuve à eau a été choisi de la

façon suivante : 11 points de mesures dans le plan horizontal (dont 5 dans le faisceau), espacés de 15 mm, et 17 points de mesures en profondeur, tous les centimètres.

Les données obtenues ont été corrigées de la décroissance temporelle de l'intensité du rayonnement synchrotron.

IV.4.3.2. Résultats des mesures

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure ci-dessous (Figure IV-33). Les isodoses ont été extrapolées à partir des données brutes par création de matrice tridimensionnelle sous le logiciel de calcul Origin® v.6.0 (Microcal TM Software, Northampton, MA, USA). Les rendements en profondeur sur l'axe du faisceau (centre géométrique) sont également présentés et comparés à l'atténuation théorique du rayonnement primaire.

Les couches de demi-atténuation mesurées sont d'environ 2.5 cm d'eau à 33 keV, 3.6 cm à 50 keV et 4.9 cm à 80 keV. La contribution du rayonnement diffusé à l'énergie déposée dans le fantôme d'eau est clairement mise en évidence. Les doses délivrées en profondeur seraient sous-estimées si elle n'était pas prise en compte. En pratique, c'est dans l'évaluation du facteur F_{att} des équations (Eq. IV-7) et (Eq. IV-8) p.144 que ces mesures ont été utilisées.

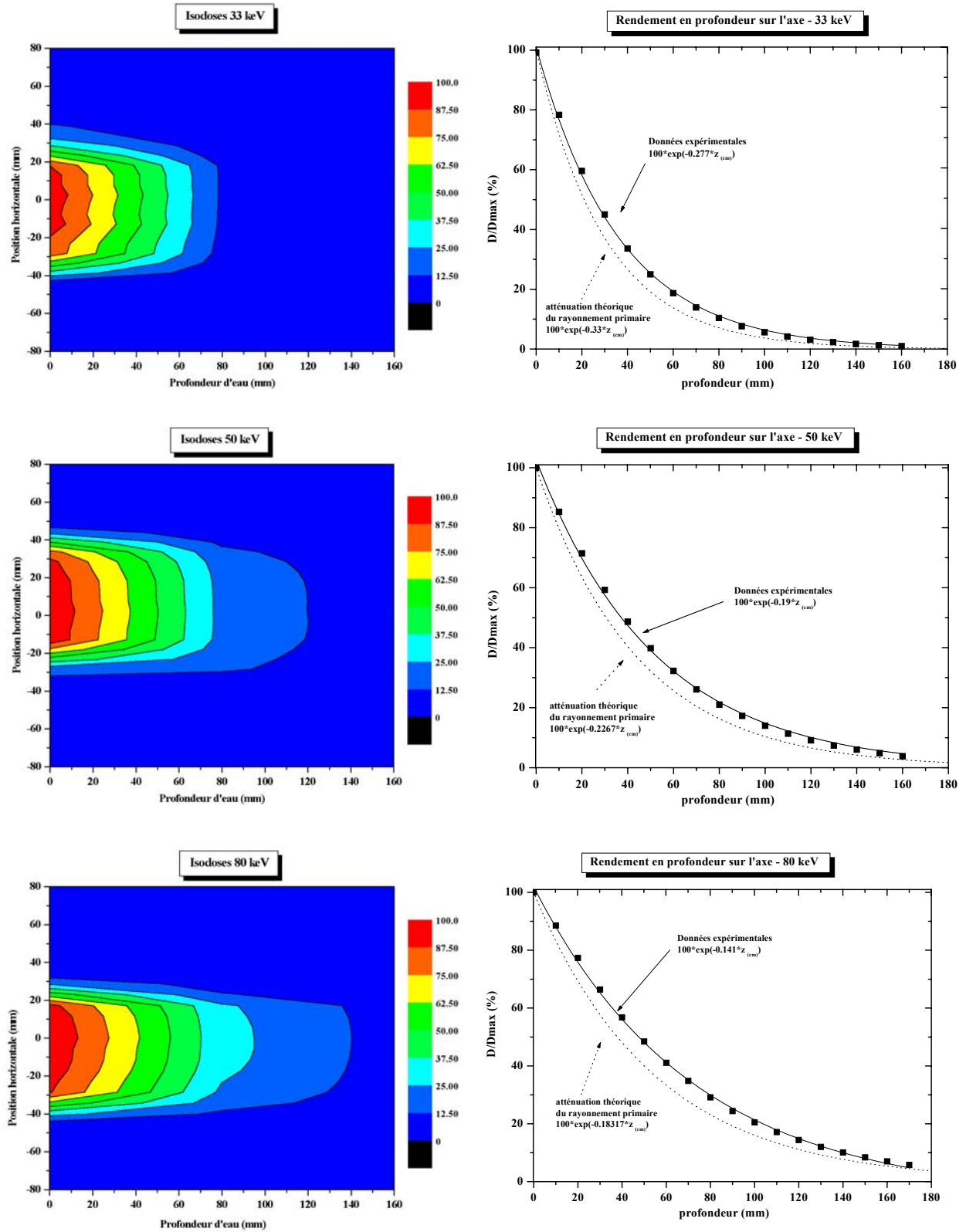


Figure IV-33 : Distributions de doses mesurées dans un fantôme d'eau à 33, 50 et 80 keV.
 Les courbes isodoses et les rendements en profondeurs sont exprimés en pourcentage de la dose mesurée à l'axe du faisceau, dans l'eau, derrière 5 mm de plexiglas.

IV.4.4. Programmation d'une irradiation à visée thérapeutique

Compte-tenu de la calibration du rayonnement synchrotron réalisée, la programmation de l'irradiation a été ajustée en fonction de sa durée prévisible.

IV.4.4.1. Irradiations longues

Les multiples translations des échantillons de grande surface entraînant des durées d'irradiation souvent longues, il a été nécessaire de tenir compte de l'influence de la décroissance temporelle du courant de l'anneau de stockage pour le calcul du nombre de translations nécessaires à l'obtention d'une dose donnée:

(Eq. IV-9) :

$$nscans = \frac{D}{F_{cal} \frac{I_0}{2} (1 + \exp(\frac{-D d}{t_{1/2} I_0 F_{cal}}))}$$

avec D la dose de rayonnement à délivrer (Gy); I_0 l'intensité du courant au démarrage de l'irradiation (mA); $t_{1/2}$ la demi-vie de décroissance de l'intensité du courant (h); d la durée d'un scan (h); et F_{cal} le facteur de calibration du faisceau synchrotron défini précédemment ($Gy.mA^{-1}.scan^{-1}$).

IV.4.4.2. Irradiations courtes

Pour les échantillons plus petits pour lesquels les durées d'irradiation étaient beaucoup plus courtes, cette correction n'a pas été nécessaire mais par contre la vitesse de rotation des moteurs (de translation ou de rotation) a été ajustée de sorte à obtenir un nombre entier de passages ou de tours dans le faisceau.

IV.4.5. Contrôle des doses effectivement délivrées aux échantillons

La dose délivrée à nos échantillons étant un paramètre critique de notre étude, nous avons développé un système de dosimétrie en temps réel assurant l'enregistrement des doses tout au long de l'irradiation. Si nous avons essayé dans un premier temps d'utiliser des dosimètres thermoluminescents classiques, il nous a semblé par la suite plus simple de mettre en place un système d'enregistrement de l'intensité du rayonnement délivré à chaque translation ainsi que des doses lues par un couple de chambres d'ionisation de 10 cm de long toujours présentes dans le faisceau. Une routine spécifique a donc été développée sous UNIX pour accéder à ces informations. Elles se présentent sous la forme d'un fichier texte, résultat

informatique de l'irradiation de chaque échantillon. L'exploitation de ces fichiers a été réalisée sous des tableurs conventionnels (Microsoft Excel® et Origin® v.6.0).

IV.4.5.1. Dosimètres thermoluminescents

La réponse des dosimètres est convertie en dose absorbée par l'échantillon en utilisant le facteur d'étalonnage mesuré. La sensibilité de ces dosimètres est excellente. Leur réponse en mode tomographique (rotation puis translation des rats en imagerie) n'a néanmoins pas été concluante, probablement du fait d'une mauvaise superposition des coupes transverses jointives. Par contre, leurs translations répétées ont donné des résultats satisfaisants.

IV.4.5.2. Prise en compte de la décroissance temporelle de l'intensité du rayonnement synchrotron

Après l'irradiation, la dose effectivement délivrée aux échantillons a été recalculée comme suit:

(Eq. IV-10) :

$$D^{cells} (Gy) = F_{cal} \sum_{i=1}^{nscans} I_i$$

où I_i est l'intensité du rayonnement synchrotron (mA) pendant le $i^{ème}$ passage de l'échantillon dans le faisceau. Les conséquences sur la dose d'éventuelles coupures de faisceau, suivies de réinjections d'électrons dans l'anneau de stockage conduisant à des discontinuités dans la décroissance temporelle du rayonnement ont ainsi pu être précisément prises en compte.

IV.4.5.3. Doses enregistrées par les détecteurs secondaires

L'approche précédente demeure une information théorique de la dose aux échantillons et ne reflète pas forcément la dose effectivement délivrée dans la salle d'irradiation. L'interposition éventuelle d'une protection plombée dans le faisceau tronquerait en effet la dose vue par les cellules sans pour autant affecter la dose calculée. Par sécurité, nous avons donc systématiquement comptabilisé les ionisations enregistrées par une chambre à azote, placée continuellement dans le faisceau de rayons X à son entrée dans la salle d'expérimentation.

Ainsi la dose totale délivrée aux échantillons a été re-calculée de la façon suivante :

(Eq. IV-11) :

$$D^{control} (Gy) = F_{IC} \sum_{i=1}^{nscans} \frac{(UL_{after} - UL_{before})_{scan i}}{I_i}$$

où UL est le nombre de coups intégrés affichés par la chambre au début et à la fin de chaque translation I, réalisée à l'intensité I et F_{IC} est le facteur de calibration de la chambre d'ionisation à Azote ($Gy \cdot mA \cdot UL^{-1}$).

IV.4.6. Le gel de Fricke

Nous attirons l'attention du lecteur sur le fait que toutes les calibrations dosimétriques évoquées au paragraphe § IV.4 ont été réalisées *dans l'eau* et que nous n'avons jamais voulu intégrer dans ces mesures de dose la variable que nous cherchions à étudier (en l'occurrence l'accroissement d'énergie déposée due à la présence d'élément lourd dans le milieu irradié). Cette problématique a fait l'objet d'expériences indépendantes avec un dosimètre chimique, le gel de Fricke. Nous le considérons ici comme une cible d'irradiation à part entière puisque nous l'avons confectionné de sorte qu'il soit complètement équivalent « homme porteur d'une tumeur cérébrale chargée en agent de contraste ».

IV.4.6.1. Principe

C'est en 1927 que Fricke *et al.* publièrent pour la première fois les propriétés dosimétriques des solutions ferreuses (contenant les ions Fe^{2+}) qui, sous radiations ionisantes, s'oxydent en ions ferriques (Fe^{3+}) [Fric27]. Typiquement, l'ordre de grandeur du rendement radiochimique G de la création d'ion Fe^{3+} est de 100-150 ions ferriques créés pour 100 eV absorbés. Cette réaction chimique étant directement proportionnelle à l'énergie absorbée dans la solution, le sulfate ferreux, également appelé solution de Fricke, est l'un des rares³¹ dosimètres absolus existant, dans la mesure où il est possible de doser la quantité d'ions Fe^{3+} formés par l'irradiation par spectrofluorométrie.

La conversion des ions ferreux en ions ferriques altère de plus le temps de relaxation longitudinale T_1 des spins des protons des noyaux d'hydrogènes de la solution aqueuse. La lecture de la solution de Fricke irradiée par résonance magnétique nucléaire permet donc de visualiser directement les distributions de doses par l'augmentation du taux de relaxation $1/T_1$.

Si une calibration adéquate a été préalablement réalisée, il est possible d'associer à chaque valeur de $1/T_1$ une dose absolue. Le dosimètre de Fricke permet ainsi l'obtention d'une

³¹ Avec la calorimétrie

information sur la dose non seulement quantitative, mais tri-dimensionnelle, ce qui le rend très attractif aujourd'hui puisque les traitements des cancers par radiothérapie évoluent vers la multiplication de champs d'irradiation de plus en plus petits et complexes, ce qui rend absolument nécessaire leur vérification [Gum02].

La grande proportion d'eau contenue dans les solutions de Fricke conduit à une très bonne équivalence dosimétrique avec les tissus humains, en particulier aux basses énergies [Keal99, Kron93]. Ceci conduit à la réalisation de fantômes tentant de reproduire les inhomogénéités du corps humain (air, os), pour tenter d'observer les modifications des distributions de dose [Gum02, Hepw99] (ce qui demeure fastidieux avec des dosimètres classiques comme les chambres d'ionisation [Mitc98]). L'idée de confectionner un dosimètre équivalent à une tumeur chargée en élément lourd est apparue à notre connaissance une seule fois dans la littérature : il s'agissait de rajouter des atomes de bore pendant la conception du gel et de l'irradier ensuite avec des neutrons pour simuler un traitement par BNCT (cf. § II.4.3.5.1 p.58) et tenter de mesurer le gain d'énergie associé [Far00]. Nous avons développé une démarche similaire en dopant le dosimètre de Fricke classique avec des éléments lourds et en l'irradiant par des rayons X monochromatiques. Des premiers essais avaient été menés dans le cadre d'un travail d'une étudiante en stage de maîtrise [Bist99]. Ses résultats avaient montré : i) que le gadolinium ne peut être utilisé comme produit dopant car son paramagnétisme masque et rend totalement imprécises des éventuelles modifications de temps de relaxation dues à un surplus d'énergie déposée ; ii) que l'introduction d'iode (aucune propriété paramagnétique) sous forme d'iodo-désoxyuridine dans le gel de Fricke conduisait à la catalyse de la réaction d'oxydation des ions ferreux en ions ferriques Fe^{3+} , sans toutefois modifier la sensibilité³² du gel, mais en accélérant néanmoins sa saturation.

IV.4.6.2. Préparation du dosimètre chimique dopé et rôle des constituants

La préparation du gel de Fricke est délicate si des mesures précises de dose sont souhaitées. De nombreuses précautions sont nécessaires, notamment pour créer un environnement stable aux ions ferreux. Les conditions de refroidissement et d'oxygénation du gel [Schu90], la température au moment de l'irradiation [Scho93, Spev01], les délais entre sa fabrication, son irradiation, et sa lecture en IRM, sont autant de facteurs influençant sa sensibilité et provoquant des phénomènes de diffusion à l'intérieur du gel, affectant

³² pente de la droite $1/T1=f(\text{dose d'irradiation})$. La linéarité de cette relation est en effet conservée même en présence d'iode.

grandement les distributions tri-dimensionnelles des doses (ordre de grandeur de la diffusion : $1.5 \text{ mm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ [Chu98]). Lorsque les conditions idéales sont réunies, une précision de l'ordre de 3 % dans la quantification 3D des doses absorbées peut néanmoins être atteinte [Bald99, DeDe01]. D'autres dosimètres chimiques (polymériques par exemple), quoique moins précis pour déterminer la dose absolue, sont de plus en plus étudiés et semblent plus pratiques d'utilisation [Bald98, Ibbo97, Lepa01, Mary96].

Le protocole que nous avons utilisé est un standard dans la fabrication des gels de Fricke [Gamb94, Gira99, Schu90]. Il a été mis en oeuvre dans le laboratoire de Biochimie A de l'hôpital Michallon (La Tronche, Grenoble), avec l'aide de M^{me} Rostaing. La procédure employée est la suivante :

Pour un litre³³ de gel de Fricke :

1/ Préparer 500 ml de solution de Fricke :

500 ml d'eau bi-distillée

Rajouter sous agitation magnétique :

- $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ de sulfate de fer $(\text{NH}_4)_2(\text{FeSO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (masse molaire : $391.85 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), soit 0.39185 g par litre de gel de Fricke final ;
- $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ de chlorure de sodium NaCl (masse molaire : $58.5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), soit 0.08775 g par litre de gel de Fricke final ; qui permettent de limiter l'influence des impuretés inorganiques ;
- $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ d'acide sulfurique H_2SO_4 (masse molaire : $98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; pureté 95% ; densité : $1.84 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), soit 2.803 ml par litre de gel de Fricke final. La solution doit être très acide ($\text{pH}=1$) pour garantir la formation d'un complexe hexaaquo ionique³⁴ des ions Fe^{3+} et très pure pour limiter l'effet négatif des contaminants [Palm00]

2/ Préparer 500 ml de gel d'agarose sous agitation magnétique :

- Faire chauffer jusqu'à 85°C 500 ml d'eau bi-distillée ;
- Verser doucement la poudre d'Agar-Agar (Prolabo[®]) : les quantités à introduire sont de 1% de la masse totale du gel soit 10 grammes pour 1 litre de gel de Fricke ; ce constituant assure la solidification de la solution après son refroidissement et limite donc les phénomènes de migrations ioniques.

³³ Prévoir en pratique des quantités de gel plus importantes que celles désirées, du fait de l'évaporation de celui-ci pendant sa préparation

³⁴ pour des pH plus élevés, d'autres espèces plus condensées se forment et nuisent à l'influence des ions ferriques sur les temps de relaxation de l'eau. Ainsi à $\text{pH} = 7$ la sensibilité du gel est nulle

Lorsque la température atteint 95°C, oxygéner la solution en y faisant buller de l'air ; une bonne saturation en oxygène permet de maximiser la sensibilité du gel en favorisant la génération d'ions ferriques sous irradiation.

Laisser cuire 20 minutes à 100°C puis stopper le chauffage ;

3/ Mélanger la solution de Fricke au gel d'agarose lorsque celui-ci a atteint une température de 70°C ;

4/ Verser le gel de Fricke dans son récipient lorsque sa température est d'environ 50°C ; le mélange aux agents pharmacologiques ou chimiques étudiés se fera à ce moment-là. Ces derniers ont été décrits au paragraphe § IV.2 p.116. Les concentrations introduites étaient typiquement de 10 mg.cm⁻³ pour les éléments lourds iode (Hexabrix[®], Telebrix[®]) et baryum (Micropaque[®]).

IV.4.6.3. Fantômes

Les tubes ayant servis à l'étalonnage étaient des tubes Falcon[®] de 15 ml, possédant un diamètre externe de 17.5 mm.

Des fantômes simulant des têtes humaines avec tumeur centrale chargée ou non en agent pharmacologique renforçateur d'effet photoélectrique ont également été confectionnés. Des flacons de milieu de culture vides (DMEM, Gibco-BRL, diamètre 8.2 cm) ont été remplis de gel de Fricke non dopé afin de simuler la zone saine du cerveau. Au centre de cette solution a été introduit un assemblage constitué d'un demi-tube Falcon[®] 15 ml vide sur lequel a été superposé un tube complet et fermé par bouchon remplie de solution dopée. Ainsi deux zones d'intérêts identiques en terme de refroidissement du gel et de chronologie d'irradiation étaient obtenues : la supérieure simulant la tumeur chargée en agent lourd et l'inférieure simulant la tumeur non dopée mais tout de même irradiée (cf. Figure IV-35 p.159).

IV.4.6.4. Irradiation

Préalablement à la campagne d'expérience réalisée à l'ESRF, des irradiations préliminaires ont été faites dans le service de radiothérapie du CHU de Grenoble. L'irradiateur utilisé était un appareil Philips RT de radiothérapie externe, alimenté par une tension de 100 kV_p. La filtration était de 2 mm d'Al (inhérent), la CDA de 2.6 mm d'Al, la taille du champ d'irradiation de 15x15 cm² à 50 cm, où se trouvaient les tubes Falcon[®] 15 ml contenant le dosimètre. Les doses d'irradiation délivrées étaient de 0, 2, 4, 6, et 8 Gy pour un débit de dose absorbée à la surface de l'eau de 62 cGy.min⁻¹. Ces expériences nous ont

notamment permis de choisir l'agent pharmacologique à utiliser pour nos campagnes d'expériences à l'ESRF.

Ces dernières se sont déroulées avec un mode de remplissage de l'anneau de stockage multi-paquets (16-bunch), l'intensité étant au maximum de 90 mA et au minimum de 60 mA. L'utilisation du monochromateur de tomographie nous a permis d'irradier nos échantillons aux énergies suivantes : 33.5 keV (gap 60 mm), 50 keV (gap 50 mm), 65 keV (gap 50 mm) et 80 keV (gap 40 mm). Les dimensions du faisceau étaient de 1 mm de haut et sa dimension horizontale a été rétrécie à 2 cm pour restreindre l'irradiation à la largeur des petites tubes Falcon® de 15 ml simulant la tumeur. 10 plans de coupes jointives ont été réalisés afin d'obtenir une hauteur totale irradiée de 1 cm (pour faciliter la détectabilité IRM). La vitesse de rotation des échantillons a été systématiquement ajustée pour obtenir une dose absorbée dans l'eau de 1 Gy/tour au centre du tube (le débit de dose était typiquement de l'ordre de 0.1 Gy/s, ce qui conduisait à des vitesses de rotation 36°/s environ, selon l'intensité et l'énergie du rayonnement synchrotron).

Pour une même série correspondant par exemple à une énergie d'irradiation, tous les gels ont été fabriqués, irradiés et imagés le même jour et d'un jour à l'autre, la même chronologie a été respectée. L'ordre aléatoire d'irradiation des tubes d'étalonnage et des fantômes têtes nous garantit un affranchissement des erreurs systématiques. Toutes les irradiations se sont déroulées à température ambiante.

IV.4.6.5. Lecture de gels par résonance magnétique nucléaire

Les gels ont été lus au plus tard 12 heures après leur conception et leur stockage a été réalisé à température ambiante. L'imageur par résonance magnétique nucléaire utilisé est le Philips NT system 1 Tesla du CHU de Grenoble. Les paramètres d'acquisition étaient : antenne tête, FOV 200 mm, 2 accumulations, matrice d'acquisition 256 et de reconstruction 512, SNR = 20, épaisseur de coupe = 5 mm, séquence T_{1mix} 730/2200/4x50. Le temps d'acquisition d'une image était d'environ 30 minutes. Une exploitation immédiate des images a été faite sur les images des tubes d'étalonnage par tracé de régions d'intérêts circulaires d'au moins 200 pixels dans les tubes.

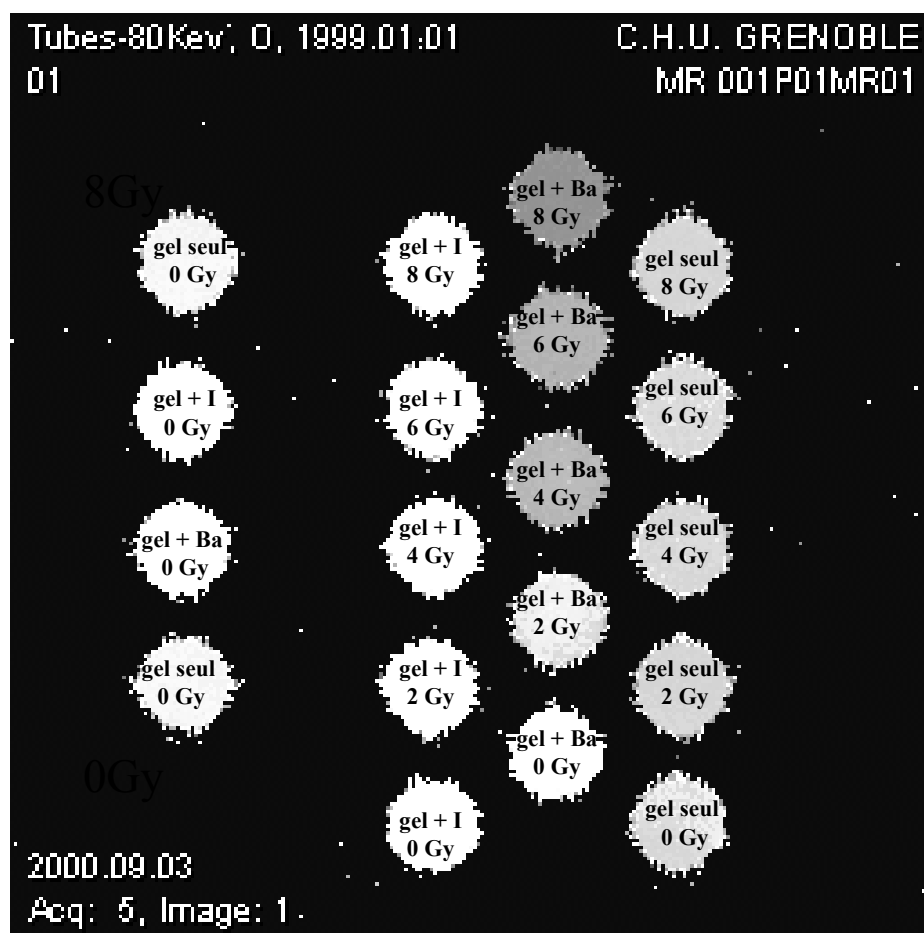


Figure IV-34 : Tubes d'étalonnage du gel de Fricke pur ou dopé à l'iode ou au baryum à 80 keV

Les images DICOM ont été par la suite à nouveau exploitées à l'aide du logiciel Osiris® v.3.6 (Medical Imaging Software, University Hospital of Geneva, téléchargeable gratuitement à l'adresse <http://www.expasy.ch/www/UIN/html1/projects/osiris/DownloadOsiris.html>). Ce visualiseur a notamment permis de sauvegarder et d'analyser les profils de distributions de doses dans les fantômes « têtes ».

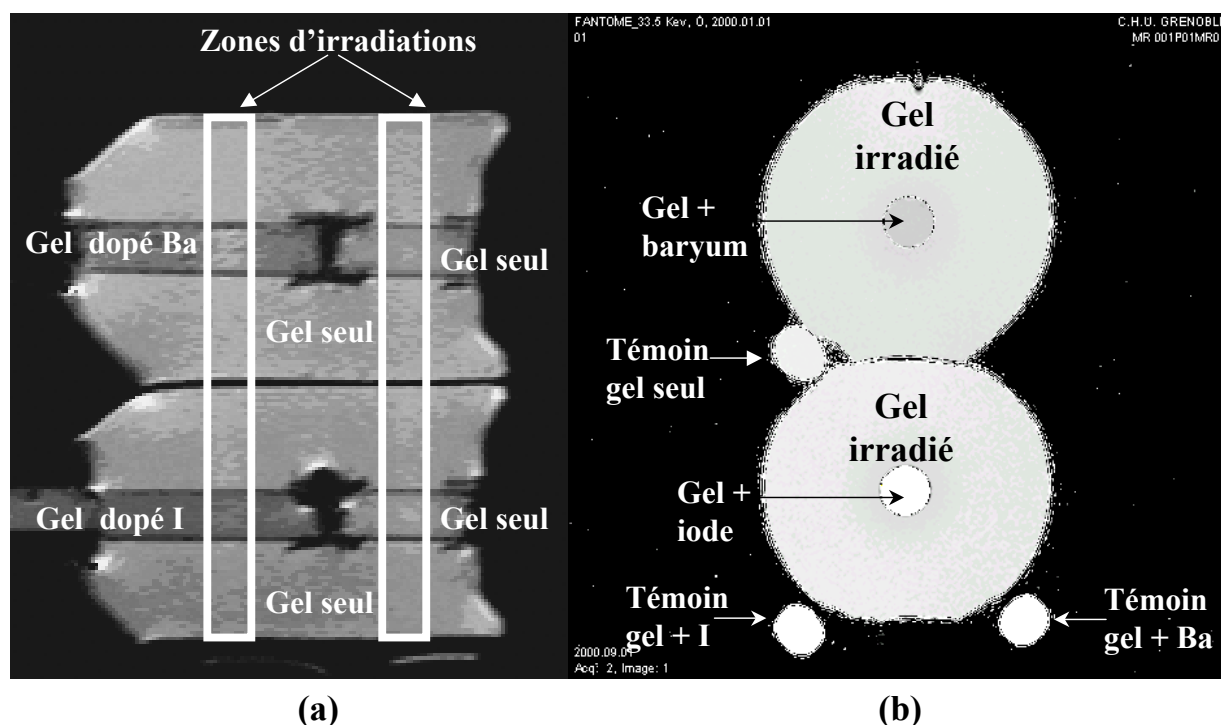


Figure IV-35 : Fantômes têtes irradiés à 33.5 keV (a) image sagittale de repérage (b) image transverse T_1

IV.5. QUANTIFICATION *IN VITRO* DES EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RADIOTHERAPIE

L'effet de notre technique de radiothérapie par rayonnement synchrotron avec effet photoélectrique sur des éléments lourds introduits dans le proche voisinage des cellules tumorales a été étudié *in vitro*. Ce choix s'imposait de lui-même pour débiter des expériences de radiothérapie encore inédites dans les thématiques de recherche de l'équipe RSRM. Il nous garantissait notamment une parfaite quantification des phénomènes observés grâce à la méthode des colonies qui permet, depuis 1956, une mesure exacte et reproductible de l'effet létal cellulaire des radiations ionisantes [Puck56]. Si nos travaux ont effectivement débuté par la mise en œuvre de cette technique de mesure en radiobiologie, quelque peu désuète malgré son statut international de « gold standard », le cours de nos travaux nous a finalement projeté vers les aspects les plus modernes de la radiobiologie moléculaire. Nos dernières expériences ont été marquées par le sceau de la nouvelle ère de la radiobiologie : celle qui découvre, localise et séquence de nombreux gènes impliqués dans la réparation cellulaire. Ainsi nous avons pu accéder, en adoptant cette démarche pluridisciplinaire, à une meilleure compréhension du mode d'action du traitement proposé et à formuler des hypothèses originales.

IV.5.1. Lignées cellulaires et conditions de croissance

Les lignées cellulaires choisies sont d'origine humaine et cancéreuses. Les cultures cellulaires ont été réalisées dans le laboratoire de culture cellulaire de l'unité INSERM U438 (Hôpital Michallon, La Tronche). Cet éloignement géographique du lieu de culture cellulaire par rapport au lieu d'irradiation (ESRF, Grenoble) a imposé de nombreuses contraintes notamment dans le choix des conditions d'irradiation.

IV.5.1.1. SQ20B

Cette lignée dérive d'une rechute post-radiothérapie d'un carcinome humain du larynx [Weic86]. Elle a été obtenue auprès de William K. Dahlberg (Dr J.B. Little Laboratory, Harvard School of Public Health, Boston, USA) et conservée jusqu'à notre utilisation par congélation dans l'azote liquide dans du milieu de culture complet additionné de 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO). Cette lignée est continue, de nature épithéliale et son gène p53 n'est plus fonctionnel [Brac93].

Les cellules se multiplient en monocouches dans des flacons plastiques ou des boîtes de Pétri (Falcon®). Elles sont incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide constituée à 95% d'air et 5% de CO₂ (qui assure la stabilité de pH du milieu). Le milieu de culture, du Dulbecco's Modified Eagle's Minimum medium (DMEM, Gibco-BRL®), est supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco-BRL®) et un mélange d'antibiotiques (pénicilline : 100 unités/ml; streptomycine : 100 µg/ml (Gibco-BRL®)). La quantité de milieu introduite dans les flacons de culture est de 0.4 ml.cm⁻².

L'efficacité d'étalement³⁵ des SQ20B est d'environ 50% et le temps de doublement de la population est de 20 heures environ. L'introduction de 200 000 cellules dans un flacon de 25 cm² conduit en 7 temps de doublement à une population de cellules quiescentes³⁶, par inhibition de contact au nombre d'environ 5.10⁶ cellules maximum. Après ensemencement, la phase de latence est d'environ 24 heures (au cours desquelles la moitié des cellules se détachent et l'autre moitié double en quantité). La croissance est ensuite exponentielle avant d'atteindre une semaine plus tard l'inhibition de contact encore nommée phase de plateau [Dahl92]. L'entretien des cellules s'effectue en trypsinant à fréquence hebdomadaire les flacons de culture (rinçage des flacons avec une solution saline tamponnée au phosphate :

³⁵ c'est-à-dire la proportion de cellules qui aura une descendance après repiquage

³⁶ qui ne se divisent plus, c'est-à-dire bloquées en phase G₀-G₁ de leur cycle cellulaire

PBS de Dulbecco puis application de trypsine à 0.25 % Gibco-BRL® pendant 5 minutes à 37°C) et en les réensemencant au 1/10. L'absence de mycoplasme a été contrôlée à l'aide du test DAPI (Boehringer-Mannheim®).

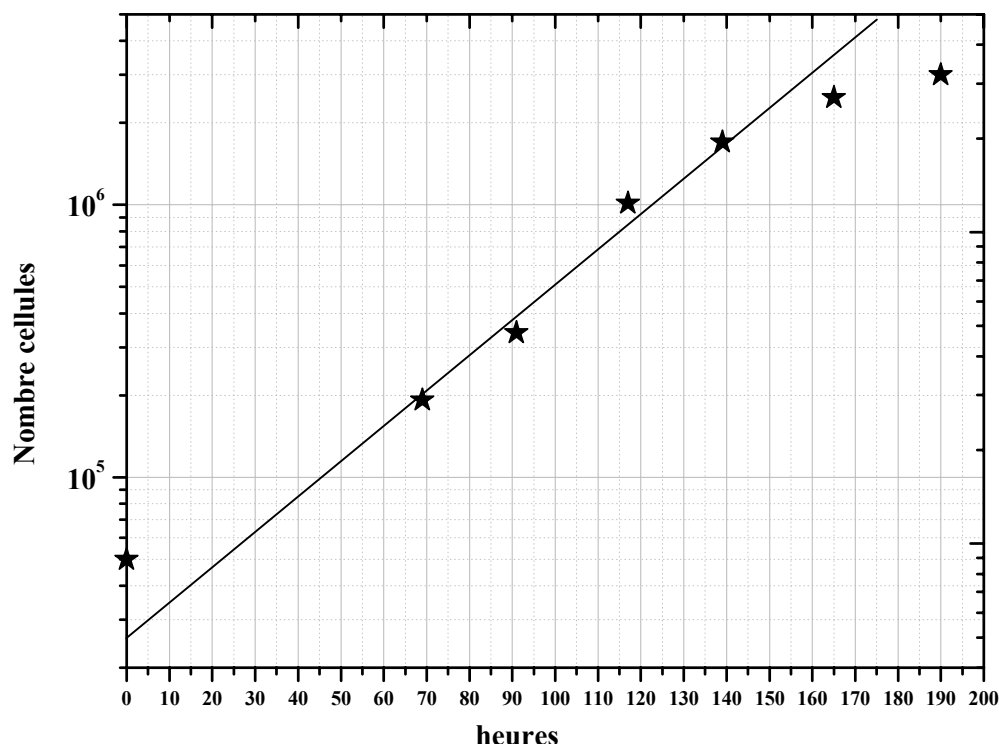


Figure IV-36 : Courbe de croissance de la lignée SQ20B. Le temps de doublement de la population a été expérimentalement vérifié à partir de la section droite de cette courbe correspondant à la phase de croissance exponentielle : 21 heures. Le comptage de cellules a été réalisé à l'aide d'un hématimètre de Malassez.

Cette lignée est connue pour sa radio-résistance : ses données radiobiologiques sont, pour une irradiation par rayons X conventionnels, $SF_2 = 0.58$; $\alpha = 0.185 \text{ Gy}^{-1}$ et $\beta = 0.045 \text{ Gy}^{-2}$ ([Balo97]). Nous avons vérifié ces données au cours d'expériences préliminaires réalisées dans le service de cancérologie-radiothérapie du Pr. Bolla du CHU de Grenoble (cf. Figure IV-37). La radio-résistance de cette lignée n'a pas été un critère ni de sélection ni de rejet pour notre étude. Sa robustesse, sa culture aisée et sa prolifération rapide sont les caractéristiques de cette lignée qui ont influencé notre choix. Les cellules adhèrent fortement au support de culture, sauf pendant la mitose où elles perdent leur aspect étalé pour retrouver une forme sphérique. Le détachement du support est signe de mort cellulaire.

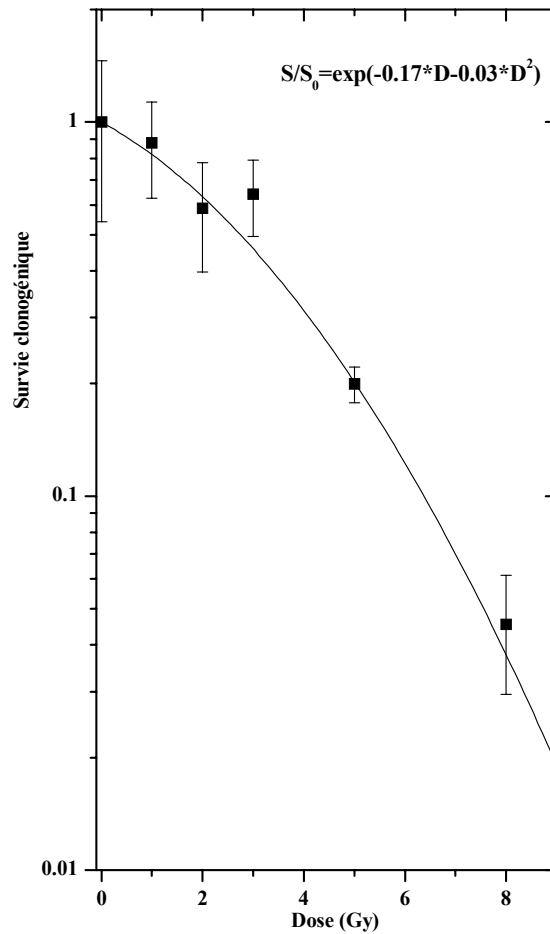


Figure IV-37 : Courbe de survie des cellules SQ20B irradiées avec un appareil Philips RT-250, Tension = 75 kV, $I = 20$ mA ; filtration inhérente = 2 mm Al ; CDA=1.7 mm AL ; DSP = 50 cm ; Taille du champ = 10×10 cm² à la DSP ; Débit de dose = 50 cGy/min. Les barres d'erreur symbolisent l'écart-type des valeurs trouvées pour 4 boîtes de Pétri

La majeure partie de nos expériences ont été réalisées avec cette lignée cellulaire. Nous n'avons eu recours aux autres lignées citées ci-dessous que pour valider ou invalider certaines hypothèses formulées suite aux résultats obtenus sur les cellules SQ20B.

IV.5.1.2. IGROV1

Il s'agit d'une lignée d'adénocarcinome ovarien humain aimablement fournie par le Dr Jean Bénard (Institut Gustave Roussy, Villejuif). Cette lignée a été obtenue à partir d'une tumeur épithéliale de l'ovaire d'une patiente présentant un cancer de l'ovaire au stade III [Bén85]. Aucune chimiothérapie n'avait été prodiguée préalablement à l'exérèse chirurgicale. Des cellules viables issues de cette biopsie ont été isolées et maintenues *in vitro*. Une fois adaptées à ce nouvel environnement, elles se sont développées en formant une monocouche adhérente au support de culture cellulaire.

Les conditions de culture sont identiques à celles qui ont été décrites pour les SQ20B, à l'exception de la composition du milieu de culture qui est du RPMI 1640, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco-BRL[®]) et un mélange d'antibiotiques (pénicilline : 100 unités/ml; streptomycine : 100 µg/ml (Gibco-BRL[®])). Le temps de doublement de la population cellulaire des IGROV1 est de 26 heures. Le passage des cellules est réalisé chaque semaine avec un facteur de transfert de 1/5. Son statut génétique révèle que cette lignée est mutée de manière hétérozygote pour ses gènes p53 et BRCA1 [Faja96].

In vitro, les cellules IGROV1 prolifèrent en monocouche homogène d'entités polygonales. Lorsqu'elles atteignent le stade de confluence, elles forment un tapis régulier de cellules jointives qui adhèrent au fond du flacon de culture. Toutefois des petites grappes de cellules rondes forment des agrégats en suspension au-dessus de la monocouche et leur nombre augmente à mesure que la culture se prolonge à confluence, sans atteindre ainsi de véritable phase de plateau.

Une sous-lignée de la lignée parentale des IGROV1, les IGROV1-DDP, a été rendue résistante au cisplatine par son exposition prolongée à 1 µg/ml de la drogue. Elle constitue donc un modèle expérimental pour l'étude des mécanismes de chimiorésistance des tumeurs, souvent responsables des rechutes post-chimiothérapie. L'existence de nombreuses données concernant le comportement de lignée parentale face au cisplatine, et notamment les quantités intra-nucléaires dosées par micro-analyse nucléaire PIXE [Orte94, Orte96] nous ont amenés à nous intéresser à cette lignée. Nous retiendrons qu'exposée pendant 5 heures à 10 µg de CDDP/ml de milieu de culture, les quantités de platine intracellulaires trouvées étaient de l'ordre de 200 ppm, ou 200 µg/g de cellule sèche, ou encore 3.10^8 atomes de platine/cellule si l'on estime la masse d'une cellule IGROV déshydratée à 0.5 ng.

IV.5.1.3. HCC1937

Il s'agit d'une lignée issue d'un carcinome primitif du sein développé chez une patiente de 24 ans [Toml98]. Une certaine proportion de cancers du sein ou de l'ovaire est susceptible de présenter une mutation au niveau d'un des gènes BRCA1 ou BRCA2, qui peut éventuellement être germinale par perte d'hétérozygote de l'allèle sauvage, hérité du parent non affecté. Les cellules HCC1937 présentent une mutation homozygote BRCA1^{-/-}. Cette déficience entraîne une hyper-sensibilité aux radiations ionisantes ($D_0 = 0.6$ Gy) [Fora99].

Leur culture a été réalisée dans du DMEM supplémenté de 20 % de sérum de veau fœtal (Gibco-BRL[®]).

IV.5.2. Survie cellulaire

La première méthode employée pour quantifier l'efficacité de l'irradiation avec renforcement d'effet photoélectrique stimulé par rayonnement X synchrotron, est basée sur l'évaluation de la survie cellulaire par dénombrement du nombre de clones survivants 15 jours après l'irradiation. Le principe du test de clonogénicité utilisé repose sur le réensemencement à faibles densités des cellules irradiées.

IV.5.2.1. Protocole expérimental

IV.5.2.1.1. Cultures cellulaires

Environ une semaine avant les dates prévues d'irradiation, 2.10^5 cellules ont été ensemencées dans des flacons de culture (flacons Falcon® de 25 cm² de surface) contenant 0.4 ml.cm⁻² du milieu de culture adapté à la lignée cellulaire.

L'exposition des cellules aux agents pharmacologiques a été réalisée différemment selon les spécificités de l'agent étudié. Plus particulièrement pour les courtes durées d'exposition aux drogues, les temps indiqués ci-dessous correspondent à une durée de présence totale (la durée de l'irradiation, souvent longue, est comprise dans cette durée totale).

- IUdR : mise en présence dans le milieu de culture de 10 µM d'iodo-désoxyuridine 48 heures avant le début de l'irradiation (lorsque les cellules sont encore en phase de croissance exponentielle et approximativement au ¼ de la saturation permettant d'atteindre la phase de plateau) ;

- CDDP : mise en présence dans le milieu de culture de 0.1 µM de cisplatine pendant 48 heures, puis l'optimisation de la quantité de platine incorporé au niveau cellulaire nous a conduit à envisager de plus fortes concentrations avec une durée d'exposition plus brève, pour ne pas trop augmenter la chimiotoxicité cellulaire de la drogue : ainsi des expositions de 1 et 3 µM pendant 12 heures ont été testées.

- PtTC : ce composé chimique, le chloroterpyridine platinum, n'étant absolument pas toxique pour nos lignées cellulaires [Joub01], des concentrations plus fortes ont pu être envisagées en comparaison du CDDP ; des expositions de l'ordre de 300 µM pendant 6 heures ont été envisagées.

- Agents de contraste iodés : le mode d'action attendu de ces agents étant indépendant d'une quelconque fixation sur une cible biologique, ces derniers ont été simplement rajoutés

au milieu de culture des échantillons irradiés. Les quantités étudiées étaient comprises entre 3 et 20 mg d'iode par ml de suspension cellulaire.

- DMSO : parfois un radioprotecteur, le diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich chimie, St Quentin Fallavier) a été rajouté au tampon de remplissage (10 % en volume) afin d'étudier la proportion d'effets indirects et l'influence de la radiolyse de l'eau sur nos résultats.

Toutes les expériences ont été réalisées avec des cultures cellulaires ayant atteint la phase de plateau le jour de l'irradiation. Selon le dispositif expérimental d'irradiation choisi (cf. Figure IV-38 p.166) les flacons de culture ont été complétés par une solution tamponnée HBSS (Gibco-BRL) ou bien trypsinés et les suspensions cellulaires, récupérées et supplémentées ou non en agent de contraste, ont été placées dans des cryotubes stériles de 2 ml à base ronde (Merck Eurolab, Division Polylabo, Lyon).

IV.5.2.1.2. Irradiation

Quel que soit le dispositif d'irradiation choisi (cellules adhérent à la paroi des flacons de culture ou en suspension dans des tubes) la dose d'irradiation a systématiquement été délivrée par translation des échantillons dans le faisceau synchrotron dont la hauteur, typiquement inférieure au millimètre, n'est pas propice à l'irradiation de grandes surfaces à des doses élevées. Les irradiations ont été réalisées à température ambiante. Les modes de remplissage de l'anneau de stockage utilisés étaient ceux offrant la plus grande intensité de rayonnement possible (200 mA maximum avec une durée de vie de 50 heures, comme par exemple le mode 2/3). Le monochromateur de tomographie s'est imposé pour les expériences se déroulant au seuil K du platine (78.4 keV) et pour la plupart des irradiations aux énergies plus basses, du fait de sa simplicité d'utilisation lors des changements d'énergies (géométrie plane parallèle). Pour éviter la surchauffe des éléments optiques situés en amont de la salle d'expérimentation, le faisceau « blanc » a été filtré par différentes associations de filtres (carbone, cuivre et aluminium).

Pour l'irradiation des flacons de culture, un support d'échantillon spécifique a été réalisé en plexiglas pour irradier plusieurs flacons en même temps (pour une dose donnée, ensemble des traitements pharmacologiques par exemple). Un système de moteur de positionnement dans le plan horizontal a été utilisé, couplé à un système de positionnement vertical (vitesse de 12.5 mm.s⁻¹). Il permet une irradiation simultanée et homogène de plusieurs flacons de cultures. Les boîtes ont été disposées de façon verticale orthogonalement à l'axe du faisceau, les cellules faisant directement face au faisceau à travers la paroi plastique

du flacon de culture. Les doses ont été échelonnées entre 1 et 8 Gy. Étant donné la hauteur du faisceau (environ 1 mm) par rapport à la très grande surface à irradier (45 cm de haut), nous avons choisi de délivrer les doses voulues en balayant verticalement plusieurs fois les flacons de culture (100 à 500 passages dans le faisceau, selon la dose), afin d'homogénéiser leur répartition temporelle. Ainsi pour délivrer une dose de 8 Gy, la durée d'irradiation est d'environ 6h (en moyenne 2 cGy délivrés par passage dans le faisceau).

En ce qui concerne l'irradiation des cellules en suspension dans les cryotubes, ces derniers ont été mis en rotation à une vitesse de π rad/sec pour éviter la sédimentation des cellules au fond des tubes pendant les multiples translations. Celles-ci possédaient une amplitude d'un centimètre environ, pour une vitesse de translation autour de 2.5 mm.s^{-1} (ajustée pour obtenir un nombre entier de translations). Dans ces conditions, 5 minutes environ étaient nécessaires pour réaliser les 100 translations requises pour une dose totale de 8 Gy. Les tubes ont été irradiés par paire lorsque l'homogénéité horizontale du profil était suffisante.

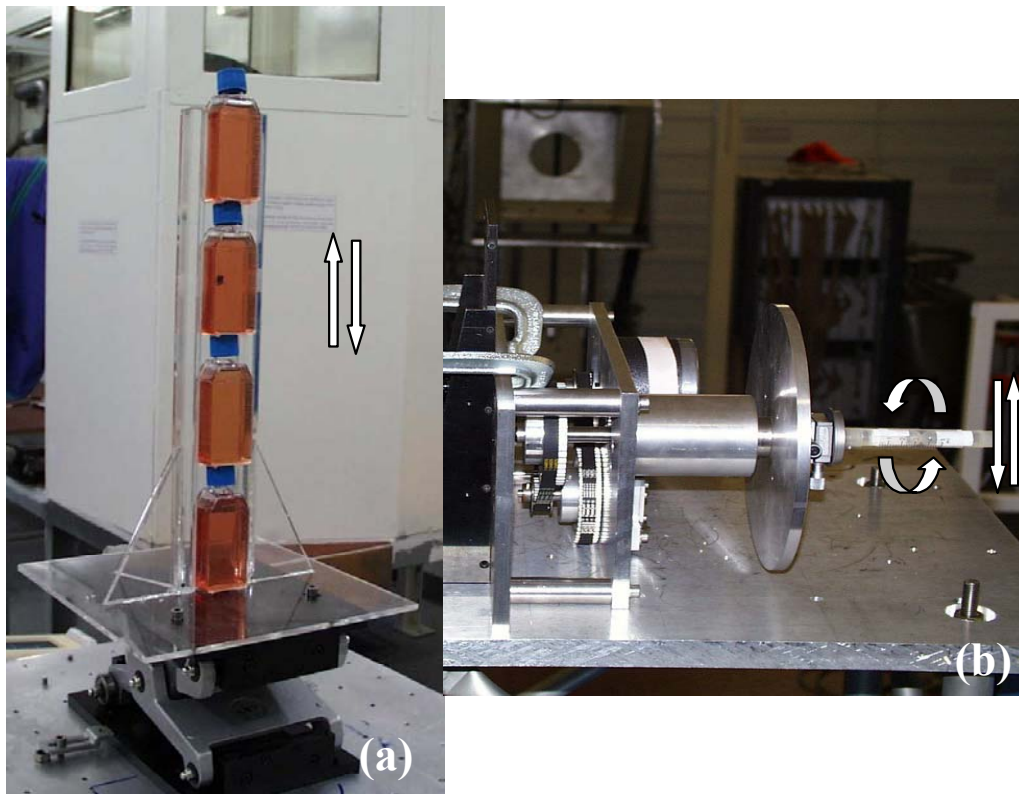


Figure IV-38 : Dispositifs expérimentaux d'irradiation cellulaire (a) par translation de flacons de culture de 25 ou 12.5 cm² et (b) par rotation de cryotubes de 2 ml

Préalablement à l'irradiation, le faisceau a été calibré selon la procédure décrite au paragraphe § IV.4.1 p.143 et l'homogénéité du faisceau dans sa dimension horizontale vérifiée avec le détecteur Germanium haute pureté (la limite fixée était de 10 % pour

l'inhomogénéité, mais celle-ci était typiquement de 5%). Les doses d'irradiation ont été enregistrées et recalculées *a posteriori* selon la méthode exposée précédemment (§ IV.4.5 p. 151).

IV.5.2.1.3. Test de clonogénicité

A la fin de l'irradiation, selon l'expérience, les flacons de cultures ont été replacés à l'incubateur pour une période allant de 12 à 24 heures, avec du milieu de culture conditionné (c'est à dire appauvri en éléments nutritifs et en facteurs de croissance pour ne pas stimuler les cellules). Cette procédure favorisait la réparation de dégâts potentiellement létaux (PLDR) et présentait le double avantage de réduire l'importance du facteur temps dans des expériences longues et contraignantes pour les cellules et d'augmenter des différences potentielles entre les différents traitements pharmacologiques, dans l'hypothèse d'une réparation moins efficace des dégâts les plus critiques.

Après ce délai les cellules ont été rincées dans du PBS sans calcium ni magnésium (Gibco®-BRL), incubées pendant 5 minutes à 37°C avec une solution de trypsine à 0.05%, ensuite inhibée par quelques millilitres de milieu de culture cellulaire. Une suspension monocellulaire est ensuite obtenue en travaillant bien cette solution, équivalente à celle présente dans les tubes irradiés.

Le titrage, dénombrement des cellules présentes par unité de volume de la suspension, a été réalisé à l'aide d'un hématimètre de Malassez. Les densités de cellules ré-ensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre étaient faibles et choisies en fonction de la toxicité prévue du traitement pour obtenir un nombre de colonies survivantes de l'ordre de la centaine (200 cellules pour les contrôles, jusqu'à 100 fois plus pour les fortes doses d'irradiation et d'agents pharmacologiques). Pour chaque échantillon irradié au moins trois boîtes de Pétri ont été ensemencées pour obtenir des données statistiquement cohérentes. Lorsque cela a été possible, les expériences elles-mêmes ont été entièrement reproduites indépendamment d'un jour à l'autre.

La faible densité des sous-cultures réalisées a permis le dénombrement convenable des colonies, après 15 jours d'incubation dans du milieu de culture complet à 37°C en atmosphère humide (95% air, 5% CO₂). Au bout de cette période, le contenu des boîtes de Pétri a été rincé avec un tampon PBS avec calcium et magnésium (pour ne pas stimuler le détachement des colonies de leur support) puis exposé pendant une minute à 2 ml d'une solution composée au 3/4 d'éthanol (fixation des cellules) et 1/4 de colorant Cristal Violet (Prolabo®).

IV.5.2.1.4. Cytométrie en flux

La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée à plusieurs moments de la procédure expérimentale. La longueur de cette dernière aurait pu en effet entraîner une redistribution des cellules dans le cycle cellulaire, et donc modifier leur radiosensibilité et conduire à des biais d'interprétation (cf. § II.3.4.3.4 p.40). L'exploitation des échantillons de cellules fixées a été faite par Magali Barbier du service de cytologie du Pr. Seigneurin du CHU de Grenoble. Les cellules préalablement perméabilisées et marquées à l'iodure de propidium (marqueur intercalant de l'ADN et émettant une fluorescence à 480 nm, Kit Cycle Test, Becton-Dickinson) ont été analysées une à une par un cytomètre Facs Callibur[®] Becton-Dickinson et les résultats exploités par le logiciel Mode Fit[®].

IV.5.2.2. Dénombrement du nombre de clones survivants

La difficulté à dénombrer les colonies survivantes réside dans le fait que, à de rares exceptions près, les cellules « stérilisées » par l'irradiation demeurent physiquement intactes et biochimiquement fonctionnelles jusqu'à ce qu'elles essaient de se diviser [Whel82].

Étant donné que les cellules survivantes subissent rarement plus de 4 ou 5 divisions lorsque persistent des dommages après irradiation et réparation, Puck et Marcus ont admis qu'une cellule est viable si elle a donné naissance à un clone contenant plus de 50 cellules [Puck56]. Quoique arbitraire, cette limite présente l'avantage de fournir une règle de comptage rapide des colonies survivantes, qui deviennent alors discernables à l'œil nu. De plus elle permet d'avoir des résultats statistiquement significatifs si les effets mesurés sont assez grands pour qu'un manque de précision puisse être toléré dans le comptage des survivants [Spad94].

Mais lorsque de petits effets sont mesurés, la définition précise d'un survivant peut influencer significativement les résultats expérimentaux. Il devient donc nécessaire de faire la distinction entre les cellules survivantes à croissance lente et très lente des colonies abortives subissant un nombre limité de divisions (celles ci pouvant encore aller jusqu'à 5 ou 6 divisions avant de terminer leur reproduction). Ce choix est d'autant plus délicat que la taille des colonies dérivées des cellules survivantes décroît significativement avec l'augmentation de la dose d'irradiation. La prolifération des cellules irradiées diminue par rapport aux cellules non irradiées [Micha84]. Par ailleurs la taille des colonies présentes dans les colonies peut devenir anormalement grande du fait de la poursuite de leur croissance sans mitose.

Ainsi, la période d'incubation parfaitement adéquate pour produire des colonies bien développées provenant de toutes les cellules d'une boîte de contrôle peut être insuffisante pour permettre l'identification de survivants ayant une croissance lente [Puck56].

De même on a une reproductibilité moins bonne à des doses élevées où l'on doit introduire 10^4 à 10^5 cellules dans chaque boîte pour être capable de compter des colonies survivantes. Pour ces doses là, il est fort probable que la survie sera surestimée. C'est pourquoi, pour identifier les survivants, il est utile de connaître certains paramètres comme par exemple la taille des colonies qui peut nous permettre de déterminer les distributions de tailles des clones et fixer un seuil afin d'estimer la survie clonogénique. Ceci n'est évidemment pas réalisable manuellement et nécessite l'emploi d'un logiciel de comptage de colonies [Barb01].

Pour les deux techniques de comptage détaillées ci-dessous, la précision des résultats obtenus trouvent essentiellement sa limite dans l'imprécision de la densité de cellulesensemencées. Dans notre méthode, celle-ci repose sur un comptage très précis, bien que « manuel », de cellules placées sur un hématimètre de Malassez, qui cependant n'échantillonne que très grossièrement la solution mère, puisque le dénombrement n'est réalisé que sur un microlitre. Le mélange correct de l'inoculumensemencé est également un paramètre crucial, puisqu'en cas de mélange incorrect, le logiciel tout comme l'observateur ne sont pas capables de séparer avec exactitude les colonies coalescentes.

IV.5.2.2.1. Méthode classique

Les clones sont dénombrés manuellement et la proportion de cellulesensemencées donnant naissance à un clone, en fonction de la dose de rayonnement, permet d'établir la courbe de survie cellulaire.

IV.5.2.2.2. Méthode semi-automatique assistée par ordinateur

L'acquisition d'un logiciel de comptage automatique des colonies fixées dans des boîtes de Pétri et colorées a fait l'objet d'un appel d'offre auquel a répondu avec succès la société SAMBA Technologies³⁷.

Ce logiciel a permis d'optimiser l'évaluation de la survie cellulaire, notamment en nous affranchissant des incertitudes liées au manque de reproductibilité inter-observateurs et inter-expériences de la méthode de comptage manuel des colonies. Ce logiciel propose une

³⁷ 53 chemin du vieux chêne 38240 Meylan, France. Tél : +33 (0)4-76-04-00-50 ; Fax : +33 (0)4-76-04-15-98

méthode d'analyse des paramètres des colonies basée sur la mesure des densités optiques transmises par le colorant.

La procédure de comptage automatique des colonies comprend plusieurs étapes (cf. Figure IV-40 p.172):

- 1) Numérisation de l'image des boîtes de Pétri à l'aide d'un scanner de bureau haute résolution (600 x 1200 ppp) possédant un module pour transparent de format A4 (type Duo Photo Snapscan 1236S AGFA compatible TWAIN, interface SCSI pour compatibilité avec Windows NT). Avec la résolution utilisée en pratique (200 ppp) le fichier résultat pour une image couleur de format BMP, de taille 748*748 pixels (3.75x3.75 pouces) nécessite 1.6 MB³⁸ de place mémoire.
- 2) Étalonnage du logiciel pour la série de boîtes scannées. Une boîte de Pétri de référence est choisie dans le lot, le nombre de cellules par colonies est dénombré (microscope) dans un maximum de 25 colonies, choisies pour leur diversité en taille, forme et couleur. Si quelques points sont nécessaires sur la gamme d'étalonnage parmi les colonies présentant un nombre élevé de cellules, seules les colonies aux alentours de la zone d'intérêt (50 cellules) sont en pratique intéressantes. Après analyse des colonies choisies, le logiciel d'étalonnage établit ensuite une relation directe entre le nombre de cellules par colonie annoncé et la densité optique intégrée (DOI) mesurée sur tous les pixels de la colonie (cf. Figure IV-39 et Tableau IV-8). Cette procédure implique que la coloration des boîtes de Pétri soit stœchiométrique. Le protocole de coloration FEULGEN-PARAROSANILINE, proposé par SAMBA Technologies, s'est révélé inadapté aux boîtes de Pétri. Une solution de cristal violet a permis une coloration satisfaisante sur le plan opérationnel en respectant certaines précautions élémentaires³⁹.

³⁸ 400 images archivables sur un CD-ROM

³⁹ Le protocole de coloration des boîtes de Pétri a été standardisé : 2ml de colorant pendant une minute puis rinçage immédiat à l'eau froide.

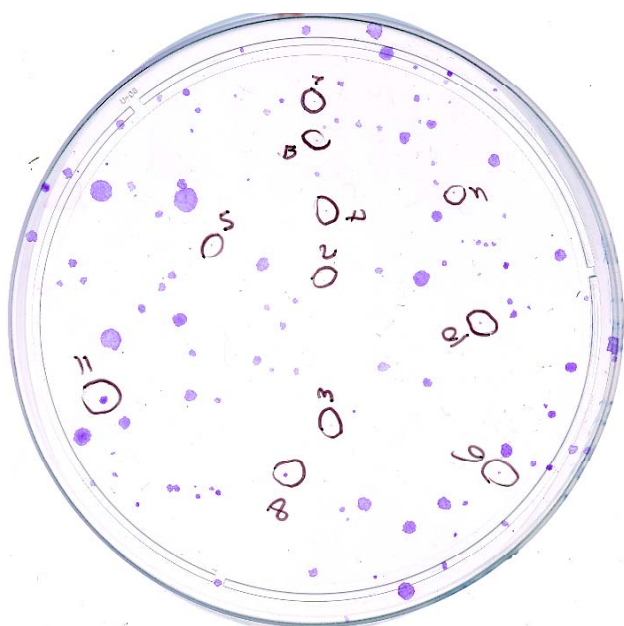


Figure IV-39 : Exemple de boîte de Pétri ayant servi à l'étalonnage du logiciel Samba

Colonie n°	Nombre de cellules	DOI mesurée
1	120	207
2	13	46
3	25	106
4	149	381
5	4	194
6	163	436
7	3	222
8	920	1450
9	116	286
10	161	399
11	2200	5559

Tableau IV-8 : Gamme d'étalonnage correspondante

- 3) Sélection de la surface de la boîte que l'on souhaite analyser (diamètre de la région d'intérêt légèrement inférieur au diamètre de la boîte de Pétri)
- 4) Seuillage de l'image. Les colonies sont prises en compte par le logiciel au moyen de la technique de segmentation « Top Hat », qui, par une série d'érosions et de dilatations successives, assure l'extraction des objets contrastés de l'arrière plan de l'image. Le seuil peut être ajusté manuellement mais la valeur choisie pour la calibration du logiciel doit nécessairement être respectée pour la totalité du traitement des boîtes associées. En effet, la valeur du seuil modifie la DOI de chaque clone et par conséquent le nombre de cellules estimé dans le clone. Des colonies bien développées pourront être analysées avec une valeur de seuil élevée par contre des valeurs plus basses seront préférables pour des colonies plus petites. Toutes nos données ont été traitées en 50 itérations pour une valeur de seuil de 25.
- 5) Reconnaissance des formes et séparation automatique des colonies accolées. Cette dernière est faite à partir d'un seuil de différence de densité optique constaté par le logiciel au niveau d'une colonie. Des rectifications manuelles peuvent être apportées au masque grâce à l'utilisation d'outils graphiques conventionnels (colonies non séparées, oubli de colonies, artéfacts à éliminer...).

- 6) Comptage automatique des colonies. Au cours de cette dernière étape, le logiciel compte le nombre de colonies présentes sur la surface analysée et calcule différents paramètres tels que la densité optique globale et intrinsèque, la surface, le périmètre, le facteur de forme, le nombre de cellules et ceci, pour chaque colonie recensée. Un fichier rassemble les résultats, qui peuvent alors être présentés sous forme d'histogrammes, de graphiques et fournir des paramètres statistiques sur la morphologie distributions cellulaires de chaque boîte.

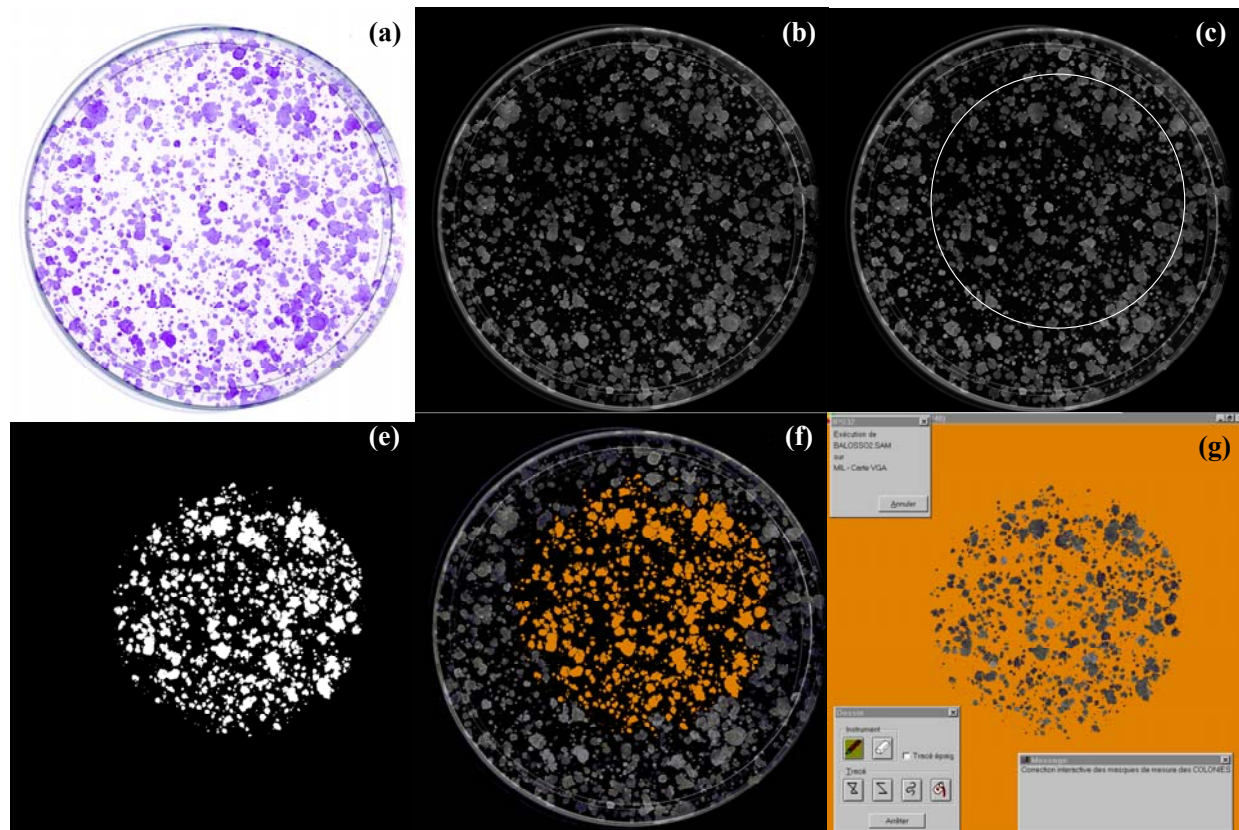


Figure IV-40 : Les différentes étapes du comptage automatique des colonies fixées et colorées dans des boîtes de Pétri.

(a) Numérisation des boîtes avec un scanner de bureau ; (b) Sélection et ouverture de l'image à analyser par le logiciel SAMBA[®] ; (c) Sélection d'une région d'intérêt circulaire ; (d) Application d'un masque à la zone de l'image hors de la zone d'intérêt ; (e) Analyse de la zone d'intérêt par le logiciel, en fonction du paramètre du nombre d'itération et du seuil introduits ; la séparation automatique des colonies a été réalisée ; (f) Reprise manuelle du masque, si nécessaire.

L'utilisation de ce logiciel pour la quantification de la survie cellulaire a été validée dans le cadre d'un travail de stage de DEA par Marie-Claude Biston [Bist00]. L'intérêt d'une telle méthode réside dans la qualité et la quantité d'informations disponibles, largement supérieures à celles obtenues manuellement. De plus ce logiciel permet de s'affranchir de la variabilité des résultats de comptage intra- et inter-observateurs (cf. Figure IV-41). Il a néanmoins été montré que si des différences notables sont possibles sur le nombre de colonies comptées manuellement par boîte, ces différences s'estompent après normalisation des

données. Le logiciel SAMBA, même lorsqu'il est utilisé par deux utilisateurs différents a une réponse plus constante et en particulier semble plus performant pour l'analyse des traitements les plus toxiques. En comptage manuel, les observateurs ont en effet tendance à sous-estimer le nombre de clones survivants.

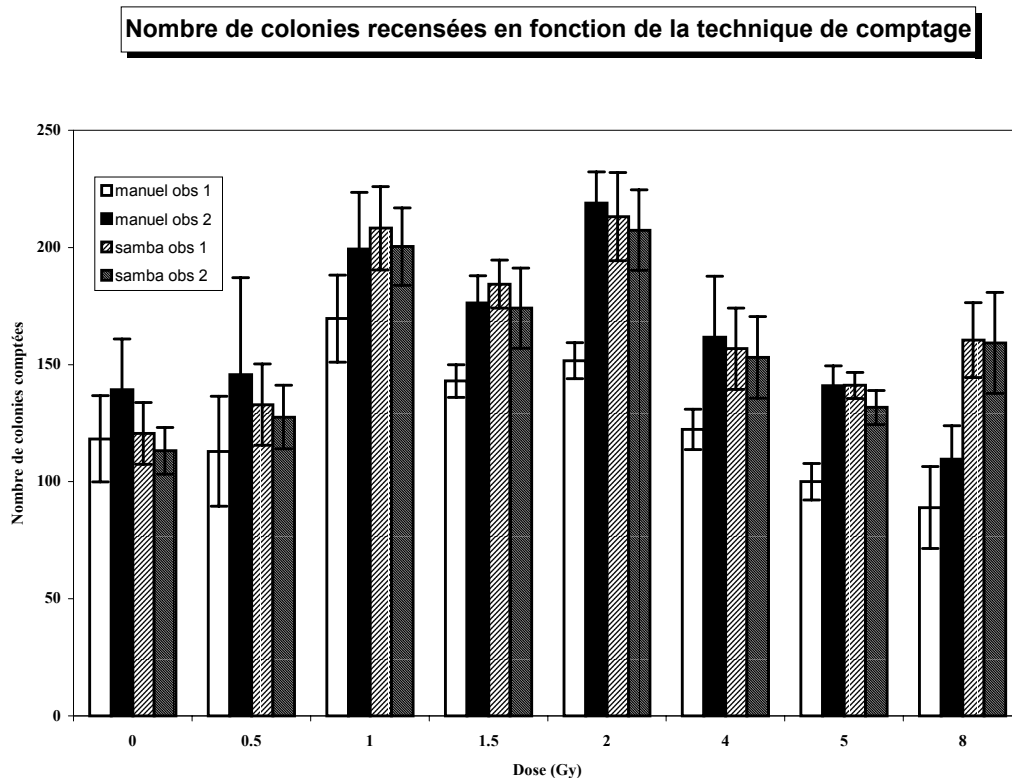


Figure IV-41 : Comparaison des nombres de clones survivants (plus de 50 cellules) dénombrés manuellement et à l'aide du logiciel Samba par deux observateurs.

IV.5.2.3. Mise en forme des données, courbes de survie cellulaire

L'ensemble des fichiers résultats obtenus après comptage semi-automatique des boîtes de Pétri a été analysé en série grâce à une routine développée sous Microsoft Excel. Celle-ci permet d'ouvrir l'ensemble des fichiers d'une expérience et de trier les informations disponibles pour ne donner, pour chaque boîte de Pétri, que le nombre de clones recensés possédant plus de 50 cellules. Lorsqu'en revanche le comptage a été manuel, c'est la seule information dont nous disposons et c'est donc celle-ci qui nous a d'abord intéressés.

Les données recueillies rapportées aux nombres de cellulesensemencées ont été ensuite moyennées et la valeur obtenue pour le témoin non irradié a été rapportée à 1. Lorsque les expériences ont été reproduites plusieurs fois, l'ensemble des données a été fusionné avant la normalisation et les moyennes sont présentées avec des barres d'erreurs représentant l'écart-type. Dans le cas particulier des cellules irradiées et soumises de plus à un traitement

pharmacologique, nous nous sommes de plus intéressées à la toxicité intrinsèque de l'agent pharmacologique testé. Les courbes ont donc été normalisées non seulement par rapport au témoin non irradié (et traité par un l'agent), mais également par rapport au témoin absolu, c'est-à-dire non irradié et non traité pharmacologiquement. Même si cette information est plus complète, dans le but de simplifier les comparaisons concernant l'effet du rayonnement sur les courbes de survie, nous proposons dans ce mémoire de ne présenter que les données normalisées par rapport au témoin irradié (et traité par l'agent), même si nous avons conscience i) d'une perte d'information visuelle concernant la toxicité intrinsèque de l'agent sur nos lignées cellulaire (nous indiquerons dans la légende des figures la valeur de cette toxicité à 0 Gy) et ii) qu'une l'hypothèse non démontrée sous-jacente à cette démarche est que les mécanismes de toxicité de l'agent pharmacologique ne dépendent pas de la dose de rayonnement délivrée.

IV.5.2.4. Ajustement des courbes selon le modèle linéaire-quadratique

Les données expérimentales ont été ajustées au modèle linéaire-quadratique (cf. § II.3.4.2 p.35) avec le logiciel de calcul Origin[®] v.6.0 (Microcal TM Software, Northampton, MA, USA). Les valeurs des paramètres α et β ont été initialisées à 0.1 et 0.01 respectivement, avec comme contrainte supplémentaire d'obtenir un résultat positif. De plus toutes les courbes devaient passer par 1 à l'origine des abscisses (100 % de survie à 0 Gy). L'importance des points expérimentaux pour l'ajustement a été définie comme étant égale à l'inverse des valeurs des survies, afin de forcer les ajustements à prendre en considération les points correspondants aux plus fortes doses d'irradiation.

IV.5.2.5. Définition du SER ou *sensitization enhancement ratio*

Une fois les paramètres α et β connus pour chaque courbe de survie, l'efficacité relative des différents traitements pharmacologiques a été comparée grâce au calcul d'un facteur de sensibilisation, qui, pour un niveau de survie S donnée, se définit comme le rapport des doses nécessaires pour obtenir cet effet.

(Eq. IV-12)

$$SER^S = \frac{D_{ref}^S}{D_{test}^S}$$

où D_{ref} est la dose à délivrer aux cellules de référence (contrôles non traités pharmacologiquement) et D_{test} celle à délivrer aux cellules testées (ayant subi un traitement pharmacologique) pour obtenir le taux de survie S .

IV.5.3. Lésions moléculaires et cinétiques de réparation

Le taux de cassures simple- et double-brin de l'ADN générées par notre traitement a été évalué par la technique d'électrophorèse en champs pulsés. Cette technique permet la migration et la quantification de fragments d'ADN de très haut poids moléculaire dans un gel d'agarose sous l'influence de deux champs électriques émis alternativement et formant un angle de 120° dans la direction de migration. Cette technique est maintenant couramment utilisée pour la visualisation et la quantification des fragments d'ADN longs (jusqu'à 10 Mpb) et a remplacé l'élution alcaline et neutres, moins sensibles. Avant traitement, l'ADN des cellules étant généralement marqué par nucléotide radiomarké comme la thymidine tritiée ou carbone 14 (^3H -thymidine ou ^{14}C -thymidine), le nombre de fragments d'ADN générés peut être quantifié par la radioactivité migrante (FAR : fraction of activity released). La relation entre la distribution des fragments en fonction de leur taille et le nombre de cassures correspondant a fait l'objet de nombreuses publications. Cette technique a été mise à notre disposition par le Dr Nicolas Foray (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex, Brighton, Grande-Bretagne – Institut Curie, Orsay France) à Brighton et à Orsay. Le protocole adopté est donc un protocole classique déjà éprouvé et les paragraphes ci-dessous décrivent les procédures publiées précédemment [Fora97c].

IV.5.3.1. Préparation des échantillons à irradier

Pour quantifier les cassures simple et double-brin par électrophorèse en champ pulsé nous avons utilisé le protocole de préparation de l'ADN cellulaire recommandé par N. Foray [Fora97c]. Les cellules en phase de croissance exponentielle (flacons Falcon[®] de 12.5 cm^2 de surface) sont marquées avec 370 Bq.ml^{-1} de thymidine tritiée (^3H -thymidine 248 MBq.mmol^{-1} , NEN Dupont de Nemours, Wilmington, Delaware USA), soit $0.01\text{ }\mu\text{Ci.ml}^{-1}$ pendant 3 jours, puis rincées et remises en culture avec leur milieu habituel, pendant 24 heures minimum (pour permettre la disparition des fragments d'Okasaki). Trente minutes au moins avant le début de l'irradiation, les flacons contenant des cellules en plateau phase sont entièrement complétés d'une solution tampon (HBSS Gibco-BRL[®], éventuellement dopée en agent

pharmacologique) pour permettre leur transport et leur irradiation en position verticale et placés dans la glace.

IV.5.3.2. Procédure d'irradiation

Les flacons de culture ont été irradiés par lots de 3 ou 4 disposés sur le support décrit précédemment (cf. § IV.5.2.1.2). Pour chaque énergie étudiée les doses d'irradiation (7, 10 et 16 Gy) ont été atteintes par translation du support dans le champ d'irradiation. Afin d'inhiber l'action des systèmes de réparation cellulaire, la température des échantillons a été maintenue à 4°C pendant toute la durée des irradiations grâce au dispositif imaginé et réalisé par Michel Rénier, schématisé ci-dessous.

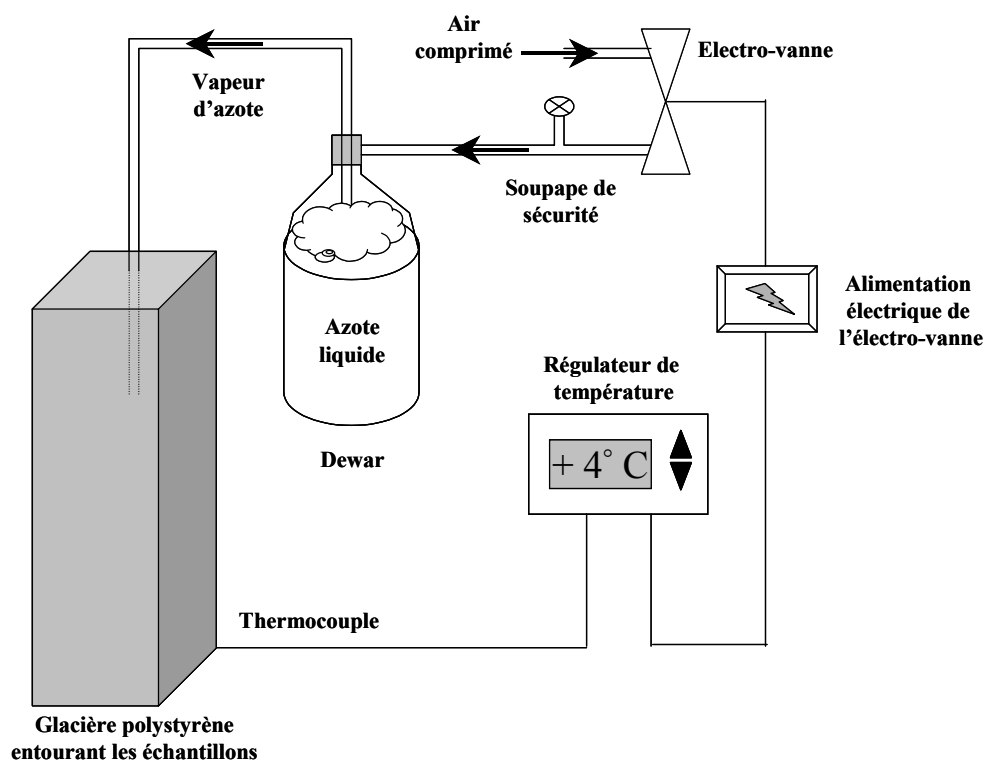


Figure IV-42 : Principe du système de réfrigération des échantillons cellulaires pendant l'irradiation

IV.5.3.3. Protocole de préparation des blocs d'agarose (*plugs*)

Immédiatement après la fin de l'irradiation, les flacons irradiés ont été remis en glace et transportés au laboratoire de culture cellulaire. Le milieu tampon a été retiré, les flacons demeurant au contact de la glace.

En vue de l'étude de l'incidence des cassures de l'ADN, les cellules ont été rincées au PBS froid et trypsines à 4°C pendant 20 à 30 minutes à l'aide d'une solution de trypsine à 0.25%. Lorsque la cinétique de réparation des cassures était l'objet de l'étude, le milieu

prélevé a été remplacé par du milieu de culture complet, préchauffé à 37°C. Les flacons étaient alors replacés dans l'incubateur à 37°C pour les durées de réparation prévues (typiquement 1 et 4 heures). La réparation était ensuite stoppée par le rinçage au PBS refroidi, et la dispersion des cellules effectuée selon le même protocole que celui utilisé pour l'étude de l'incidence des cassures.

Après titrage des solutions cellulaires obtenues, celle-ci furent centrifugées (5 minutes à 1500 tr/min). Après rinçage du culot au PBS froid, les cellules ont été re-centrifugées. Elles furent ensuite resuspendues dans une solution de PBS froid et d'agarose Low Melting Point (société Seakem) à 1% maintenue à 40°C puis injectées dans des logettes rectangulaires en plastique de 100 µl (2x5x10 mm³) afin de former des blocs d'agarose (*plugs*) contenant 2.10⁶ cellules/ml. Ces moules ont été immédiatement portés à 4°C pendant au moins une heure pour obtenir une solidification complète de l'agarose. Les blocs d'agarose (*plugs*) délicatement démoulés ont été placés dans des tubes contenant une solution de lyse (2% de N-laurylsarcosine Sigma[®]; 400 mM EDTA Sigma[®]; 1 mg.ml⁻¹ de protéinase K Gibco-BRL[®]) à pH 8 pour les cassures double-brins et pH 12 pour les simple-brins. Après une heure à 4°C pendant laquelle la solution de lyse diffuse dans l'agarose, les tubes ont été placés pendant 24 à 38 heures à 50°C, température à laquelle la protéinase K peut s'activer pour digérer les protéines cellulaires et en particulier celles de la matrice nucléaire, libérant ainsi l'ADN. La N-laurylsarcosine est quant à elle un détergent tensioactif solubilisant les acides gras des membranes. La lyse a été arrêtée par rinçage des blocs d'agarose dans du tampon TE8 (2 mM de tris[hydroxyméthyl]amino-méthane, 10 mM EDTA pH 8 Gibco-BRL[®]) à 4°C pendant une heure. La solution de TE8 a ensuite été renouvelée pour conservation des *plugs* à 4°C.

IV.5.3.4. Électrophorèse en champs pulsés

Comme nous l'avons brièvement rappelé au paragraphe § II.3.2, cette technique repose sur le fait que les fragments d'ADN, chargés négativement, migrent sous l'effet d'un champ électrique d'autant plus vite que leur taille est petite. La variation périodique de la direction et de l'intensité du champ électrique, caractéristique de l'électrophorèse en champs pulsés, assure une dissociation des longs fragments d'ADN enlacés.

Un appareil de type CHEF III (Clamped Homogeneous Electric Field, Biorad[®], Hercules, CA, USA) a été utilisé pour les programmes de migration des gels. Celui-ci est constitué de plaques d'électrophorèse de 24 électrodes disposées en hexagone, assurant des

changement d'angle de champs jusqu'à 120°. D'autre part une grande homogénéité des champs est assurée à la surface des gels grâce aux gradients d'intensité.

Les blocs d'agarose ont été placés dans les puits pour une migration de 96 heures (taille maximale migrante double-brin : 10 Mbp) pour les cassures double-brin [Badi95] et de 24 heures pour les cassures simple-brin. Après migration, les gels ont été colorés par une solution de bromure d'éthidium (0.1 mg.l⁻¹). Grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium sous UV, chaque bande de migration a été séparée en deux parties, la migrante et la non-migrante, puis fondues au micro-onde. La radioactivité des deux parties a été estimée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard. Si cpm_{mig} et $cpm_{non-mig}$ représentent respectivement les activités mesurées en coups par minutes pour les fractions migrantes et non-migrantes, la FAR (Fraction of Activity Released) a été obtenue par la relation suivante :

(Eq. IV-13) :

$$FAR = \frac{cpm_{mig}}{cpm_{mig} + cpm_{non-mig}}$$

IV.5.4. Voies de réparation

L'objectif de cette double étude a été d'apprécier quelles sont les protéines qui ont été préférentiellement activées⁴⁰ après l'induction du stress de l'irradiation bimodale créée par le rayonnement synchrotron interagissant sur un atome lourd, présent dans l'ADN des cellules.

IV.5.4.1. Extraits cellulaires

Des extraits protéiques ont été préparés et analysés par Western Blot.

IV.5.4.1.1. Préparation des échantillons à irradier

Des flacons Falcon[®] de 75 cm² contenant approximativement 10⁷ cellules en plateau phase et préalablement exposées ou non à un traitement pharmacologique ont été grattés dans 3 ml de leur milieu complet. Des tubes en polypropylène Falcon[®] de 6 ml ont été remplis avec les suspensions cellulaires recueillies et immédiatement placés en glace. Les suspensions cellulaires ont été par la suite maintenues en agitation constante pour toute la durée du traitement, ce qui a permis en outre d'éviter l'effet de la trypsine sur les récepteurs membranaires.

⁴⁰ phosphorylées

IV.5.4.1.2. Irradiation

Les tubes en rotation continue ont été translatsés dans le faisceau jusqu'à l'obtention des doses souhaitées (pour chaque énergie, dose unique de 16 Gy). Les irradiations ont eu lieu à 4°C, selon le dispositif de refroidissement décrit précédemment (cf. Figure IV-42 p.176). Immédiatement après la fin de l'irradiation, les tubes irradiés ont été remis en glace et transportés au laboratoire de culture cellulaire.

IV.5.4.1.3. Extraits protéiques

Le contenu de chaque tube a été divisé en deux, pour permettre l'étude d'un temps de réparation à 37°C : la moitié de chaque tube irradié a ainsi été placé à l'incubateur pendant 4 heures. En effet, les kinases ont besoin de cette température pour être activées. Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées (1500 tours/min pendant 5 minutes), rincées dans du PBS froid et à nouveau centrifugées. Les culots secs ont été placés à -70° . Les extraits nucléaires ont été obtenus selon un protocole standard déjà décrit. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans une solution tamponnée hypotonique (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) additionnée d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Calbiochem®, Darmstadt, Allemagne) pendant 10 minutes à 4°C. Les noyaux ainsi isolés ont été récupérés par centrifugation (4000 tours/min pendant 10 min, 4°C) et suspendus dans un tampon hypertonique (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10% de glycerol) additionné d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été prélevé après centrifugation (10 000 tours/min pendant 5 minutes, 4°C) et les aliquotes remplacés à -70°C. La concentration de protéines présentes a été estimée par la méthode de Biorad Bradford (Biorad, Hercules, CA, USA).

IV.5.4.1.4. Immunoprécipitations et immunoblots (Western Blot)

L'immunoprécipitation a été réalisée à partir de 300 µg d'extraits nucléaires, 0.5 à 1 µg d'un anticorps monoclonal spécifique et 18 µl de billes protéine A-Sepharose (Pharmacia, Buckinghamshire, UK), mélangés à du tampon NET-N (50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0.5 % Nonidet NP40) additionné d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases [Fora02]. Après 4 heures à 4°C, les immunoprécipités centrifugés ont été rincés dans du tampon NET-N. Les immuno-complexes ont été conservés à -80°C dans du tampon de charge avant leur analyse par immunoblot (voir ci-dessous). Les immunoglobulines de lapin et de

souris (DAKO, Glostrup, Danemark) ont été utilisées en tant que contrôles négatifs pour les anticorps. et récupérés dans du tampon avant séparation.

Pour l'immunoblot, 100 µg d'extraits nucléaires conservés à -80°C, ont été bouillis dans du tampon de charge, chargés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, puis dissociés par migration. Le transfert des protéines sur membrane en nitrocellulose (Schleicher and Schuell, Dassel, Allemagne) a été effectué après 2 heures dans un système de transfert semi-sec (BioRad, Hercules, CA, USA) suivi d'une incubation dans une solution TBS-T (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% Tween 20) complétée par du lait à 5 %. Les anticorps primaires ont été mis en présence pendant 6 heures dans une solution TBS-T à 2%. Les anticorps anti-*BRCAl*, anti-*c-ABL* et anti-*RAD51* ont été obtenus auprès de Oncogene Research (Darmstadt, Allemagne). Les anticorps anti-*p-Tyr* provenaient quant à eux de Santa-Cruz Technologies (Santa-Cruz, CA, USA). Après rinçage d'une heure dans du TBS-T, les anticorps secondaires anti-lapin et anti-rat ont été appliqués dans une solution de TBS-T à 2% de lait pendant 40 minutes. Après rinçage dans du TBS-T sans lait, les protéines ont été révélées par chimioluminescence, en utilisant un kit ECL (Amersham, Burckingshire, Grande Bretagne).

IV.5.4.1.5. *Activité DNA-PK*

Le test d'activité des protéines kinases DNA-PKcs est basé sur la propriété de la kinase DNA-PK de phosphoryler certains peptides contenant la séquence consensus SQE en une réaction ATP-dépendante. La quantification de cette activité est rendue possible par l'utilisation d'ATP radiomarké au ³²P. La protéine DNA-PKcs a été immunoprécipitée à partir de 300 µg d'extraits nucléaires obtenues pour chaque traitement, en suivant le protocole ci-dessus puis incubée à 30°C pendant 30 min en présence de 400 µM de substrat peptidique synthétique équivalent à la sérine 15 de p53 (EPPLSQEAFADLWKK), 100 µM d'ATP marqué au ³²P (30 Ci/mmol) dans 200 µl de tampon NET-N (40 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5 mM EGTA, 2.5% glycerol). Après centrifugation, l'activité ³²P portée par les billes sepharose A contenues dans les immunoprécipités a été quantifiée par scintillation ou directement visualisée après immunoblot en utilisant un anticorps spécifique de la phosphorylation concernée.

IV.5.4.1.6. Activité c-Abl

Le test d'activité de la tyrosine kinase c-Abl est basé sur la propriété de la kinase c-Abl de phosphoryler certains peptides contenant la séquence YxxP en une réaction ATP-dépendante. La quantification de cette activité est rendue possible par l'utilisation d'ATP radiomarké au ^{32}P . La protéine c-Abl a été immunoprécipitée à partir de 300 μg d'extraits nucléaires obtenus pour chaque traitement, en suivant le protocole ci-dessus puis incubée à 30°C pendant 30 min à 30°C en présence de 20 μM de substrat peptidique synthétique EAIYAAPFAKKK (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)), 100 μM d'ATP marqué au ^{32}P (30 Ci/mmol) dans 200 μl de tampon (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MnCl_2 , 1 mM DTT). Après centrifugation, l'activité ^{32}P portée par les billes Sepharose A a été quantifiée par comptage en scintillateur liquide.

IV.5.4.2. Microscopie avec immunofluorescence

Cette technique permet de visualiser la localisation nucléaire des protéines impliquées dans la réparation des dommages générés dans l'ADN.

IV.5.4.2.1. Préparation des échantillons

La veille de l'irradiation, 5.10^5 cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre⁴¹ disposées au fond de boîtes de Pétri standard et incubées à 37°C.

IV.5.4.2.2. Irradiation

Juste avant l'irradiation, les lamelles ont été récupérées et disposées dans une boîte plastique remplie de milieu de culture. Pour chaque énergie étudiée, la dose unique de 10 Gy a été délivrée par translation d'un socle maintenant deux boîtes en position verticale (contrôle non traité et cellules traitées). L'irradiation a été réalisée à 37°C.

IV.5.4.2.3. Immunofluorescence

A la fin de l'irradiation, les cellules ont été fixées par une solution à 3% paraformaldehyde + 2% sucrose PBS pendant 10 minutes à température ambiante puis perméabilisées dans 20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 300 mM sucrose 0.5% TritonX-100, pendant 5 minutes à 4°C. Avant l'immunomarquage les lamelles sont rincées au PBS. Deux incubations de 40 minutes chacune ont été effectuées à 37°C : la

⁴¹ de type « couvre objets » pour microscope, 1x1 cm² environ

première avec l'anticorps primaire RAD51 (Ab1, Oncogene Research) suivie d'un rinçage au PBS ; la deuxième avec l'anticorps secondaire anti-lapin portant la fluoresceine (DAKO) suivie également d'un rinçage au PBS. Pour contre-coloration, les noyaux ont été colorés par du DAPI, pendant 10 minutes à 4°C. Les lamelles ont été montées avec du Vectashield et examinées sous microscope Zeiss. Deux critères d'évaluation quantitatifs ont été employés : le nombre de cellules avec *foci* RAD51 et le nombre de *foci* RAD51 par cellule.

V. RESULTATS ET DISCUSSION : QUE PEUT APPORTER LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON A LA RADIOTHERAPIE ANTICANCEREUSE ?

V.1. FAISABILITE DE LA TOMOGRAPHIE QUANTITATIVE PAR RAYONNEMENT SYNCHROTRON

L'objectif de cette étude était de déterminer s'il était possible de quantifier précisément *in vivo* les quantités d'agents de contraste présentes dans une tumeur. Pour ce faire, la technique a tout d'abord été validée sur fantômes afin de préciser ses performances en terme de quantification de concentration en agent de contraste. Les deux types de soustractions logarithmiques (K-edge et temporelle, évoquées dans le Tableau III-1 p.79) ont été testés. Ensuite, la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron monochromatique a été mise en œuvre *in vivo*, sur un modèle de rat porteur d'une tumeur cérébrale. Après avoir vérifié que les prises de contraste observées correspondaient bien à des zones de pathologie cérébrale (corrélation à d'autres techniques d'imageries), les quantités d'agents de contraste iodés et paramagnétiques présentes dans la tumeur ont été mesurées, *in*

vivo. Le suivi de l'évolution de ces quantités au cours du temps permet d'appréhender les cinétiques de diffusion des agents de contraste à faible poids moléculaire hors du système néovasculaire tumoral, vers la zone nécrotique de la tumeur. Ce travail ouvre la perspective d'accéder à une imagerie fonctionnelle, qui se propose de caractériser quantitativement l'angiogenèse, par l'intermédiaire de paramètres tels que les modifications de volume sanguin ou de débit sanguin cérébral ou encore de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Même si cet objectif peut être considéré comme une finalité en soi, nous avons plutôt choisi d'appréhender cette technique d'imagerie comme un outil privilégié d'irradiation à visée thérapeutique. Ainsi, la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron, puissante technique de référence dans le domaine du radiodiagnostic (caractérisation non invasive des tumeurs et échantillonnage de la tumeur dans sa globalité), deviendrait un système d'imagerie en temps réel capable de délivrer *in vivo* des cartographies tumorales résolues en concentration d'agent de contraste, nécessaires à la planification dosimétrique d'une radiothérapie binaire basée sur le renforcement intra tumoral de l'effet photoélectrique par agent de contraste.

V.1.1. Évaluation des performances de la méthode sur fantômes

V.1.1.1. Contexte

La tomodensitométrie conventionnelle et l'imagerie par résonance magnétique nucléaire sont actuellement utilisées en routine pour diagnostiquer les tumeurs cérébrales. Ces outils délivrent d'importantes informations morphologiques sur les tumeurs, comme par exemple leur emplacement ou leur taille. L'utilisation d'agents de contraste a permis d'affiner les limites de démarcation entre les tissus tumoraux et les tissus néoplasique sains adjacents. Un large effort de recherche est actuellement développé pour tenter d'ajouter des informations complémentaires aux informations anatomiques, comme par exemple sur l'hémodynamique cérébrale (volume sanguin cérébral et perfusion). Cette caractérisation fonctionnelle de la tumeur est essentielle pour comprendre son processus de croissance, son agressivité et donc adapter la stratégie du traitement. Si l'IRM s'est imposée en précurseur dans le domaine, les mesures de concentrations en agent de contraste paramagnétique ne sont à ce jour pas quantitatives, du fait de la non-proportionnalité du signal de relaxation des protons de l'eau aux concentrations en agent de contraste. Si les nouvelles technologies scanners associent des systèmes de détection performants à des grandes vitesses d'acquisition, assurant une méthode d'imagerie performante, en terme de résolutions spatiale

et temporelle, les possibilités qu'elles offrent pour quantifier précisément les quantités d'agents de contraste présentes sont limitées. La taille de la source des tubes à rayons X ainsi que leur spectre en énergie empêchent cette détermination absolue : lorsque le faisceau de rayons X traverse le patient, les plus faibles énergies photoniques sont fortement absorbées ou diffusées, entraînant un durcissement du spectre en fonction de l'épaisseur traversée. Ceci limite la précision des mesures quantitatives qui pourraient être réalisées [Tera92].

Le rayonnement synchrotron, grâce à l'intensité et aux énergies de rayons X disponibles, offre à la tomodensitométrie de nouvelles possibilités, en approchant des conditions de travail théoriques. La tomodensitométrie monochromatique est ainsi rendue possible, en ne sélectionnant qu'une bande d'énergie très étroite (quelques centaines d'électron-Volts), sur la gamme d'énergies disponibles (10-100 keV). Des approches comparables ont été développées avec des générateurs de rayons X conventionnels [Lope00], mais étaient limitées par le flux de photons disponible. Le rayonnement synchrotron garantit pour sa part une fluence suffisante, même après monochromatisation. Cette dernière est en effet de l'ordre de grandeur de celle intégrée sous un spectre polychromatique.

Plusieurs travaux ont décrit les possibilités offertes en terme de soustraction d'images pour pouvoir détecter des agents de contraste comme l'iode ou le gadolinium au milieu d'un milieu inhomogène [Krug77, Mist90, Oelc96]. D'une manière générale, deux images se différenciant l'une de l'autre par une variable comme le temps ou l'énergie, soustraites pour isoler la concentration en agent de contraste du fond de l'image.

La méthode utilisant une soustraction bi-énergie avec deux énergies très différentes tire partie de la dépendance énergétique des effets photoélectriques et Compton entre 30 et 100 keV. Deux types de matériaux peuvent être différenciés par cette technique mais ses limites sont vite atteintes dès que plus de deux matériaux entrent en jeu : ainsi, le troisième élément constituant le matériau ne sera considéré que comme un mélange des deux premiers.

Ce problème est résolu par la technique de soustraction bi-énergie de type K-edge, lorsque celle-ci est possible. La variation brutale du coefficient massique d'atténuation totale autour du seuil d'absorption K d'un élément lourd est un moyen efficace d'identification certaine de cet élément. Proposée pour la première fois en 1953 par Jacobson [Jaco53], cette technique n'a été rendue possible que dans le début des années 1980, avec l'utilisation du rayonnement synchrotron en imagerie médicale. La méthode a été validée en mode radiographique ([Dix95, Elle00b, Rube86]) et tomographique ([Char96, Dilm97, Th84]). Pour l'imagerie des structures anatomiques en mouvement, comme les artères coronaires, deux images sont enregistrées simultanément à deux énergies très proches du seuil K de l'élément

d'intérêt puis soustraites. Dans l'image obtenue le contraste résultant des structures autres que celle d'intérêt a presque disparu du fait de la similitude de leurs coefficients d'atténuation à ces énergies. En pratique, pour préserver une dose raisonnable à la peau du patient, seuls les éléments dont le seuil K est situé au-delà de 30 keV sont pris en compte par cette technique. Cette dernière ne s'adresse donc qu'aux éléments lourds dont le numéro atomique est supérieur à 50 (cf. Figure III-7 p.75).

La technique de soustraction temporelle n'est adaptée que si la position de l'objet à imager est parfaitement reproductible dans le temps. Elle consiste à soustraire à une image avec agent de contraste une image de référence acquise avant son injection. L'énergie des rayons X est choisie juste au-dessus du seuil K de l'élément à imager pour garantir un maximum de contraste dans l'image finale.

La tomодensitométrie apporte une information supplémentaire par rapport à la technique radiographique, basée sur l'enregistrement du rayonnement X transmis à travers l'objet en une unique projection : l'image reconstruite est non seulement tri-dimensionnelle mais de plus chaque pixel de l'image résultante contient comme information physique le coefficient linéique d'atténuation totale de l'objet en ce point. L'apport du rayonnement monochromatique à la tomographie n'est donc pas uniquement basé sur les techniques de soustractions d'images offertes. Ce dernier va de plus permettre de convertir l'information contenue dans chaque pixel de l'image en concentration absolue d'agent de contraste présent.

Le but de notre étude est de déterminer les limites de détection, la précision et l'exactitude des mesures obtenues par cette méthode, selon le mode de soustraction employé. Les agents de contraste paramagnétiques, tel le gadolinium ($Z=64$), ont été étudiés pour leurs propriétés d'atténuation aux rayons X (cf. § III.1.5 p.82), ceci afin d'offrir une éventuelle alternative aux agents iodés.

V.1.1.2. Rappel des conditions expérimentales

Les performances de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron monochromatique ont été évaluées sur fantômes. Le principe général de la méthode a été décrit dans le paragraphe § IV.3.1.1 p.127. La détermination de diverses concentrations (entre 50 et 5000 $\mu\text{g/ml}$) d'agent de contraste iodé (Hexabrix[®]) ou paramagnétique à base de gadolinium (Dotarem[®]) contenues dans des tubes de différents diamètres a été réalisée pour des fantômes en lucite de différents volumes (cf. § IV.3.1.2.1 p.129) selon deux techniques de soustraction différentes : irradiation simultanée de l'objet à imager avec deux faisceaux de rayons X monochromatiques d'énergies situées juste au-dessus et juste en dessous du seuil

d'absorption K de l'élément lourd à doser (33.169 keV pour l'iode et 50.239 keV pour le gadolinium, avec une résolution spectrale de 25 et 58 eV respectivement), ou bien irradiation avec une seule énergie de rayonnement (celle située juste en dessus du seuil K) mais à deux instants différents, avant et après l'introduction de l'agent de contraste. Pour les expériences dont les résultats sont présentés ci-dessous, l'intensité maximale disponible était de 200 mA, avec une durée de vie de 50 heures. Le gap du wiggler magnétique était ouvert à 60 mm et les filtres en place devant le monochromateur étaient une combinaison de carbone (1.5 mm), d'aluminium (3 mm) et de béryllium (1.5 mm). La vitesse de rotation des fantômes était de 180°/s et 900 projections/tour ont été enregistrées pour la reconstruction d'une coupe transverse. La hauteur des faisceaux était de 800 µm chacun. Pour le plus gros fantôme (17.5 cm de diamètre au total), ses dimensions ont nécessité de décaler le centre de l'objet à imager de l'axe de rotation du système d'imagerie (le faisceau ne faisant que 15 cm de large au maximum, il était entièrement intercepté par l'objet et la normalisation par rapport au flux incident non atténué était impossible). En décalant le centre de l'objet de quelques centimètres par rapport au centre de rotation, le faisceau ne couvre qu'un peu plus de la moitié de l'objet et les acquisitions sont réalisées sur 180° (720 projections).

V.1.1.3. Résultats

V.1.1.3.1. Petit fantôme

Un fantôme de lucite de 10 cm de diamètre a été imagé avec des doses à la surface de 5 cGy par image reconstruite, pour les deux techniques de soustraction testées. La description et la composition des fantômes a été décrite sur la Figure IV-22 p.130. A titre d'illustration, des cartographies résolues en concentration d'agent de contraste obtenues après soustraction de type K-edge (autour de 33 keV pour l'iode et 50 keV pour le gadolinium) sont présentées sur la figure suivante.

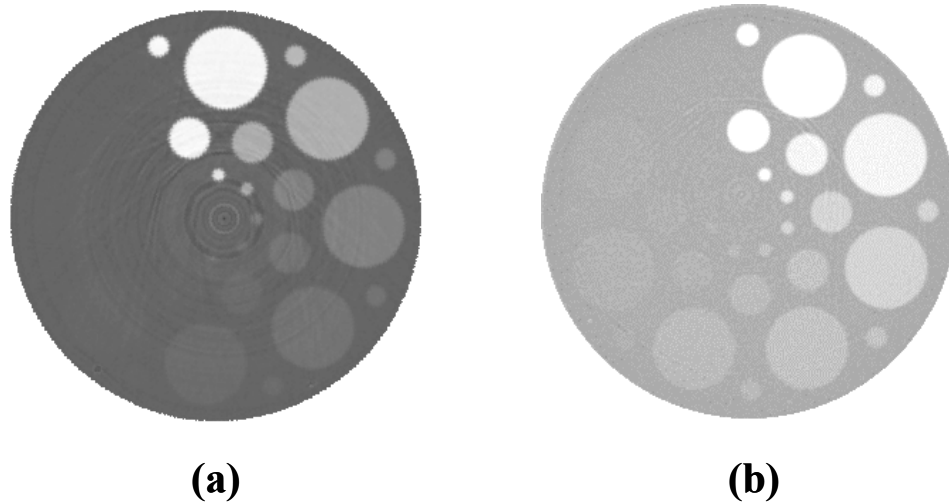


Figure V-1 : Images résolues en concentration (a) d'iode et (b) de gadolinium d'un fantôme de lucite de 10 cm de diamètre. La méthode de soustraction employée est la technique de K-edge et la dose totale reçue à la surface du fantôme est de 5 cGy.

L'analyse est effectuée sur des régions d'intérêt (ROI) de 3 mm de diamètre tracées dans les différents tubes. L'écart type des mesures (appelé sigma) fournit une indication sur l'erreur entachant nos mesures. L'exactitude des mesures (ou l'erreur relative) a quant à elle été estimée par l'écart en pourcentage entre la concentration mesurée et sa valeur nominale.

Pour les deux méthodes de soustraction, l'exactitude des mesures a été reportée pour l'iode et le gadolinium sur la figure ci-après en fonction des valeurs nominales de concentrations (Figure V-2). Les résultats obtenus pour les deux agents de contraste sont comparables. L'erreur relative des mesures est inférieure à 10 % dès que la concentration à quantifier est supérieure à 100 µg/ml.

De manière surprenante, l'exactitude des mesures ne s'améliore pas régulièrement lorsque la concentration en agent de contraste augmente : un maximum est observé pour une concentration de 2.5 mg/ml. En dessous de ce seuil, le bruit photonique domine le bruit de l'image. Au-dessus, les fortes concentrations induisent probablement un renforcement de la proportion d'harmoniques présentes dans le faisceau monochromatique. De plus la forte atténuation du rayonnement X incident provoque des artéfacts de reconstruction. En effet les hautes fréquences spatiales induites dans l'image en cas de fortes atténuations sont à l'origine d'artéfacts de reconstruction.

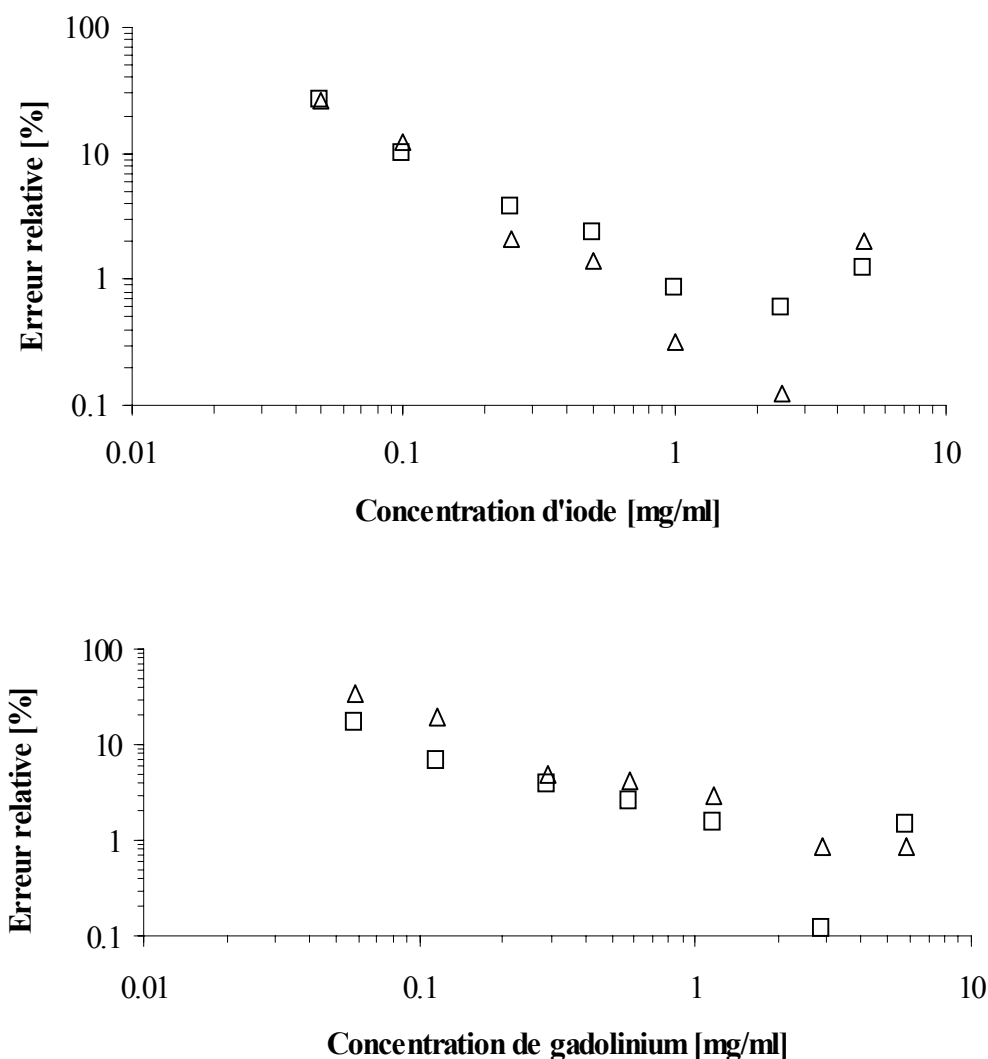


Figure V-2 : Comparaison de l'exactitude des concentrations d'agent de contraste mesurées pour une dose surface de 5 cGy dans le fantôme de lucite de 10 cm de diamètre pour l'iode (sup.) et pour le gadolinium (inf.), avec les techniques de soustraction K-edge (Δ) et temporelle ($\square$).

Pour cette géométrie de fantôme, les écarts-types des valeurs mesurées dans un même tube sont reportés dans la figure suivante, pour l'iode et le gadolinium (Figure V-3). Le bruit est très proche pour les deux techniques de soustraction considérées, de l'ordre de 20 $\mu\text{g/ml}$ de l'atome dosé. En effet, il dépend essentiellement du bruit photonique, déterminé par la dose de rayons X.

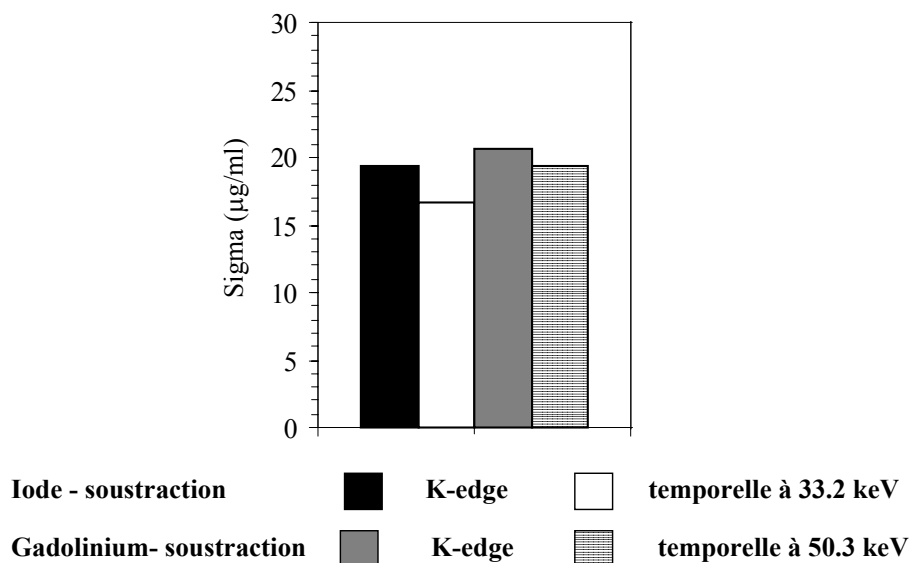


Figure V-3 : Mesures du bruit associé à la mesure des concentrations d'iode et de gadolinium à partir d'images du fantôme en lucite de 10 cm de diamètre soustraites selon la méthode K-edge et temporelle. La dose à la surface des fantômes est de 5 cGy et le diamètre de la région d'intérêt de 3 mm

V.1.1.3.2. Fantôme tête

La figure ci-dessous illustre les cartographies d'iode et de gadolinium obtenues après soustraction de type K-edge ou temporelle des images du fantôme tête.

En ce qui concerne l'iode, la soustraction temporelle à 50 keV a permis d'améliorer la qualité d'image et la sensibilité de la méthode par rapport à la méthode K-edge.

Les concentrations minimales détectables selon les techniques de soustraction sont reportées dans le tableau suivant pour l'iode et la gadolinium.

Tableau V-1 : Concentrations minimales détectables avec un RSB de 3 mesurées sur dans le fantôme tête pour une dose surface de 60 cGy et une hauteur de faisceau de 1 mm. Comparaison des techniques de soustractions K-edge et temporelle. La taille du détail considéré ici est de 3 mm

Élément	Iode	Gadolinium
Méthode K-edge	185 µg/ml	81 µg/ml
Méthode temporelle	90 µg/ml à 50 keV	58 µg/ml à 50.3 keV

Ces résultats montrent l'avantage de la méthode de soustraction temporelle, notamment pour les mesures de concentrations absolues d'iode : la concentration minimale détectable avec un rapport signal sur bruit de 3 et pour des doses en surface similaire est deux fois plus faible lorsque la méthode de soustraction temporelle a été employée.

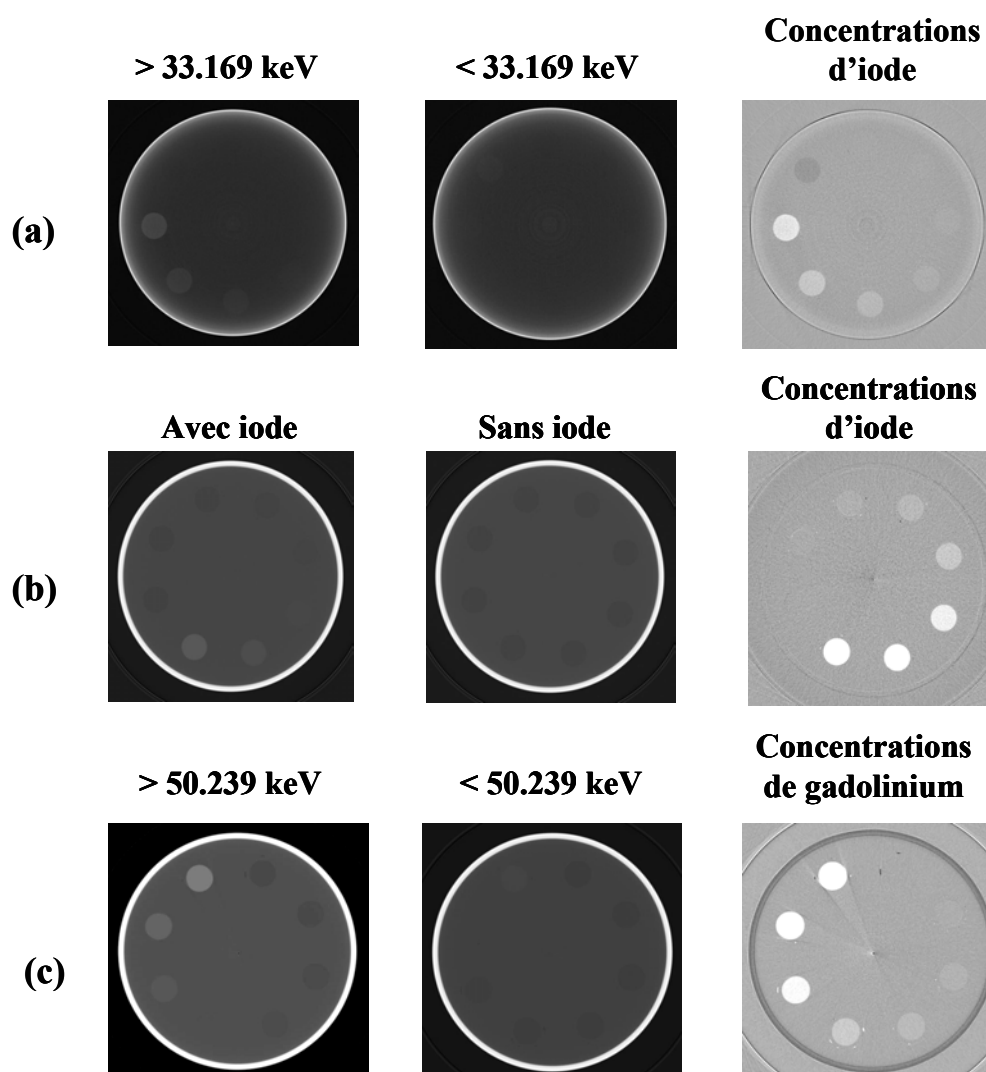


Figure V-4 : Images du fantôme tête (16.5 cm de diamètre + couronne en aluminium de 0.5 mm d'épaisseur) réalisées pour une dose surface de 60 cGy. (a) Méthode de soustraction K-edge, au-dessus et en dessous sur seuil K de l'iode (b) Méthode de soustraction temporelle à 50 keV pour quantifier l'iode (c) Méthode de soustraction K-edge au-dessus et en dessous du seuil K du gadolinium. Les concentrations d'agents de contraste étaient de 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 et 0.1 mg/ml

D'autre part, les erreurs relatives de concentrations mesurées par rapport à la valeur nominale montrent que la soustraction temporelle à 50 keV est plus exacte que celle réalisée à 33 keV ou que la méthode K-edge (Figure V-5). Des énergies d'irradiation plus élevées sont donc mieux adaptées à cette géométrie d'irradiation. Pour le dosage du gadolinium, les deux techniques de soustraction sont sensiblement équivalentes.

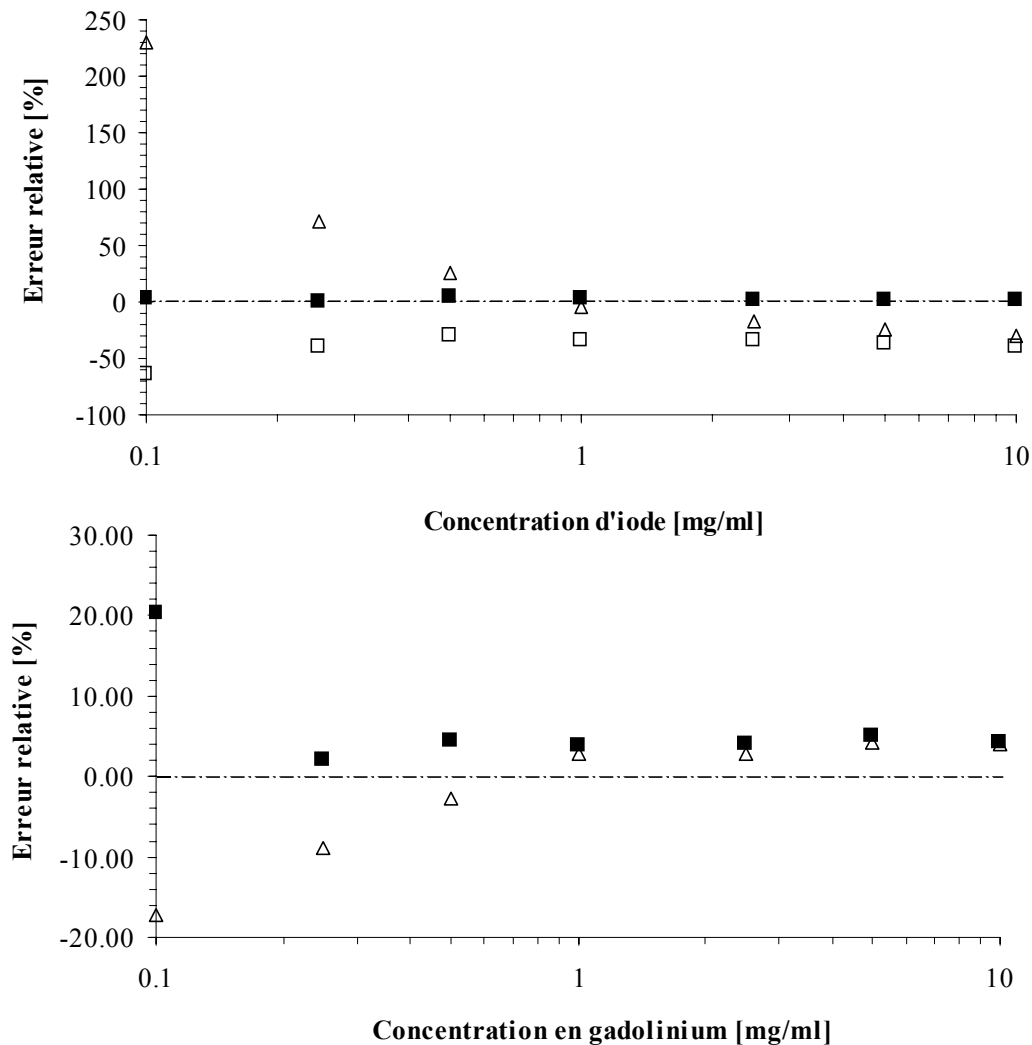


Figure V-5 : Comparaison de l'exactitude des mesures de concentrations d'agent de contraste dans le fantôme tête de lucite de 17.5 cm de diamètre pour l'iode (sup.) et pour le gadolinium (inf.), avec les techniques de soustraction K-edge (Δ) et temporelle à 33 keV ($\square$) et à 50 keV ($\blacksquare$). La hauteur du faisceau était de 1 mm et la dose en surface de 60 cGy.

Il est intéressant de noter ici qu'une exactitude et une sensibilité de détection similaires auraient pu être atteintes en augmentant l'épaisseur de la coupe tomographique et en diminuant du même rapport la dose surface nécessaire pour obtenir une qualité d'image suffisante (par exemple, 3 mm de hauteur de faisceau et dose surface de 20 cGy est équivalent à 1 mm avec une dose surface de 60 cGy).

La méthode de soustraction temporelle permet, pour cette géométrie de fantôme, d'augmenter la précision des mesures des concentrations des deux agents de contraste (Figure V-6). Ce gain est très important pour le dosage de l'iode, où la soustraction temporelle à 50 keV permet de gagner un facteur 2 sur la précision. Ces résultats sont en accord avec nos estimations théoriques (cf. Figure III-10 p.80).

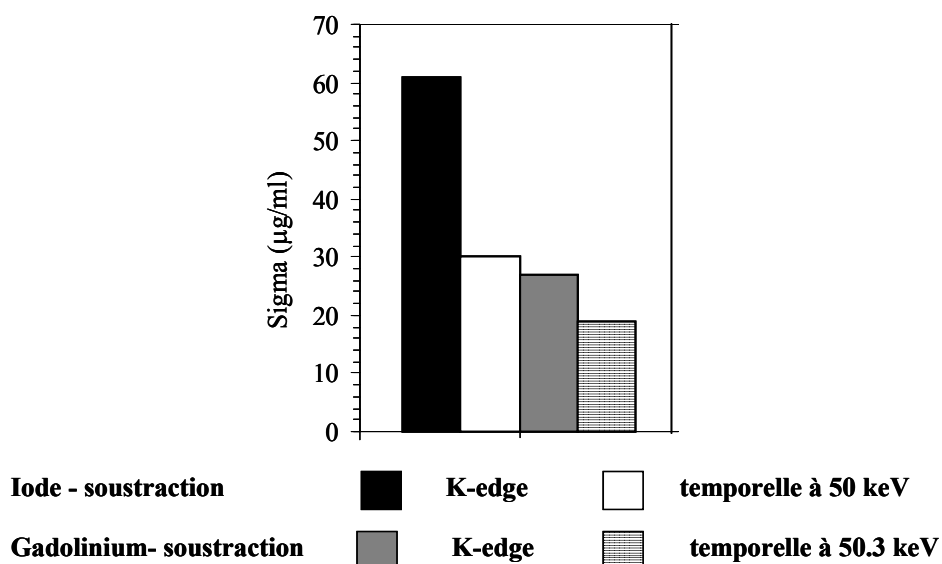


Figure V-6 : Mesures du bruit associé à la mesure des concentrations d'iode et de gadolinium à partir d'images du fantôme tête (16.5 cm de diamètre + couronne en aluminium de 0.5 mm d'épaisseur) soustraites selon les méthodes K-edge et temporelle. La dose à la surface du fantôme est de 60 cGy, la hauteur du faisceau de 1 mm et le diamètre de la région d'intérêt de 3 mm

V.1.1.4. Implications pour la quantification *in vivo* des concentrations d'agents de contrastes présentes dans les tumeurs cérébrales

Les mesures de volume et de débit sanguins cérébraux (VSC et DSC respectivement) semblent devenir un élément essentiel de la caractérisation des pathologies cérébrales tumorales. En tomodensitométrie, ces paramètres sont calculés à partir des méthodes de cinétiques des traceurs [Ceni00], en injectant un bolus d'agent de contraste dans la circulation veineuse périphérique. Toutefois les quantités obtenues demeurent relatives, car évaluées en comparaison d'une zone supposée saine du cerveau.

La tomographie quantitative telle qu'elle a été développée sur la ligne médicale de l'ESRF propose de doser précisément les quantités d'agent de contraste présentes dans le système vasculaire. Lorsqu'un bolus d'agent de contraste est injecté dans le système veineux, un pic de concentration d'agent de contraste est observé dans les artères cérébrales, les tissus sains et les tissus tumoraux lors du premier passage de ce bolus. La concentration d'agent de contraste mesurée dans les tissus est alors directement proportionnelle à la quantité de sang présente dans une unité de volume élémentaire tissulaire. Si la quantité de sang présente dans le cerveau sain est d'environ 4 %, les lésions de la barrière hémato-encéphalique et l'angiogenèse caractéristiques de l'évolution tumorale entraînent une élévation du volume sanguin cérébral.

Le gadolinium est principalement utilisé en IRM pour ses propriétés paramagnétiques. Néanmoins, il est composé d'un atome lourd ($Z=64$), de numéro atomique plus élevé que l'iode ($Z = 53$). Son seuil d'absorption K, également plus élevé que celui de l'iode (50 contre 33 keV) le rend donc attractif comme agent de contraste en rayons X. Un rehaussement vasculaire et tissulaire a déjà été montré en utilisant ce composé paramagnétique en tomodensitométrie conventionnelle [Gier99, Quin94] et ce dernier a été proposé en angiographie en alternative aux composés iodés [Kinn93, Spin02], même si sa toxicité dans de telles conditions d'utilisation n'a pas été vraiment étudiée [Nyma02]. En effet les concentrations molaires de ces agents sont loin d'être égales (cf. IV.2.1 p.116) et les composés à base de gadolinium, tels qu'ils sont actuellement utilisés en IRM possèdent une concentration molaire 5 fois moins importante que les agents de contraste iodés (0.5 M contre 2.75 M respectivement). Ces faibles concentrations associées aux faibles volumes d'injection conseillés (0.1 à 0.3 mmol/kg du patient) conduisent à de très faibles concentrations de gadolinium présentes dans la circulation sanguine. Le gadobutrol (Gadovist[®], Schering, Berlin) est un nouveau chélate véhiculant des concentrations de gadolinium deux fois plus élevées (1 M) qui pourrait être intéressant dans cette alternative. Déjà proposé comme agent de contraste en IRM [Vogl95], il s'est avéré non nocif pour des injections s'échelonnant entre 0.04 et 0.5 mmol/kg sur des patients sains et entre 0.1 et 0.3 mmol/kg sur des patients souffrant de dysfonctionnement rénaux [Tomb01].

Dans le tableau suivant, nous présentons les concentrations attendues dans le sang et les tissus sains après injection d'agents de contraste iodés et paramagnétiques à base de gadolinium, chez le rat et l'homme (Tableau V-2).

Tableau V-2 : Concentrations d'iode et de gadolinium attendues dans la circulation sanguine et les tissus sains cérébraux dans des modèles de recherche (rat) et en clinique (homme)

Élément	Iode		Gadolinium			
Nom	Iomeron [®]		Dotarem [®] /Magnevist [®]		Gadovist [®]	
Concentration (mmol/ml)	2.76		0.5		1	
Concentration (mg/ml)	350		78.5		157	
Modèle d'étude poids moyen (kg)	Rat 0.2	Homme 80	Rat 0.2	Homme 80	Rat 0.2	Homme 80
Quantités injectées (mmol/kg)	11	1.4	2.5	0.1	1.25	0.5
Volume injecté (ml)	0.8	40	1	16	0.5	40
Concentration artérielle (mg/cm ³)	25	20	7	2.2	7	9
Concentration dans le cerveau sain (mg/cm ³)	1	0.8	0.28	0.09	0.28	0.36

Avec la méthode de soustraction temporelle à 50 keV il serait possible de mesurer avec une précision suffisante chez l'homme les concentrations d'iode attendues dans le cerveau sain avec des doses à la peau plus faible que si la technique K-edge était employée. A doses à la peau équivalentes, les rapports signal sur bruit seraient, compte tenu des bruits mesurés (cf. Figure V-6 p.193), de 13 et 25 respectivement pour les soustractions K-edge et temporelle à 50 keV. Les concentrations attendues dans le cerveau sain après injection de gadolinium standard sont trop proches du seuil de détectabilité de la méthode pour que l'on puisse les détecter proprement (Tableau V-1 p.190). Par contre, le gadobutrol injecté aux doses maximales conduirait à des RSB de 13 et de 18 pour les techniques K-edge et temporelle respectivement pour une dose surface de 60 cGy et une hauteur de faisceau de 1 mm (équivalent à une dose de 20 cGy pour une hauteur de 3 mm).

V.1.1.5. Conclusion

La méthode de soustraction temporelle, qui ne peut être mise en œuvre que pour imager des structures temporelles parfaitement immobiles, est très intéressante dans la mesure où elle offre la possibilité d'utiliser des énergies différentes de celle située juste au-dessus du K-edge. Ceci peut être intéressant pour doser, dans de gros volumes, des éléments lourds

comme l'iode dont l'énergie du seuil K est trop faible (33 keV) pour faire des images de qualité suffisante sans trop irradier la peau des patients.

Le choix de l'élément lourd à doser par tomographie quantitative par rayonnement synchrotron est bien entendu l'élément essentiel de cette étude de faisabilité sur fantômes. Puisque tous les éléments de la classification périodique ne peuvent pas être utilisés comme agents de contraste à usage médical, nous nous sommes intéressés aux éléments lourds classiquement utilisés en clinique, l'iode et le gadolinium. Si les deux techniques conduisent à des performances sensiblement équivalentes pour des objets de 10 cm de diamètre, la technique de soustraction K-edge est moins précise et moins exacte que la méthode temporelle à 50 keV pour doser des éléments lourds comme l'iode, dans des volumes importants. L'utilisation du gadolinium conduit, pour des conditions d'acquisition similaires, à diminuer les limites de détectabilité, quelque soit la technique de soustraction utilisée. L'arrivée sur le marché d'agents de contraste à concentration de gadolinium plus élevée devrait permettre d'envisager une application *in vivo*, pour l'instant impossible du fait de la limitation des quantités injectables en clinique.

V.1.1.6. Synthèse des résultats

Les deux méthodes de soustraction, temporelle et bi-énergie de part et d'autre du seuil d'absorption K de l'élément lourd à doser, possèdent des performances sensiblement équivalentes pour imager des fantômes de diamètre inférieur à 10 cm. Pour des diamètres plus importants, comme par exemple pour les dimensions d'une tête d'adulte, la soustraction temporelle est plus appropriée pour doser des éléments lourds tels que l'iode, tout en conservant des doses à la peau raisonnablement basses.

Cette méthode sera préférentiellement utilisée lorsque l'immobilité de l'objet sera garantie car sinon le mauvais repositionnement des coupes axiales avant et après l'injection entraînerait la génération d'artéfacts qui fausseraient les valeurs mesurées des concentrations en agent de contraste. En revanche, pour les mêmes raisons techniques, la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron d'organes habituellement en mouvement nécessitera l'utilisation de la méthode de soustraction dite 'K-edge' puisque celle-ci permet l'acquisition *simultanée* de deux images réalisées avec des rayons X d'énergies différentes. Quoique moins pratique techniquement à mettre en oeuvre, cette dernière méthode garantira néanmoins l'exact recouvrement des sinogrammes, préliminaire à une bonne soustraction géométrique des images obtenues.

V.1.2. Cartographies quantitatives de distribution d'agent de contraste *in vivo* chez le rat porteur de tumeur

La validation de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron a été réalisée un modèle animal porteur d'une tumeur cérébrale, pour prouver qu'il était possible de cartographier *in vivo* les concentrations d'iode ou de gadolinium présentes dans les tissus cérébraux, normaux et surtout pathologiques. Les images présentées ci-après correspondent aux toutes premières obtenues et possèdent une qualité assez moyenne⁴². Par la suite, la qualité a été améliorée et les résultats obtenus ont fait l'objet d'autres investigations, plus fonctionnelles. Néanmoins les résultats de cette étude de faisabilité sur rats vivants nous semblaient intéressants puisqu'ils nous ont permis de mesurer les quantités d'agents de contraste présentes dans les tumeurs des rats, et celles-ci ont été étudiées pendant les deux heures suivant l'injection. Ces données, extrapolées à l'homme, ont servi de base à l'idée que la SRCT pouvait raisonnablement devenir l'outil d'irradiation binaire, basée sur le renforcement spécifique de l'effet photoélectrique dans les tumeurs imprégnées d'agent de contraste.

V.1.2.1. Obtention d'images tomodensitométriques résolues en concentration d'agents de contraste iodés et paramagnétiques

Des coupes axiales de rats vivants porteurs de tumeurs cérébrales à un stade d'évolution avancé ont été réalisées, après injection intraveineuse de produits de contraste, tels que l'iode et le gadolinium (irradiation à 33 keV et 50 keV respectivement, avec un mode de soustraction d'images de type K-edge). Une augmentation du contraste au niveau de la tumeur a été mise en évidence dans les deux cas de figure précédents (Figure V-7).

Sur ces images soustraites, les vaisseaux et les muscles sous-cutanés apparaissent hyper intenses du fait de la présence des agents de contraste en grande quantité dans le système vasculaire. Le cerveau apparaît contrasté uniquement dans une zone bien délimitée, supposée être la zone tumorale. Cette zone est visiblement hétérogène, avec une zone périphérique hyper intense et une région centrale présentant un rehaussement de contraste plus faible. Des artéfacts sont présents dans les images obtenues, essentiellement dus à une mauvaise soustraction des structures osseuses.

⁴² artéfacts en étoile induits par les os, anneaux circulaires provoqués par la présence de mauvais canaux au niveau du détecteur...

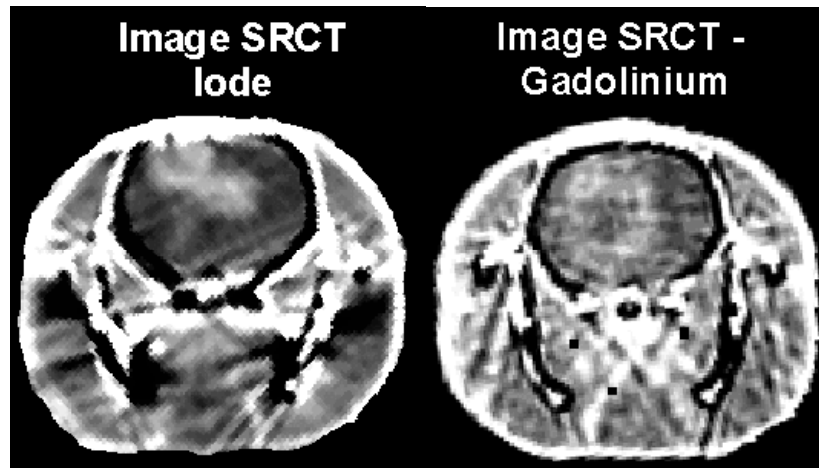


Figure V-7 : Images transverses de rat porteur de tumeur cérébrale, acquise 10 minutes après injection d'un agent de contraste par tomographie par rayonnement synchrotron, par soustraction d'images prises au-dessus et en dessous du seuil d'absorption K de l'iode ou du gadolinium (dose X : 5 cGy/coupe).

Des comparaisons avec d'autres techniques (IRM pré-SRCT et histologie post-SRCT) ont montré une bonne corrélation entre la présence et la morphologie de la tumeur et la prise de contraste observée (Figure V-8). L'exemple donné sur cette figure illustre une tumeur en forme de croissant, facilement reconnaissable sur les 3 types d'images.

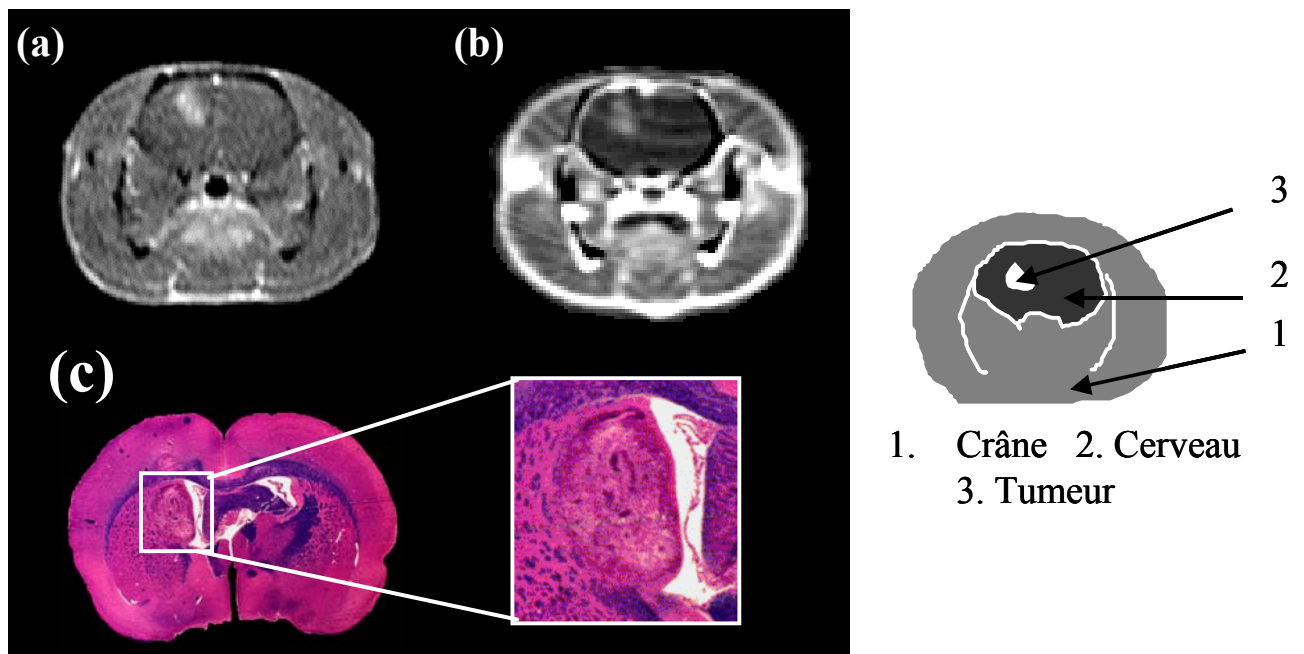


Figure V-8 : Corrélation de la SRCT à d'autres techniques d'imagerie. Des coupes transverses de cerveau de rat porteur de gliome C6 ont été réalisées (a) par IRM (séquence Spin Echo pondérée en T1, TR=500ms et TE=20ms) après injection intraveineuse de gadolinium ; (b) par SRCT en méthode de soustraction K-edge, après injection d'iode et (c) par histologie, avec une coloration HES

Afin de pouvoir mener ultérieurement des études statistiques, des séries d'au moins 5 rats ont été imagées après injection d'Hexabrix[®] (0.4 ml/100g), de Magnevist[®] (0.5 ml/100g) et de Gadovist[®] (0.25 ml/100g). Les doses de rayons X reçues par les rats sont de l'ordre de grandeur de celles susceptibles d'être reçues avec un scanner conventionnel (5 cGy/coupe).

Les résultats quantitatifs obtenus en moyenne pour chaque série de rats sont reportés dans le tableau ci-après (Tableau V-3). Plusieurs régions d'intérêt ont été sélectionnées dans les zones tumorales et saines du cerveau, ainsi que dans un fantôme témoin et dans l'arrière plan de l'image. Les plus fortes concentrations d'agent de contraste ont été mesurées dans la zone périphérique de la tumeur, correspondant à une zone hyper vascularisée, caractéristique des glioblastomes. Dans cette zone, 800 µg d'iode / cm³ de tissu cérébral ont été mesurés 10 minutes après l'injection intraveineuse de 4 ml/kg d'Hexabrix[®]. Dans cette même zone 500 et 600 µg de gadolinium / cm³ de tissu cérébral ont été détectés après injection de Magnevist[®] et de Gadovist[®]. Les valeurs trouvées au centre de la tumeur sont plus faibles, 600, 200 et 400 µg/cm³, respectivement pour l'iode et le gadolinium. Dans la zone supposée saine du cerveau controlatéral, les concentrations d'agent de contraste mesurées sont proches de celles correspondant au bruit de fond de l'image. Les muscles de la joue affichent quant à eux les concentrations mesurées maximales, avec 1.8 mg / cm³ d'iode après injection d'agent de contraste iodé, contre 1 ou 1.2 mg/cm³ de gadolinium selon la molarité de l'agent étudié (hémi-molaire et molaire, respectivement). La présence de petits fantômes témoins dans l'image à analyser a permis de contrôler que les concentrations mesurées étaient exactes.

Ces résultats étaient les premiers obtenus en imagerie tomographique et la faible qualité des images obtenues peut s'expliquer par divers facteurs tels que : la mauvaise correction de la réponse des quelques mauvais pixels du détecteur cf. Figure IV-17 p.116, la détermination imprécise de la position du centre de rotation au niveau des pixels du détecteur, les artéfacts en étoile dus aux os de la mâchoire du rat, le mauvais croisement des faisceaux au niveau du rat. Ces facteurs, responsables de la dégradation de la qualité d'image, affectent le seuil de détectabilité de la méthode (les valeurs des bruits de fond reportées ici sont supérieures aux limites de détection estimées sur fantômes, cf. Tableau V-1 p.190).

Tableau V-3 : Concentrations moyennes d'iode et de gadolinium mesurées in vivo dans différentes régions du cerveau de rats porteurs de tumeurs cérébrales, 10 minutes après une injection manuelle.

La dose reçue par les rats était de 5 cGy/paire d'images et la hauteur du faisceau de 800 μm (soustraction K-edge). L'iode, le gadolinium et le gadobutrol ont été injectés aux doses respectives de 4 ml/kg (1.3 g d'iode/kg, soit 4 fois la dose clinique), 5 ml/kg (0.4 g de gadolinium/kg soit 25 fois la dose clinique) et 2.5 ml/kg (0.4 g de gadolinium/kg soit 25 fois la dose clinique). Les résultats présentés correspondent à la moyenne des concentrations mesurées sur la série de rats (σ : écart-type)

Localisation de la région d'intérêt (taille en pixels)	Hexabrix® (n=5 rats)	Magnevist® (n=5 rats)	Gadovist® (n=6 rats)
Périphérie de la tumeur (13)	0.8 mg I /cm ³ (σ = 0.4)	0.5 mg Gd /cm ³ (σ = 0.1)	0.6 mg Gd /cm ³ (σ = 0.1)
Centre de la tumeur (2)	0.6 mg I /cm ³ (σ = 0.4)	0.2 mg Gd /cm ³ (σ = 0.2)	0.4 mg Gd /cm ³ (σ = 0.2)
Controlatéral (noyaux caudés) (27)	0.3 mg I /cm ³ (σ = 0.1)	0.1 mg Gd /cm ³ (σ = 0.06)	0.13 mg Gd /cm ³ (σ = 0.09)
Muscles de la joue (13)	1.8 mg I /cm ³ (σ = 0.5)	1 mg Gd /cm ³ (σ = 0.3)	1.2 mg Gd /cm ³ (σ = 0.6)
Fantôme de référence (79)	2.1 mg I /cm ³ (σ = 0.2)	0.99 mg Gd /cm ³ (σ = 0.04)	2.5 mg Gd /cm ³ (σ = 0.2)
Bruit de fond (2829)	0.2 mg I /cm ³ (σ = 0.02)	0.1 mg Gd /cm ³ (σ = 0.01)	0.08 mg Gd /cm ³ (σ = 0.03)

Pour des régions identiques du cerveau, les différences de concentration d'iode et de gadolinium mesurées s'expliquent par les différences de molarité des agents de contraste iodés et paramagnétiques. L'Hexabrix® étant 3.3 fois plus concentré que le Magnevist® (3.3 g d'iode/kg contre 0.4 g de gadolinium/kg), le contraste associé est meilleur en utilisant de l'iode. Par contre l'emploi du Gadovist® a seulement permis de diminuer les volumes injectés, mais les concentrations demeurent, quant à elles, semblables à celles employée avec le Magnevist®. Les propriétés pharmacocinétiques de ces deux agents affichent donc une certaine ressemblance.

La proximité des valeurs des concentrations en agent de contraste mesurée au niveau de la zone controlatérale du cerveau avec celle du bruit de fond peut s'expliquer par le fait que le volume sanguin dans le cerveau sain n'excède pas 5% et que 5 minutes suffisent après l'injection pour diminuer de 70% les concentrations d'iode ou de gadolinium présentent dans le système plasmatique [Alla88, Wei84].

La couronne tumorale périphérique correspond bien à la zone hyper vascularisée visible sur les coupes histologiques. Ces dernières montrent également que très peu de vaisseaux sont présents dans la zone centrale, nécrotique, de la tumeur. Le rapport des concentrations d'iode et de gadolinium mesurées entre la périphérie et le centre de la tumeur est de 1.33 pour l'iode et de 2.5 et 1.5 pour le gadolinium (hémi-molaire et molaire

respectivement). D'autres études réalisées par mesure du volume sanguin cérébral en équilibre par IRM sur le même modèle de gliome C6 ont donné un rapport de 1.26, qui correspond bien au même ordre de grandeur [LeDu99]. La légère supériorité de nos valeurs pourraient s'expliquer par la caractère tardif de nos mesures, qui, 10 minutes après l'injection, font intervenir une composante de rupture de la BHE conduisant à l'augmentation de la concentrations d'agent de contraste dans le liquide interstitiel. Cette rupture de la BHE est d'ailleurs à l'origine du contraste observé en IRM (Figure V-8).

Cette étude nous permet de conclure sur la faisabilité de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron monochromatique. Les images SRCT obtenues possèdent une résolution spatiale de 350 μm . Elles permettent d'obtenir les cartographies des concentrations d'iode et de gadolinium intracérébral, *in vivo*, sur un modèle de rat porteur de gliome. Les prises de contraste observées correspondent bien anatomiquement à la zone tumorale, telle qu'elle a pu être définies par des techniques de références (IRM, histologie).

V.1.2.2. Cinétiques de diffusion des agents de contraste hors du réseau de néovascularisation tumorale : comparaison du Magnevist[®] et du Gadovist[®]

L'échantillonnage spatial des tumeurs cérébrales de rats a été réalisé par acquisition successives d'une dizaine de coupes transverses de 800 μm d'épaisseur jointives. L'évolution dans le temps de la répartition d'agents de contraste au sein de la tumeur a été suivie pendant 3 heures au total, avec des acquisitions toutes les 10 minutes au cours de la première heures.

Les images présentées ci-dessous correspondent aux distributions spatiales de gadolinium (10 minutes après injection) et temporelles (coupe de référence démarquée par un carré rouge sur la distribution spatiale, choisie pour les caractéristiques morphologiques de la tumeur) enregistrées par SRCT en mode de soustraction K-edge après injection intraveineuse de Magnevist[®] (0.5 ml/100 g) ou de Gadovist[®] (0.25 ml/100 g). Les coupes histologiques du cerveau prélevé après la séquence d'imagerie et colorées au HES sont également présentées, pour comparaison de l'architecture générale de la tumeur.

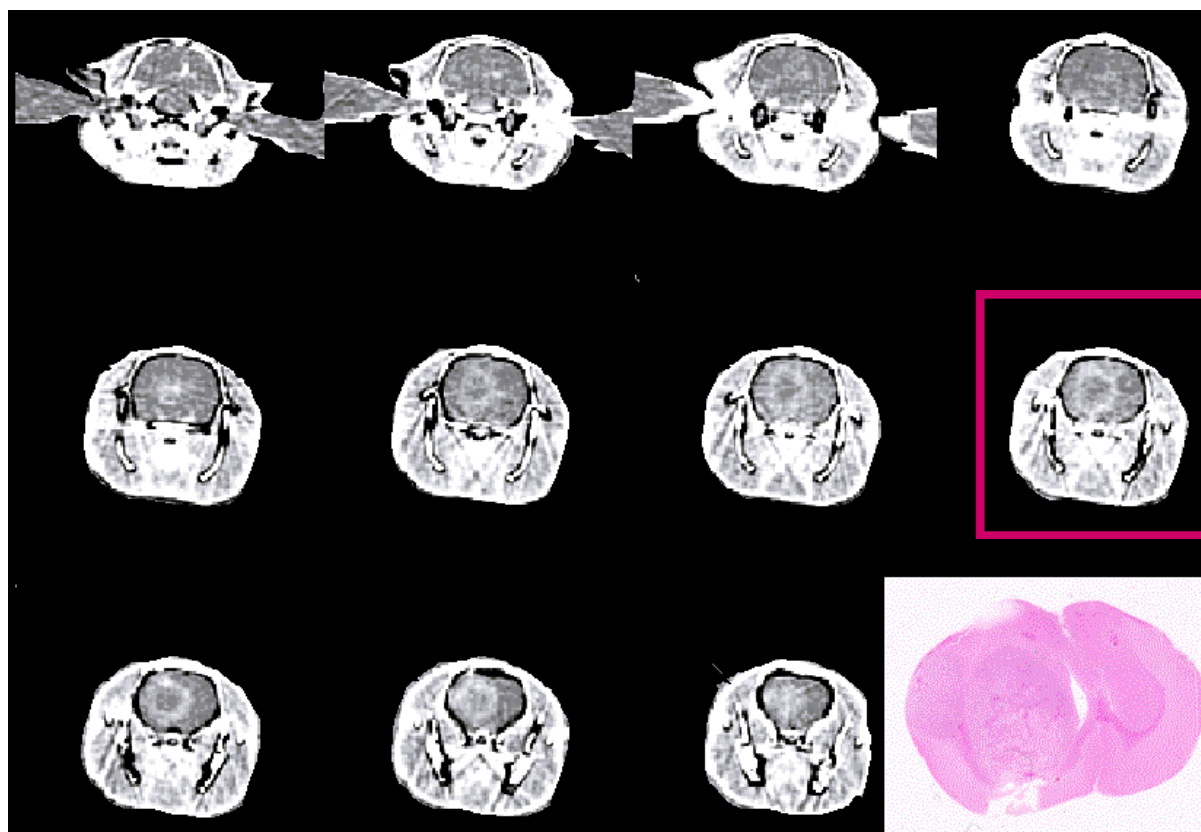


Figure V-9 : Images SRCT transverses obtenues 10 minutes après injection de 0.5 ml/ 100 g de Magnevist®. De gauche à droite et de haut en bas, les coupes jointives de 800 μ m échantillonnent la tumeur du rat depuis les oreilles vers le museau. La dose à la peau des rats était de 5 cGy/coupe et le mode de soustraction de type K-edge. En bas à droite : coupe histologique du cerveau colorée à l'HES.

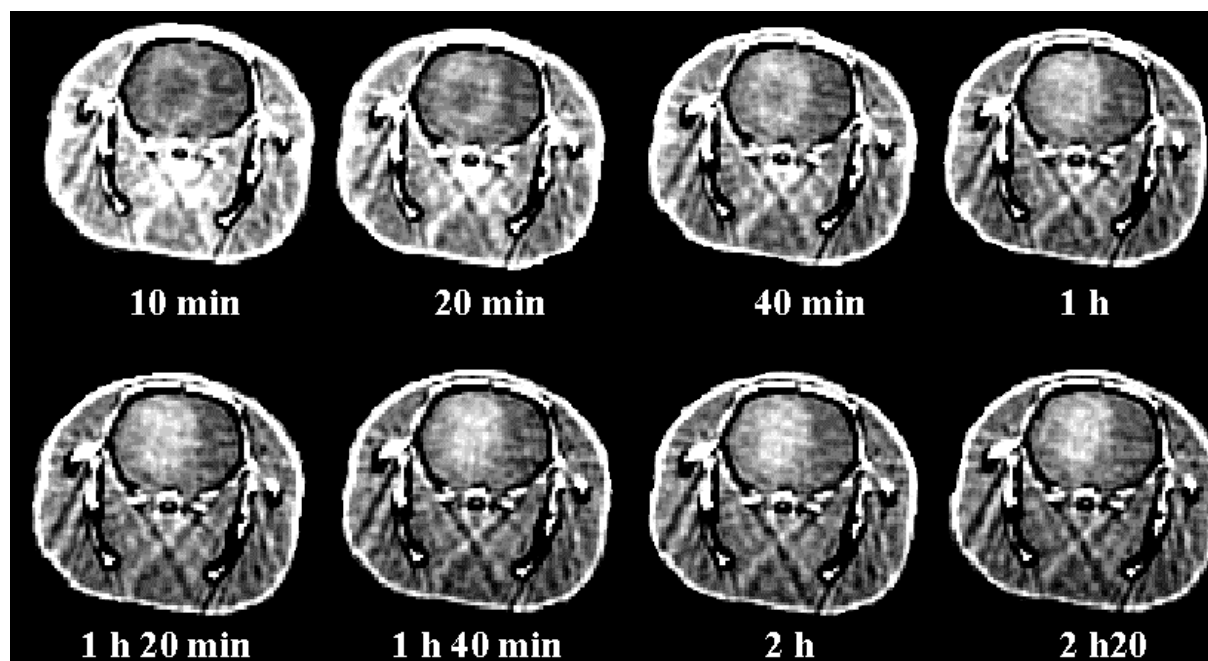


Figure V-10 : Distribution temporelle de la répartition intracérébrale de gadolinium injecté sous forme de Magnevist® (0.5 ml/100g) à un rat porteur d'un gliome. Les coupes transverses présentées ici ont été obtenues par SRCT en mode K-edge, avec une dose à la peau de 5 cGy/coupe.

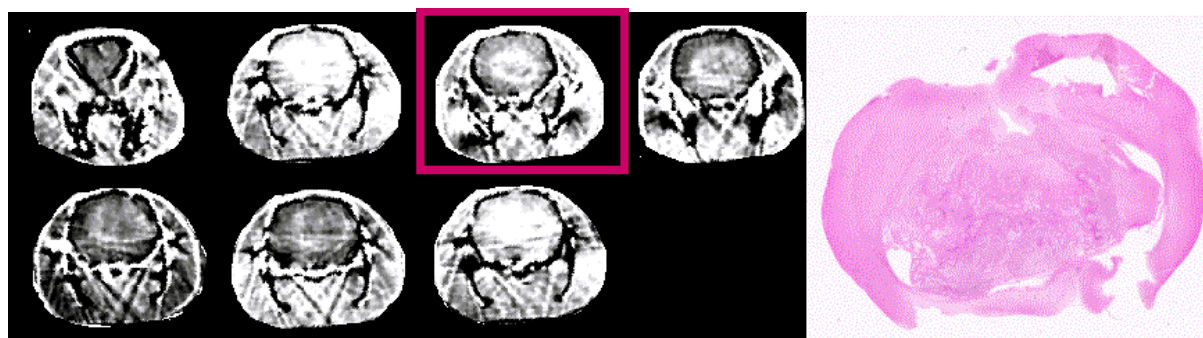


Figure V-11 : Images SRCT transverses obtenues 10 minutes après injection de 0.25 ml/ 100 g de Gadovist®. De gauche à droite et de haut en bas, les coupes jointives de 800 μ m échantillonnent la tumeur du rat depuis le museau vers les oreilles. La dose à la peau des rats était de 5 cGy/coupe et le mode de soustraction de type K-edge. En bas à droite : coupe histologique du cerveau colorée à l'HES.

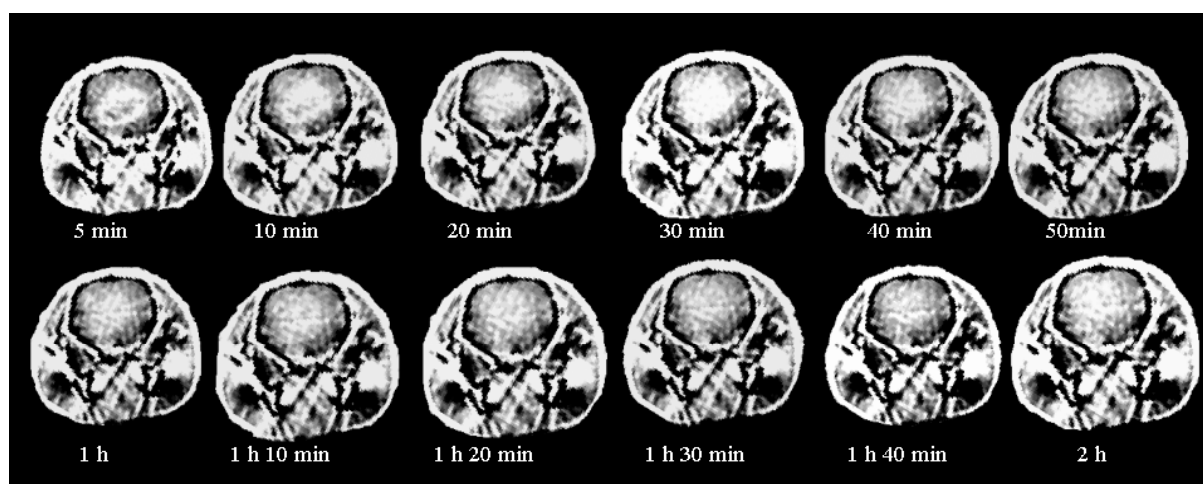


Figure V-12 : Distribution temporelle de la répartition intracérébrale de gadolinium injecté sous forme de Gadovist® (0.25 ml/100g) à un rat porteur de gliome. Les coupes transverses présentées ici ont été obtenues par SRCT en mode K-edge, avec une dose à la peau de 5 cGy/coupe.

Nous constatons sur ces données que les distributions de gadolinium présentent les mêmes caractéristiques, après injection de Magnevist® ou de Gadovist®. Le cerveau des rats est contrasté seulement dans la zone tumorale. Celle-ci est hétérogène, avec une couronne extérieure hyper intense et une zone centrale, peu contrastée, correspondant à la zone nécrosée confirmée par histologie. Au cours du temps, le contraste diffuse progressivement vers le centre de la tumeur et perd de son intensité.

En traçant des régions d'intérêt dans différentes zones de ces coupes transverses, des cinétiques reflétant la distribution temporelle de la concentration absolue de gadolinium ont pu être établies (Figure V-13). Ces exploitations ont été réalisées sur la coupe de référence (distinguée par un encadré rouge sur l'échantillonnage spatial des tumeurs et correspondant aux distributions temporelles présentées). Les tailles de ces régions d'intérêt sont identiques à celles présentées dans le Tableau V-3 p.200.

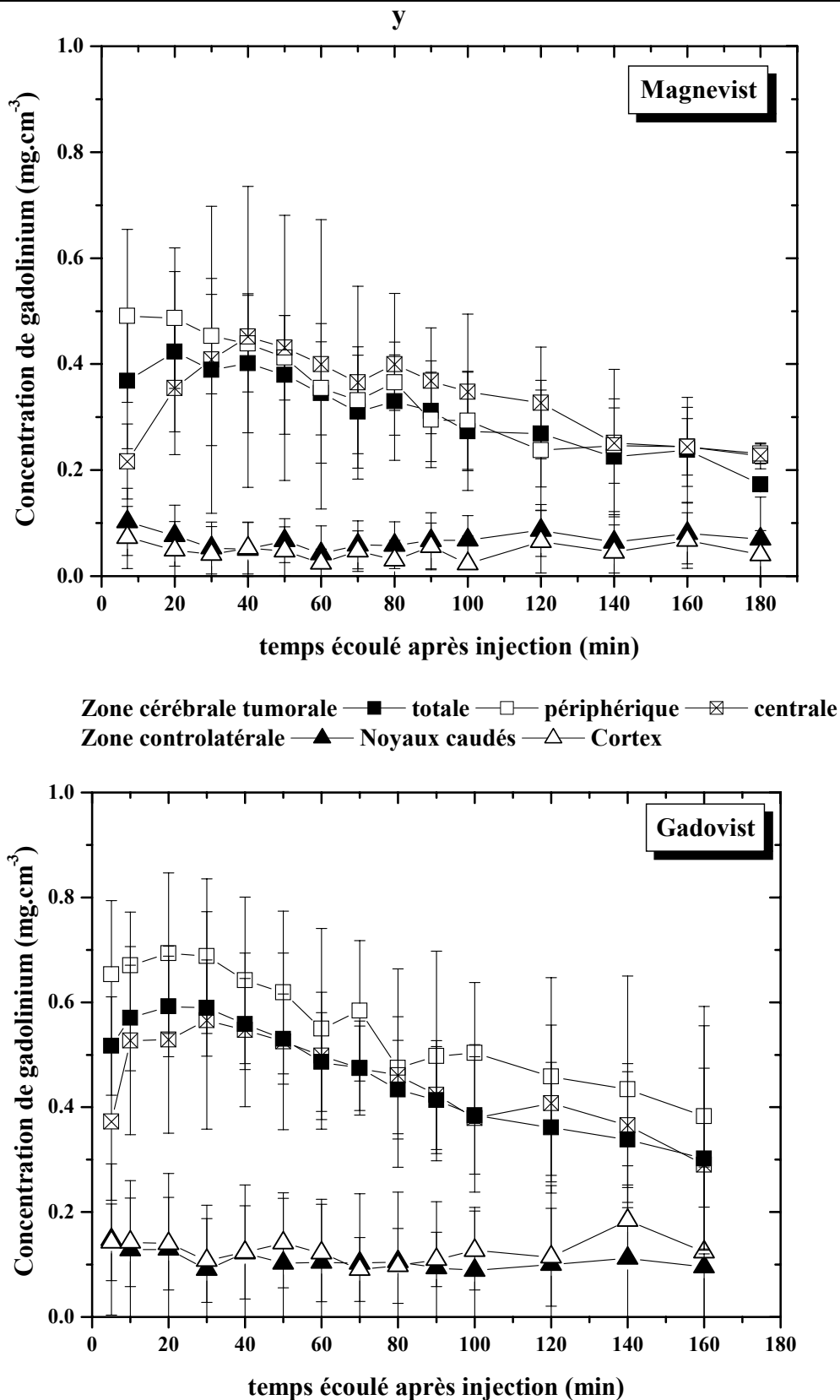


Figure V-13 : Évolution temporelle moyenne de la concentration de gadolinium mesurée in vivo chez 5 rats porteurs de gliomes cérébraux et injectés avec du Magnevist® (0.5 ml/100g) ou du Gadovist® (0.25 ml/100g). Les régions d'intérêts ont été placées soit dans la zone tumorale (périphérique centrale ou totale) soit dans la zone controlatérale, supposée saine. Les barres d'erreur représentent ici l'écart-type des mesures obtenues sur 5 rats pour le Magnevist® et 6 rats pour le Gadovist®

Les concentrations mesurées dans différentes zones de la tumeur et dans le cerveau sain possèdent des caractéristiques temporelles sensiblement identiques après injection de l'agent de contraste paramagnétique héli-molaire ou molaire. Dans les zones saines du cerveau controlatéral, les concentrations de gadolinium mesurées sont d'environ $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Cette valeur est comparable à celle du bruit de fond mesuré dans l'image et ne varie pas dans le temps. Par contre, dans la zone tumorale, la concentration d'agent de contraste augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum environ 30 minutes après l'injection. Le centre de la tumeur, qui apparaît très peu contrasté à la première acquisition (10 minutes post injection), se charge en agent de contraste assez rapidement, par des phénomènes de diffusion au travers de la barrière hémato-encéphalique, lésée. Lorsque l'agent de contraste est biodistribué de manière homogène dans toute la tumeur, les concentrations mesurées dans la zone tumorale totale et centrale s'harmonisent. Une tendance de supériorité de la concentration de gadolinium dans la zone tumorale périphérique hypervascularisée peut toutefois être notée, dans le cas de l'injection au Gadovist®. Néanmoins, compte tenu de la relative imprécision des grandeurs (reflétant grandement l'hétérogénéité tumeurs-tumeurs), il est difficile d'en déduire une différence significative de comportement cinétique intratumoral de ces deux agents de contraste.

La diminution temporelle des concentrations de gadolinium mesurées dans ces gliomes de stade avancée est lente : 2 heures après l'injection, la diminution des concentrations est de 36%, 33 et 23 % pour le Gadovist®, respectivement pour des ROI placées au niveau de la totalité, la périphérie ou la région centrale des tumeurs. Pour le Magnevist® ces diminutions par rapport à la première acquisition sont de 27 % et 51% pour la tumeur en totalité ou en périphérie et correspond à une augmentation de 51% dans le cas de la nécrose. Sur les images présentées précédemment (cf. Figure V-10 p.202), ce phénomène d'accumulation de l'agent de contraste au centre de la tumeur semble également être perceptible alors que pour le Gadovist® une simple diffusion associée à une élimination de l'agent semble intervenir.

Nous retiendrons que dans les 2 heures qui suivent une injection intraveineuse de 0.5 ml/100g de Magnevist® ou de 0.25 ml/100 g de Gadovist®, les concentrations de gadolinium présentes dans le cerveau, qui sont d'environ $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 10 minutes après injection, diffusent lentement vers le centre de la tumeur. Ceci correspond à une extravasation de l'agent de contraste hors des néovaisseaux tumoraux vers la zone nécrotique dépourvue de vascularisation (confirmé par l'histologie).

Les concentrations d'agent de contraste mesurées dans le cerveau sain sont environ trois fois inférieures à celles attendues (Tableau V-2). Ceci peut s'expliquer par le fait que les valeurs annoncées sont estimées immédiatement après l'injection, à un cycle du rythme cardiaque près. Pour la première image de nos cinétiques temporelles, réalisées 10 minutes après injection, le premier passage du bolus dans les vaisseaux est achevé et laisse place aux phénomènes de diffusion des agents de contraste de faibles poids moléculaires [Schm91a] hors du réseau néovasculaire tumoral, grâce aux ruptures de la barrière hémato-encéphalique [Mile99]. Il est par contre intéressant de noter que les variations temporelles de la distribution de l'agent de contraste paramagnétique au sein de la tumeur sont relativement faibles : à 30 % près nous pouvons dire qu'entre 10 minutes et deux heures après injection, 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de gadolinium ont été mesurés *in vivo*, dans les tumeurs cérébrales des rats après injection de 0.4 g de Gd/kg de masse corporelle des rats. Cette quantité est environ 5 fois supérieure à celle mesurée dans la zone controlatérale, supposée saine.

V.1.2.3. Implications pour le choix de l'agent de contraste

Le Gadovist[®] est un agent de contraste paramagnétique deux fois plus concentré que le Magnevist[®]. Les caractéristiques pharmacologiques de ces deux agents semblent être équivalentes dans la mesure où les cinétiques de distribution temporelle des concentrations de gadolinium mesurées par SRCT possèdent la même allure. Si pour le protocole expérimental utilisé nous avons choisi de diviser par deux le volume total d'agent de contraste injecté aux rats, afin d'éviter des problèmes physiologiques, nous aurions tout aussi bien pu choisir d'injecter les mêmes volumes d'agents de contraste aux rats et d'ainsi obtenir des concentrations de gadolinium deux fois plus élevées dans le cerveau tumoral. 10 minutes après une injection de ce type, il serait donc possible d'obtenir des concentrations de gadolinium de l'ordre de 1 mg/cm^3 . Dans notre approche la forme de l'agent de contraste et sa teneur en éléments lourds à doser sont des notions essentielles pouvant limiter la validité de notre technique. S'il est clair que le Magnevist[®] ne pouvait pas être envisagé pour une éventuelle application clinique (du fait des trop grand volumes d'injection pour obtenir des concentrations cérébrales suffisantes de gadolinium), la disponibilité sur le marché d'agents plus concentrés, tels que le Gadovist[®] ouvre de nouvelles perspectives en imagerie X avec rehaussement de contraste par agent paramagnétique, grâce aux propriétés physiques du gadolinium.

En comparaison avec les agents de contrastes iodés, les avantages du gadolinium ont été évoqués au chapitre § III.1.5 p.82. Par un rayonnement X d'énergie fixée, la plus forte

valeur du coefficient massique d'atténuation totale du gadolinium rend le gadobutrol très attractif comme agent de contraste aux rayons X, dans la mesure où des concentrations équivalentes peuvent être introduites [Schmi95]. En angiographie coronarienne par rayonnement synchrotron, le gadolinium a aussi montré un intérêt certain dans la mesure où les doses maximales injectables puissent être augmentées (risqué avec les agents de grande osmolalité), et où les agents de contraste paramagnétiques puissent être plus concentrés [Este02].

V.1.3. SRCT et imagerie paramétrique tissulaire: première approche

Cette étude préliminaire ouvre la voie vers le développement de méthodes de traitement des images permettant l'accès à des paramètres fonctionnels caractérisant les tumeurs et leur stade d'évolution. Les résultats de cette étude de faisabilité sur rats vivants sont notamment intéressants dans la mesure où un phénomène de diffusion du produit de contraste vers la zone nécrotique de la tumeur non vascularisée y est clairement mis en évidence. Une méthode de traitement analytique pourrait être développée pour étudier cette diffusion, comme proposé par Patlak [Patl83, Schm91b] et éventuellement réaliser des cartographies des ruptures de la BHE [Legg99]. Une étude de ce type a été tentée avec les données présentées précédemment mais, en raison de l'absence d'entrée artérielle de référence encore visible 10 minutes après l'injection, la concentration tissulaire mesurée dans les muscles des joues a du être supposée représentative de la concentration plasmatique de gadolinium. Dans ces conditions, les valeurs de coefficients de perméabilité trouvées sont $0.005 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$, pour le Magnevist® et le Gadovist®. Néanmoins nous pensons que ces valeurs ne sont pas représentatives d'un quelconque phénomène physique et nous préférons retenir la relative ressemblance de comportements pharmacocinétiques de ces deux agents.

Des progrès ont par la suite été accomplis du point de vue purement expérimental dans le but d'accéder à cette information. La qualité de nos images a notamment été améliorée grâce aux trois points suivants: 1- détermination de la position du centre de rotation au dixième de pixel près; 2- collimation du faisceau à l'entrée du détecteur pour en limiter l'information provenant du rayonnement diffusé; 3- réglage très précis du parallélisme entre le plan de rotation de l'objet et celui du faisceau.

Pour accéder à la mesure du VSC, l'injection de l'agent de contraste doit être soit très rapide (injection dite en bolus, comparable aux méthodes de premier passage utilisées en IRM), soit stationnaire de sorte à obtenir un taux constant de produit de contraste dans le sang. Puisque nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'agents de contraste assez concentrés

et de et de poids moléculaire suffisamment élevé pour ne pas passer la BHE, l'injection en bolus a été privilégiée. Ceci nous a conduit à :

- utiliser un moteur de rotation très rapide pour l'acquisition des données ($180^\circ/\text{s}$), pour échantillonner le premier passage du bolus dans le réseau sanguin ;
- injecter un bolus d'agent de contraste de 0.1 ml en 0.3 s par cathétérisme les rats au niveau de leur jugulaire permettant l'injection (injecteur) ;
- réaliser une soustraction des images temporelles (image à une énergie au-dessus du seuil K de l'agent après injection soustraite à celle avant injection) plutôt que de type K-edge (soustraction de 2 images acquises simultanément mais à deux énergies de part et d'autre du seuil K). Ce dernier type de soustraction, très efficace dans le cas d'objets à imager en mouvement (cœur).

Grâce à ces améliorations méthodologiques les courbes de premier passage du bolus ont été étudiées, chez le rat sain et le rat porteur d'une tumeur (gliome C6) (cf. Figure V-14)

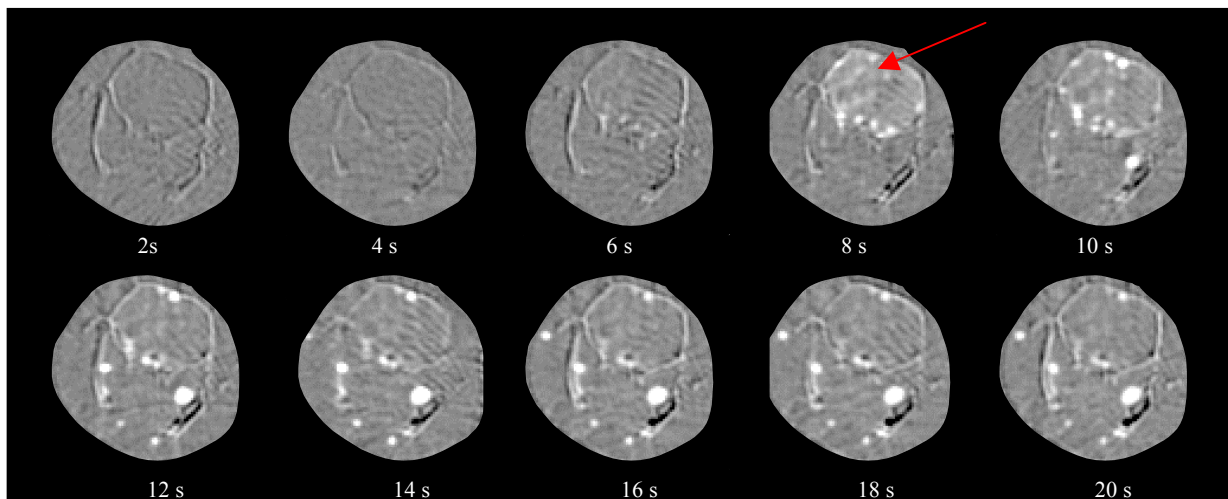


Figure V-14 : Visualisation du premier passage d'un bolus d'iode injecté 3 secondes après le début de l'acquisition – Images SRCT en mode de soustraction temporelle. La flèche rouge indique la position de la tumeur

En utilisant la théorie cinétique des traceurs [Axel80, Lass79], la détermination absolue des concentrations d'agents de contraste dans le temps doit conduire à l'établissement de cartographies de volume ou de débit sanguin cérébral quantitatives. Le jeu d'images anatomiques acquises à différents instants et dont chaque voxel contient une information d'atténuation des RX par les tissus, ont été converties en images fonctionnelles, dont chaque voxel contient cette fois l'information sur le volume sanguin cérébral, en % après normalisation par rapport à une entrée artérielle (cf. Figure V-15). Cette étude a fait l'objet du DEA de Jean-François Adam. Les valeurs relatives trouvées dans le cerveau sain sont tout à fait comparables à celles annoncées dans la littérature (VSC de 5.6 % pour le cerveau entier,

contre 4% en référence [Bena86]). De la même manière, chez le rat tumeur, le rapport de VSC entre la nécrose et le cortex est de 0.3 par notre technique contre 0.26 dans la littérature. Ce rapport est de 2.36 si l'on compare la zone péri tumorale hypervascularisée au cortex (littérature : 1.86). Une corrélation avec les densités de vaisseaux comptées sur les coupes histologiques de ces mêmes rats a été réalisée dans le cadre d'un stage d'une étudiante de DEA (Bouhlal Yosr).

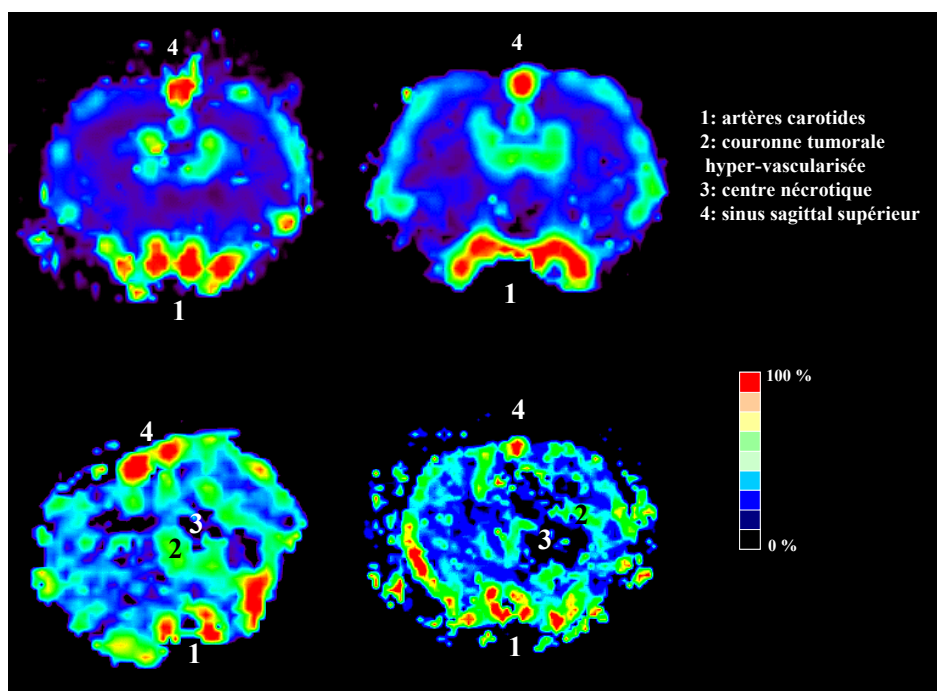


Figure V-15 : Cartographies de volume sanguin cérébral obtenues chez le rat sain (coupes supérieures) et le rat tumeur (coupes inférieures) par SRCT

V.1.4. La SRCT : un puissant outil au service de la radiothérapie ?

En conclusion, la SRCT est un puissant outil de référence permettant de réaliser *in vivo* des cartographies quantitatives, par exemple des pathologies cérébrales tumorales, résolues en concentration d'agent de contraste. L'information fonctionnelle qu'il est possible de retirer de ces images est importante pour la caractérisation du stade d'évolution des tumeurs et donc pour le choix de la stratégie du traitement. Au-delà de ces informations fonctionnelles et anatomiques, la biodistribution de l'élément lourd au sein de la tumeur et sa quantification précise est en soi une donnée des plus intéressantes. Il est à noter que pendant plus de deux heures après une unique injection d'agent de contraste à base de gadolinium, les gliomes des rats affichent des concentrations en gadolinium cinq fois supérieures à celles mesurées dans le cerveau sain. En envisageant des injections répétées ou continues, avec des volumes d'injection plus importants que ceux utilisés en diagnostic (qui seraient acceptables

dans une indication thérapeutique), il ne semble pas déraisonnable de pouvoir mesurer chez l'homme des concentrations intra-tumorales comprises entre 1 et 10 mg d'iode ou de gadolinium par cm^3 de tissu cérébral (cf. Tableau V-2 p.195) [Rose99]. Toutefois les concentrations actuelles des agents de contraste à base de gadolinium disponibles en clinique rendent *a priori* cet objectif encore difficile à atteindre et l'iode semble plus adaptée pour l'instant.

Dans une perspective de traitement par radiothérapie binaire fondée sur le renforcement de l'effet photoélectrique des rayons X monochromatiques, la quantification précise des concentrations d'agent de contraste présent dans la tumeur est une donnée essentielle pour prédire les interactions physiques et faire la prévision dosimétrique du traitement. Contrairement à la BNCT (cf. § II.4.3.5.1 p.58), la thérapie assistée par SRCT offrirait la possibilité d'imager la tumeur pendant son traitement et de doser précisément et en temps réel les quantités d'agents lourds présents dans la tumeur au moment de l'irradiation thérapeutique.

Le souci de contrôler au moment du traitement le bon positionnement de la tumeur n'est pas moins important en clinique puisque la radiothérapie conformationnelle, dont nous avons parlé au paragraphe § II.4.3.1.1 p.48, nécessite une imagerie en temps réel. L'imagerie portale (PID) a été développée pour suppléer à ce manque mais sa qualité est physiquement limitée par les énergies des rayonnement utilisés. En effet, les hautes énergies utilisées (supérieures au mégavolt) ne sont pas adaptées à l'imagerie du fait de la faible dépendance de l'effet Compton avec le numéro atomique des matériaux.

En résumé, la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron monochromatique pourrait donc être un puissant outil au service de la radiothérapie puisqu'elle permettrait en temps réel d'imager la tumeur à traiter et de doser les quantités d'agents de contraste intratumorales présentes au moment de l'irradiation. Ces données sont essentielles pour déterminer précisément les distributions de doses délivrées au patient.

V.2. MESURE DE L'AUGMENTATION DE DEPOT D'ENERGIE LIE A LA PRESENCE D'UN AGENT DE CONTRASTE PENDANT UNE IRRADIATION PAR DES RAYONS X MONOCHROMATIQUES

L'hypothèse de base de la modalité radiothérapeutique proposée est que les agents lourds présents dans le proche voisinage des cellules tumorales seraient capables de renforcer l'effet photoélectrique et d'augmenter, par ce phénomène physique, l'énergie déposée et donc la toxicité du rayonnement. Nous avons souhaité vérifier cette hypothèse sur différents modèles d'étude, physiques et biologiques, qui devaient de plus nous permettre de confirmer expérimentalement l'existence d'un optimum d'énergie d'irradiation. Ces modèles ont été enrichis massivement en agent de contraste iodé (ou analogue), avec une proportion massique de l'ordre de 1%, soit 10 mg.cm^{-3} . L'objectif de ces expériences était de mesurer le gain de dépôt d'énergie par rapport au modèle non enrichi.

V.2.1. Dopage par des atomes lourds du dosimètre chimique Fricke gélifié

La première utilisation des gels ferreux en dosimétrie a été décrite par l'équipe de Maryanski [Mary93]. De nombreux avantages les rendent aujourd'hui très attractifs : ce sont des composés qui sont, par leur constitution aqueuse, équivalents aux tissus humains [Kron93]; ils peuvent être mis en place dans n'importe quelle géométrie de fantômes en permettant ainsi de se rapprocher des conditions d'irradiation réelles [Hepw99] et leur lecture par IRM permet d'obtenir des distributions 3D des doses.

Le but de cette étude était de savoir si de tels gels permettraient de mesurer l'augmentation de dépôt d'énergie liée au renforcement de l'effet photoélectrique dans une tumeur chargée en élément lourd. Pour ce faire, différentes préparations de gel de Fricke ont été réalisées selon un protocole standard. A ces solutions, 10 mg d'iode ou de baryum par millilitre de gel ont été rajoutées, en utilisant des agents de contraste usuels, tels que le Telebrix® ou le Micropaque®. Les doses d'irradiation se sont échelonnées entre 2 et 8 Gy avec des énergies de rayons X comprises entre 33 et 85 keV. Les débits de dose gel ont été réglés de sorte à être identiques pour toutes les énergies.

V.2.1.1. Variation de la réponse des différents gels en fonction de l'énergie d'irradiation

En premier lieu, nous avons procédé à l'étalonnage de la réponse du gel de Fricke, dopé ou non, et irradié avec des rayons X de basse énergie, afin de vérifier la linéarité de la réponse des gels malgré les modifications de constitution.

V.2.1.1.1. Sensibilité des gels en fonction de leur constitution et de l'énergie d'irradiation

Une étude préliminaire a consisté à préparer des gels dopés à l'iode ou au baryum (20 mg.cm⁻³) par l'introduction d'Hexabrix® et de Micropaque® respectivement. La formation immédiate d'un précipité blanc laiteux lorsque le gel de Fricke est mis en contact de l'Hexabrix a été constatée. Afin de vérifier le comportement correct de ces solutions modifiées comme dosimètre chimique, elles ont été irradiées au moyen d'un tube à rayons X conventionnel puis imagées par résonance magnétique nucléaire (Figure V-16).

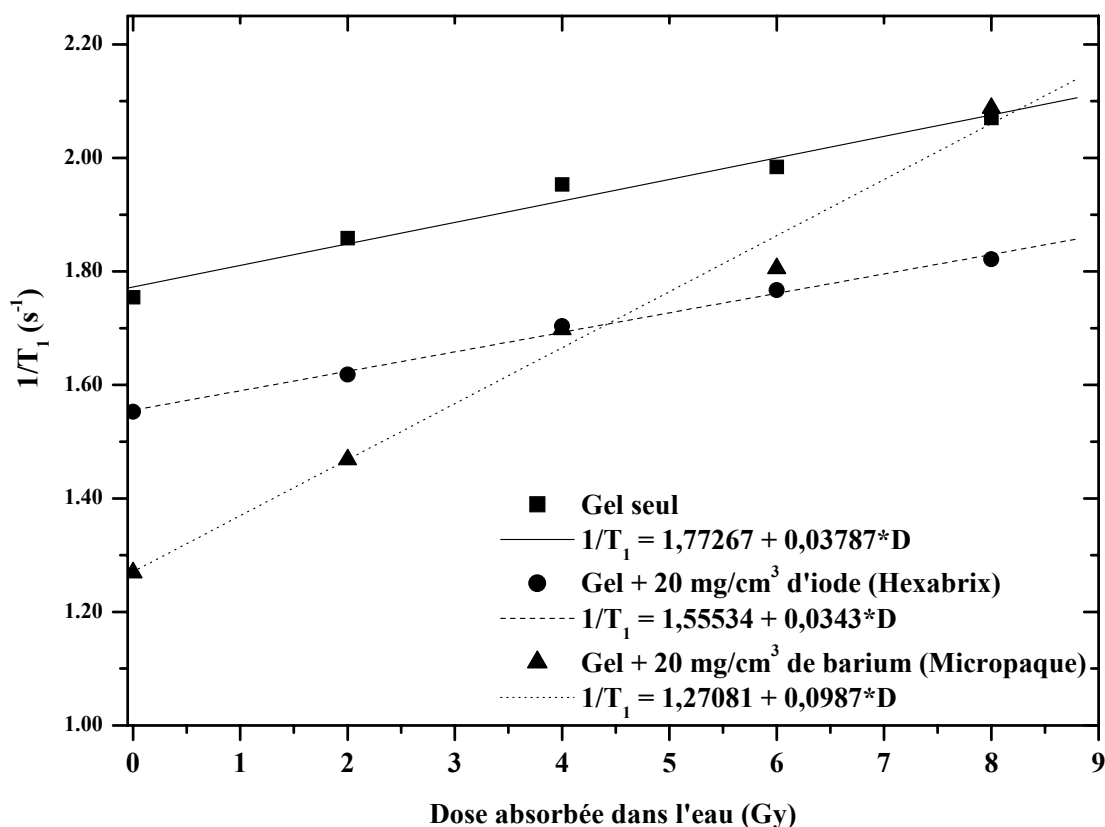


Figure V-16 : Linéarité de réponse des différents gels de Fricke en fonction de la dose d'irradiation, délivrée par un tube à rayons X classique 100 kVp, 2 mm Al inhérent, CDA = 1.6 mm Al, DSP = 50, champ de 15x15 cm²

Ces courbes montrent que, quel que soit l'agent dopant, la linéarité du taux de relaxation protonique $1/T_1$ en fonction de la dose absorbée est conservée entre 1 et 10 Gy. Les résultats des régressions linéaires sont indiqués sur la figure ci-dessous. Si le gel pur et le gel dopé à l'iode présentent des sensibilités pratiquement équivalentes, le gel dopé au baryum apparaît ici comme beaucoup plus sensible à l'irradiation (pente de la droite d'étalonnage 2.6 fois plus importante). Sans irradiation, les réponses des gels dépendent de leur constitution. Le baryum, rajouté dans le gel sous forme de $BaSO_4$, et dans une moindre mesure l'iode, provoquent une augmentation du temps de relaxation T_1 . Si le gel dopé au baryum ne présentait lors de sa fabrication aucune modification d'apparence par rapport au gel pur, nous avons voulu tester un autre composé iodé, le Telebrix[®], pour s'assurer que la forme du composé chimique n'était pas à l'origine des ces variations de réponse sans irradiation. Ce monomère ionique tri-iodé a présenté une droite d'étalonnage rigoureusement superposable avec celle de l'Hexabrix[®], dimère ionique. En revanche, aucun précipité n'était visible lors de la fabrication du gel, ce qui nous a poussé à préférer son utilisation pour les expériences avec le rayonnement synchrotron.

Des petits tubes de 1.75 cm de diamètre, contenant du gel de Fricke dopé ou non, ont été irradiés par rotation puis translation dans le faisceau synchrotron à diverses énergies. Ses dimensions étant de 1 mm x 2 cm (hauteur x horizontal), 10 plans de coupe jointifs ont été réalisés pour irradier le gel de manière homogène sur 1 cm de haut. Les pentes des droites d'étalonnage obtenues aux différentes énergies testées pour les différents gels sont présentés ci-dessous (Figure V-17).

La sensibilité du gel de Fricke pur apparaît pratiquement constante entre 33 et 100 keV, avec une pente de la droite d'étalonnage d'environ $0.03 \text{ s}^{-1} \cdot \text{Gy}^{-1}$. Le gel de Fricke dopé avec $10 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ d'iode, introduit sous forme de Telebrix[®], présente en général une sensibilité deux à trois fois moindre, sauf pour le cas notable de l'énergie d'irradiation de 50 keV, où la sensibilité du gel dopé à l'iode est 2.5 fois plus importante que le gel pur. En revanche, l'introduction du baryum dans la composition du gel de Fricke augmente notamment la sensibilité du gel de Fricke pour des irradiations avec des énergies inférieures à 100 keV. Cette sensibilité dépend de l'énergie de l'irradiation : elle augmente entre 33 et 65 keV, est maximum à 65 keV (pente de la droite d'étalonnage de 0.177) et diminue légèrement à 85 keV.

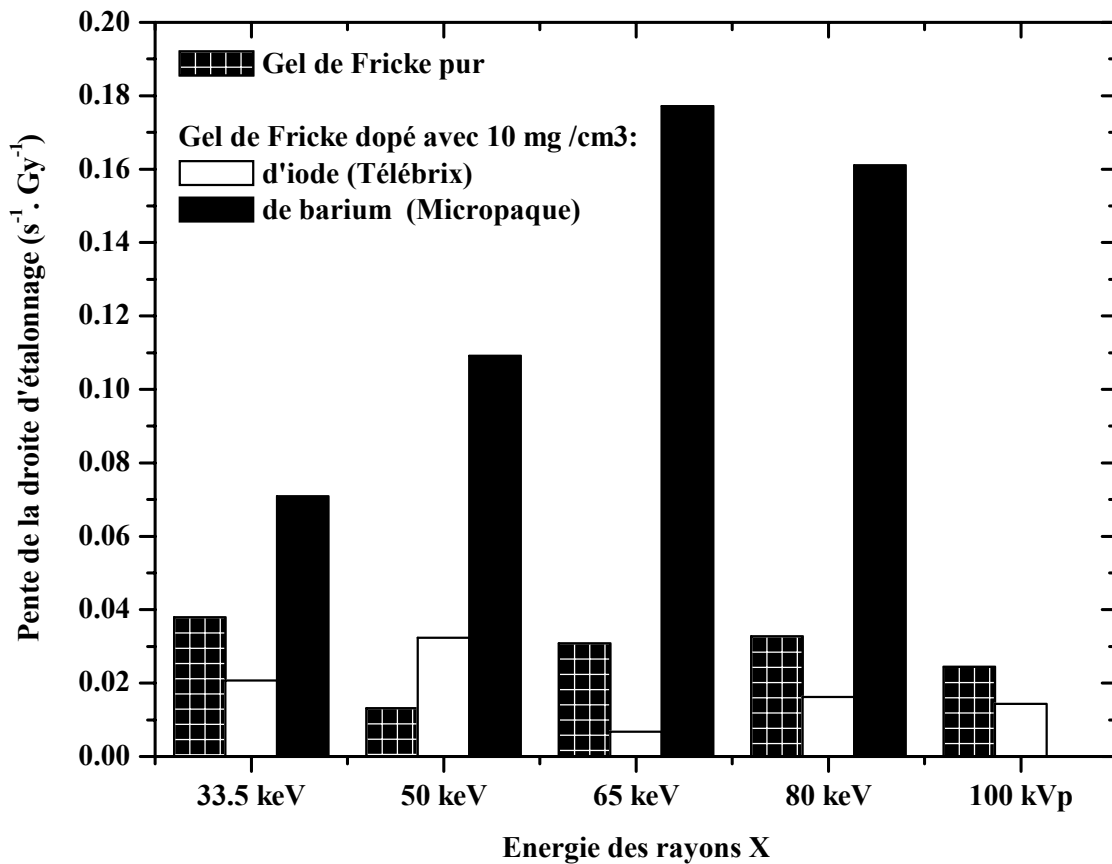


Figure V-17 : Variation de la sensibilité des gels de Fricke purs et dopés par 10 mg.cm^{-3} d'iode (Telebrix®) ou de baryum (Micropaque®) en fonction de l'énergie d'irradiation.

V.2.1.1.2. Comparaison aux valeurs théoriques

Afin de vérifier l'adéquation entre les gains de radiosensibilité constatés sur les gels de Fricke dopés et l'accroissement du dépôt d'énergie par effet photoélectrique sur les atomes lourds ciblés, nous avons calculé les facteurs d'augmentation de dose liés à l'introduction de 10 mg de baryum ou d'iode dans une solution de Fricke (Figure V-18).

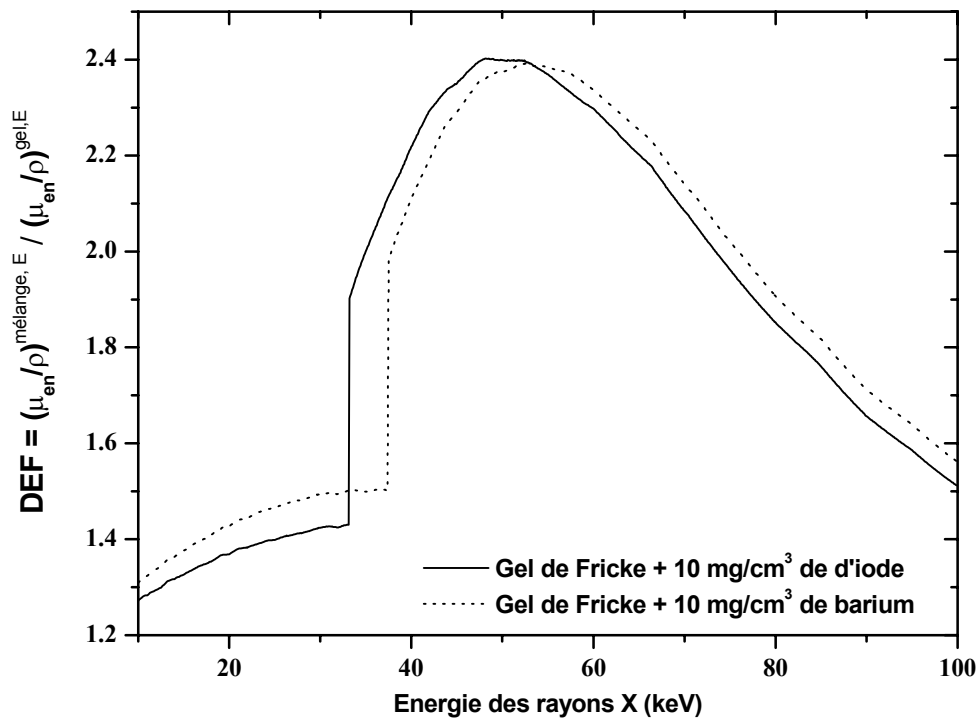


Figure V-18 : Pour une gamme d'énergie de photons comprise entre 10 et 100 keV, facteur d'augmentation de dépôt d'énergie liée à la présence de 10 mg.cm^{-3} d'iode ou de baryum comme éléments constitutifs du gel de Fricke.

Sur cette figure les caractéristiques dosimétriques de l'iode et du baryum apparaissent similaire, à l'exception près de la valeur des énergies des seuils d'absorption K. Le maximum de la valeur du DEF est de 2.4, et correspondant à une énergie d'irradiation de 50 keV.

Afin d'estimer le gain de sensibilité par rapport au gel pur, le rapport des pentes de la droite d'étalonnage du gel dopé par rapport à celle du gel pur a été calculé et comparé au DEF correspondant (Figure V-19).

Les modifications de sensibilité du gel générées par son enrichissement en iode ne correspondent pas aux accroissements escomptés, à l'exception toujours de l'énergie d'irradiation de 50 keV. Cet élément diminue la sensibilité du gel au lieu de l'augmenter, au point d'obtenir des réponses 10 fois plus faibles que celles prédites par le calcul du coefficient d'augmentation de dose absorbée à 65 keV.

Au contraire le gain de sensibilité notable suivant l'introduction de baryum est très largement supérieur aux prédictions théoriques. Cette surestimation est d'au minimum 24 % (33.5 keV) et peut aller jusqu'à 250 % (65 keV).

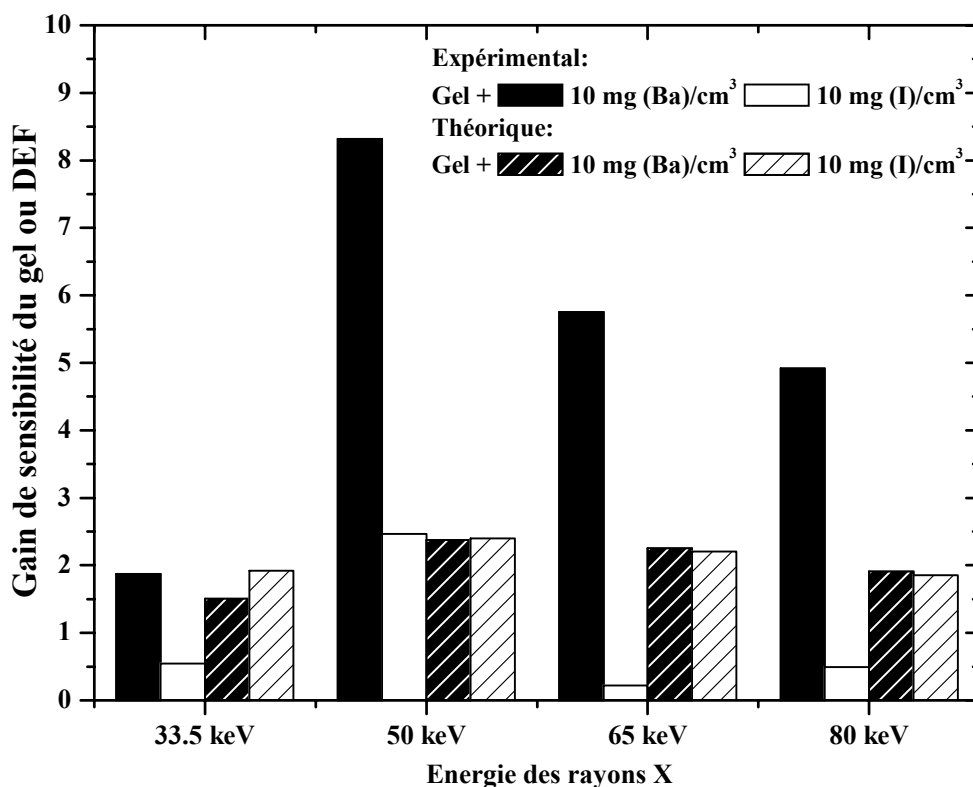


Figure V-19 : Comparaison entre les gains de sensibilité mesurés sur la réponse des gels de Fricke dopés et les facteurs d'augmentation de dose calculés.

V.2.1.1.3. Interprétation physico-chimique

Quelles que soient leurs structures chimiques, les agents de contraste iodés ne contribuent pas ou peu à l'augmentation de l'oxydation des ions ferreux Fe^{2+} en ions ferriques Fe^{3+} dans le gel de Fricke après irradiation par des rayons X de basse énergie. De plus ces composés sont très réactifs avec les solutions d'ions ferreux constituant le gel de Fricke. Sans irradiation, les agents de contraste iodés augmentent le temps de relaxation des protons, laissant penser que les ions ferriques sont présents en plus faible quantité dans les gels dopés à l'iode. Associée à une diminution de la sensibilité de ces gels, une réaction chimique interne, pas nécessairement générée par l'irradiation, pourrait expliquer ces résultats. Celle-ci semble freiner la création ou empêcher la survivance des ions Fe^{3+} , peut être en les réduisant. La réaction naturelle en solution aqueuse entre les ions iodure et Fe^{3+} est :



compenserait l'oxydation des ions ferreux, générés spontanément (en présence d'oxygène) ou suite à l'irradiation.

A l'inverse, le sulfate de baryum, en apportant des cations Ba^{+} au gel de Fricke⁴³ au moment de sa confection, stimule sa réponse sous l'irradiation, en favorisant la création d'ions ferriques. Sans irradiation, le phénomène est plutôt inversé puisqu'un défaut d'ions Fe^{3+} apparaît dans les solutions dopées au baryum par rapport au gel pur.

Aucune mesure directe de l'augmentation de dépôt d'énergie provoquée par l'interaction des rayons X sur les atomes d'iode ou de baryum n'a pu être réalisée dans le cadre de cette étude, du fait de la réactivité chimique des composés introduits dans le gel.

Il est toutefois intéressant de constater que l'introduction de sulfate de baryum dans le gel de Fricke permet d'en augmenter considérablement la sensibilité.

V.2.1.2. Simulation d'un traitement

Un fantôme équivalent à une tête et incluant une petite tumeur centrale a été utilisé pour simuler son traitement. Il a été entièrement rempli de gel de Fricke et le petit tube central symbolisant la tumeur a quant à lui été complété de gel dopé en agent de contraste iodé ou baryté dans sa partie supérieure et de gel pur dans sa partie inférieure. La géométrie des fantômes a été décrite auparavant (cf. § IV.4.6.3 p.156). Les irradiations ont été réalisées à plusieurs énergies comprises entre 33 et 85 keV, par rotation du fantôme dans le faisceau, suivies de translations (plans de coupe jointifs). La dose délivrée dans une masse de gel pur au centre du fantôme était de 5 Gy, avec un débit de dose de 0.1 Gy.s^{-1} . La vitesse de rotation des fantômes a été ajustée de sorte à délivrer 1 Gy par tour à l'axe. La taille du faisceau dans sa dimension horizontale était légèrement supérieure à celle de la tumeur centrale, sur laquelle le faisceau était centré, soit 2 cm.

V.2.1.2.1. Résultats

Pour chaque énergie étudiée, deux fantômes ont été irradiés à deux niveaux différents, correspondant à une tumeur chargée en gel dopé ou pur. Ainsi une comparaison pouvait être réalisée entre ces deux résultats puisque les gels provenaient de la même composition et leur chronologie de refroidissement, d'irradiation, et de lecture IRM étaient similaires.

Sur la figure ci-après sont représentés des exemples de profils de dose mesurés à partir de coupes transverses des gels purs ou dopés par 10 mg/ml d'élément lourd, après une irradiation à 33.5 keV (Figure V-20). De la même manière que pour les étalonnages, la

⁴³ qui contient déjà du sulfate de fer, donc le sulfate ne peut être considéré comme responsable des modifications observées.

sensibilité du gel dopé à l'iode est moindre que celle du gel pur pour une irradiation à 33.5 keV. Le baryum conduit à une réponse environ 6 fois plus importante que dans le gel pur, ce qui est largement supérieur aux valeurs trouvées lors de l'étalonnage (facteur 2 à 33.5 keV, d'après Figure V-19 p.216).

Ce manque de reproductibilité des réponses a également conduit à des résultats peu fiables dans les fantômes têtes, pour les autres énergies d'irradiation. Les valeurs des taux de relaxation $1/T_1$ dans les gels irradiés ont parfois été trouvées inférieures à celles obtenues dans les gels non irradiés. Le protocole expérimental et la complexité de constitution des fantômes sont donc critiquables et conduisent à des résultats peu fiables.

Ces résultats, même si ils ne sont pas exploitables de façon quantitative, montrent néanmoins qu'une irradiation homogène pouvait être délivrée au centre d'une tumeur de 1.5 cm de diamètre insérée dans un fantôme cylindrique de 8.2 cm de diamètre. A 33.5 keV, le léger surdosage à l'entrée du faisceau apparaît sur les profils de dose réalisés diamétralement dans une coupe transverse des fantômes remplis de gel de Fricke (Figure V-20).

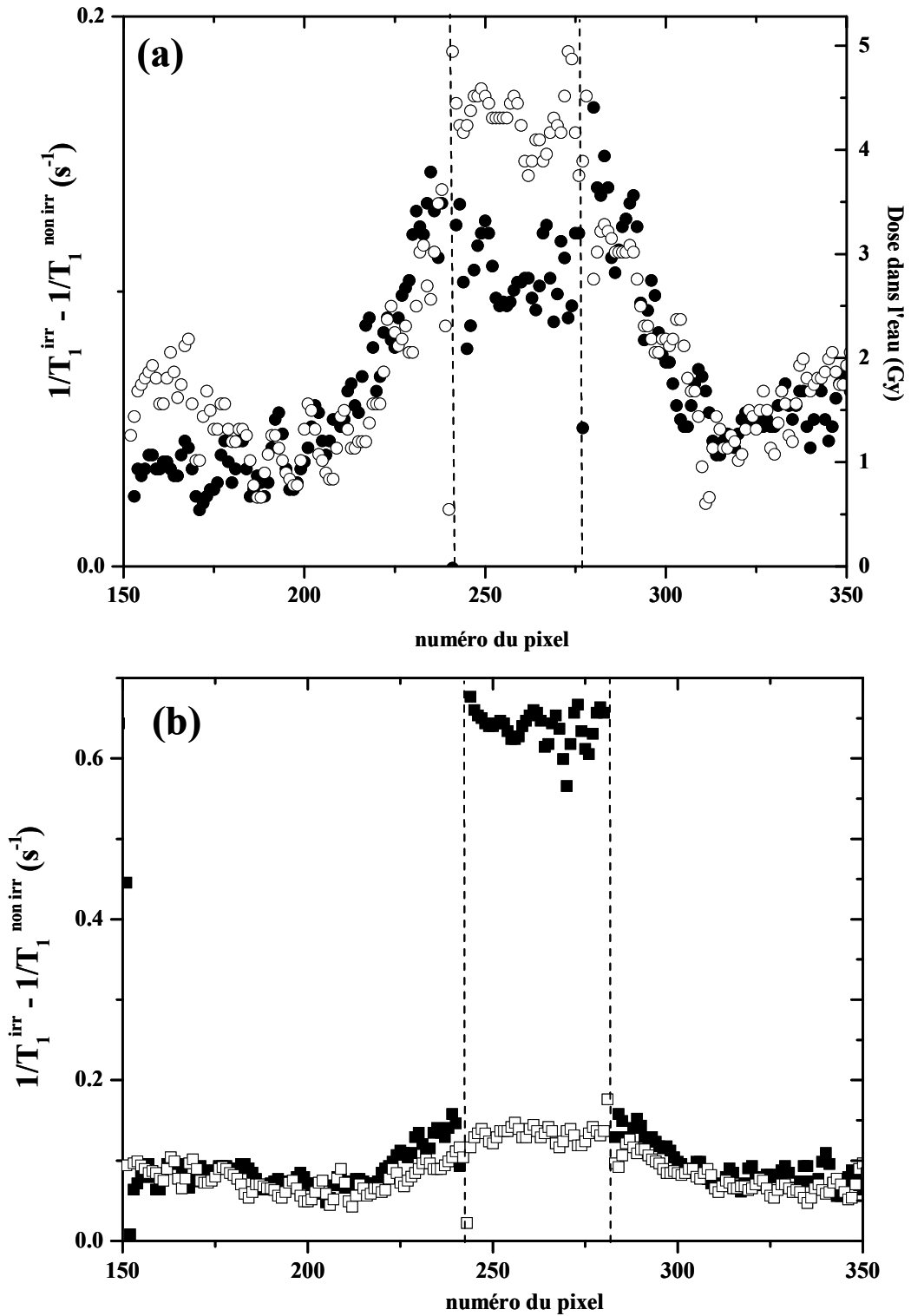


Figure V-20 : Profils transverses réalisés dans un fantôme rempli de gel de Fricke de 8.2 cm de diamètre contenant une tumeur symbolisée par un tube de 1.5 cm de diamètre, contenant une solution de Fricke normale (symboles blancs) ou dopée (symboles noirs) avec 10 mg.cm^{-3} d'iode (a) ou de baryum (b). La dose délivrée par un faisceau de RX de 33.5 keV, de 2 cm de large et de 1 mm de haut est de 5 Gy au niveau du centre du tube symbolisant la tumeur, correspondant au centre du fantôme en rotation. Les signaux $1/T_1$ mesurés dans les zones du gel irradiées ont été corrigés de la réponse du gel de même constitution, non irradié. Les traits en pointillés matérialisent les parois du tube central représentant la tumeur.

V.2.1.2.2. Conclusions

Cette simulation d'un traitement de tumeur chargée en agent de contraste n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation de dose absorbée par les tissus, due à une interaction physique entre le rayonnement ionisant et les atomes lourds dopant le gel. Les effets chimiques induits par la mise en présence des différents composés masquent en effet l'effet du rayonnement sur les éléments lourds. Pour le dopage au baryum, les augmentations de sensibilité observées dans le fantôme tête ne sont pas proportionnelles à celles mesurées lors de l'étalonnage, ce qui nous laisse penser que l'introduction de petits tubes contenant les solutions dopées dans une grande quantité de gel non dopé, simulant les tissus sains, a conduit à des conditions de refroidissement du gel différentes de celles des tubes de la gamme d'étalonnage, et donc à des réponses différentes.

V.2.1.3. Réflexion autour de la nécessaire équivalence d'un dosimètre par rapport au tissu irradié

Le principal intérêt de l'utilisation des gels de Fricke comme dosimètre chimique est l'équivalence de leur réponse avec celle des tissus humains. La possibilité d'obtenir une distribution 3D de l'énergie déposée en fait un puissant outil de contrôle et de vérification des plans de traitement en radiothérapie, aujourd'hui de plus en plus complexes.

La complexité de la dosimétrie des rayons X de basses énergies réside : i) dans la brusque augmentation des probabilités de réactions avec la composition des matériaux du dosimètre due à la large prédominance de l'effet photoélectrique dans cette gamme d'énergie ; et ii) les très forts gradients de dose dans les premiers centimètres de tissus traversés.

L'équivalence aux tissus humains des dosimètres chimiques type gels de Fricke a été montrée par Kron *et al.* pour les basses énergies de rayons X (tubes rayons X classiques, entre 70 et 100 kV_p) [Kron93]. Ces auteurs ont également montré qu'en dessous de 10 Gy, il existait une relaxation linéaire entre les taux de relaxation $1/T_1$ mesurés par IRM et la dose de rayons X absorbée. Le gel de Fricke pourrait ainsi être un dosimètre idéal pour les basses énergies de rayons X, qui demeure problématique.

Pour tenter de mesurer l'accroissement de dose liée à la présence d'élément lourd dans un tissu irradié par des rayons X de basses énergies, l'utilisation du gel de Fricke nous a semblé une excellente alternative à l'utilisation de dosimètres de référence plus conventionnels, type chambre d'ionisation. Ces dernières étant remplies d'air, une simple

correction de leur réponse en fonction des différences de coefficients d'absorption d'énergie par rapport au milieu extérieur ne nous a pas semblé une approche suffisamment précise pour mesurer ce gain de dépôt d'énergie.

Confectionner un dosimètre réellement équivalent au tissu irradié, dans toute sa complexité et son inhomogénéité est une idée séduisante et encore très peu développée [Hepw99]. Le gel de Fricke est sans aucun doute l'outil idéal pour ce type d'étude car sa mise en oeuvre est facile malgré quelques problèmes de standardisation des protocoles expérimentaux qui conduisent à de grandes variations de sensibilité malgré des techniques de fabrication presque semblables [Oldh98].

Pour les besoins de la dosimétrie des traitements des tumeurs en BNCT, le dopage d'un dosimètre de Fricke par 60 $\mu\text{g/ml}$ de bore (introduit sous forme d'acide borique), irradié ensuite par des neutrons a montré une augmentation significative de la sensibilité du gel, en bon accord avec des simulations Monte-Carlo. Similairement un gel de Fricke équivalent à une tumeur cérébrale enrichie par 30 ppm de bore et irradié par des neutrons thermiques a permis de mettre en évidence un effet différentiel de la dose absorbée lié à la présence de bore [Gamb00]. Ce dernier a été interprété comme la conséquence des produits de la réaction de capture neutronique par le bore (Eq. II-24 p.58).

Par une approche similaire, des gels enrichis en agents lourds (iode ou baryum) ont été confectionnés pour mesurer une éventuelle augmentation de la proportion d'ions ferriques créés par l'irradiation par des rayons X de basses énergies. Les agents de contraste iodés, quelque soit leur forme chimique, n'ont pas conduit à l'augmentation de sensibilité attendue, des réactions chimiques entre les atomes d'iode et les ions de la solution de Fricke étant capables de masquer les conséquences de l'interaction physique. En revanche, le sulfate de baryum a quant à lui augmenté considérablement la sensibilité du gel, dans des proportions dépendant de l'énergie d'irradiation mais n'étant pas directement corrélées à l'augmentation de dépôt d'énergie liée à l'augmentation de l'effet photoélectrique dans cette solution enrichie. A 50 keV par exemple, la gel de Fricke dopé par 10 mg.cm^{-3} de baryum s'est avéré 8 fois plus sensible que le gel pur, contre une valeur attendue de 2.

Un autre moyen de *mesure* de l'augmentation de dépôt d'énergie a donc été recherché.

V.2.2. Dosimétrie biologique

Notre objectif a été de déterminer *in vitro* l'effet cytotoxique du rayonnement synchrotron sur la survie cellulaire de la lignée SQ20B et d'estimer, par leur réponse au traitement, l'augmentation du dépôt d'énergie liée à la présence d'agents de contraste iodés dans le milieu de culture cellulaire au moment de l'irradiation. Pour ces expériences, les cellules ont été irradiées en suspension dans des tubes en rotation afin de maintenir une répartition homogène des cellules au sein du milieu contenant l'agent de contraste. Un test de clonogénicité standard a ensuite été réalisé pour quantifier l'effet du traitement. Plusieurs concentrations d'iode ainsi que plusieurs énergies d'irradiation ont été testées : 400 eV en dessous et en dessus du seuil K de l'iode (33.17 keV), 50 et 70 keV. Le mode de fonctionnement du synchrotron était le mode uniforme, avec une intensité variant de 200 à 170 mA. Pour irradier l'ensemble des cellules avec un débit de dose équivalent (soit $2.5 \text{ mGy.mA}^{-1}.\text{s}^{-1}$), le gap du wiggler a été réglé à 50 mm pour les trois premières énergies et 45 mm pour la dernière. Dans ces conditions, le débit de dose ne sera pas responsable d'une éventuelle différence de réponse des cellules à l'irradiation, dans le cadre de l'étude de l'effet du choix de l'énergie des RX. L'influence du débit de dose a également été étudiée indépendamment.

V.2.2.1. Relation entre la concentration d'agent de contraste iodé et la létalité des rayons X de 50 keV

Les courbes de survie obtenues après irradiation à 50 keV des cellules SQ20B dont le milieu de culture a été préalablement enrichi avec 0, 3, 10, ou 20 mg.ml d'iode (Iomeron[®]) sont présentées ci-après (Figure V-21).

Ces résultats mettent en évidence une augmentation de la létalité des rayons X de 50 keV liée à la présence de l'agent de contraste iodé dans le milieu de culture cellulaire. Cet effet augmente avec la concentration d'iode dans le milieu de culture.

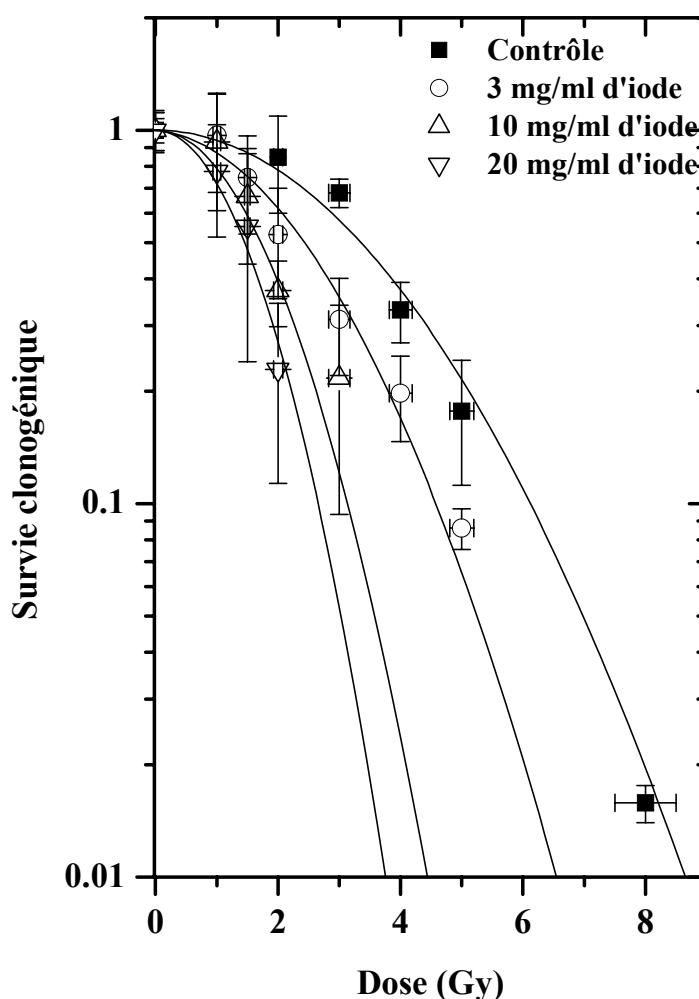


Figure V-21 : Courbes de survie des cellules SQ20B irradiées à 50 keV en l'absence ou en présence d'Iomeron® dans le milieu de culture.

Le contrôle correspond aux cellules dont le milieu n'a pas été enrichi en agent de contraste pour l'irradiation, moyenné sur les 4 énergies d'irradiation. Les données représentées correspondent à une moyenne des survies obtenues pour trois expériences indépendantes. L'ajustement des données expérimentales a été réalisé selon le modèle linéaire quadratique. Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été considérés comme survivants. Les courbes ont été normalisées par rapport aux témoins non irradiés de chaque série. La survie spécifique moyenne des cellules SQ20B aux diverses expositions d'Iomeron® est de 90 %.

Afin d'estimer l'effet de l'iode sur la survie cellulaire, le facteur de radiosensibilisation à 10 % de survie a été calculé (cf. § IV.5.2.5 p.174) et comparé aux valeurs de DEF attendues (cf. § III.2.3 p.88), représentant l'augmentation théorique d'énergie absorbée due à la présence de l'élément lourd dans le mélange (Figure V-22).

Pour la plus faible concentration d'iode testée une bonne corrélation existe entre l'augmentation de dose physique théorique et l'augmentation de radiosensibilisation du système cellulaire SQ20B, estimée arbitrairement pour un taux de survie de 10%. A plus fortes concentrations d'iode, un phénomène de saturation apparaît, rendant le gain biologique environ deux fois moins important que le gain théorique pour 20 mg.cm⁻³ d'iode.

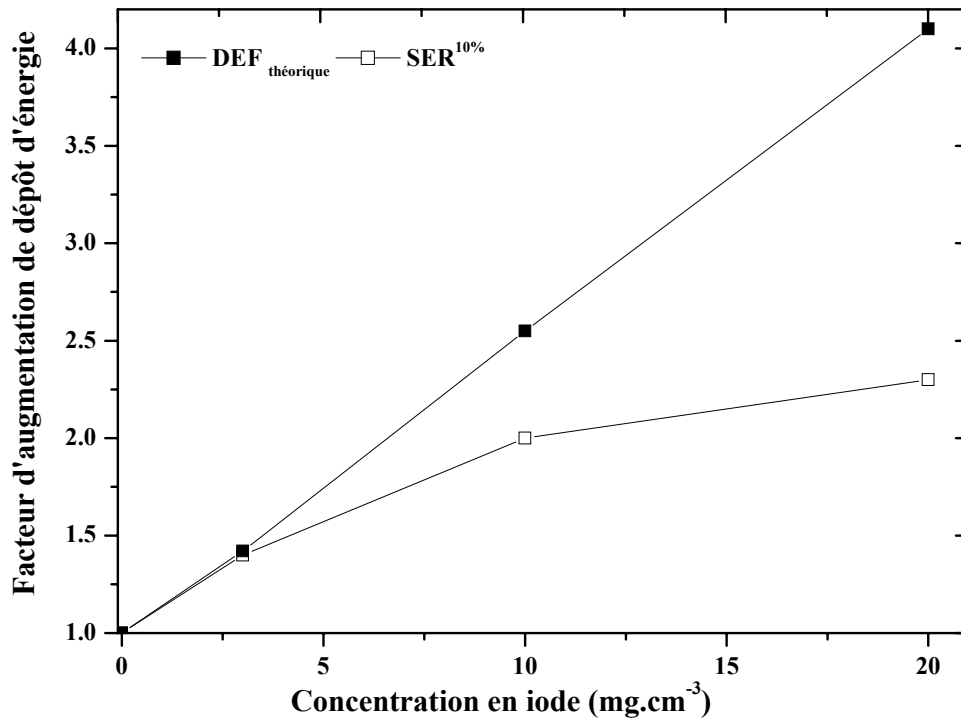


Figure V-22 : Comparaison des gains de dépôt d'énergie théorique et estimé par le calcul du SER^{10%} pour l'irradiation des cellules SQ20B à 50 keV en présence de 3, 10 ou 20 mg.cm^{-3} d'iode (Iomeron®) pour l'isoeffet 10% de survie

L'explication de la différence entre le DEF_{théorique} et le SER expérimental peut tenir à trois éléments :

- 1) l'effet de réduction de tout facteur d'augmentation en radiobiologie cellulaire avec l'augmentation de l'effet. Ici le calcul est fait pour 10% de survie. Il est très probable que l'extrapolation à la limite de l'effet 100% de survie permettrait d'approcher plus exactement l'effet théorique, mais l'incertitude des points expérimentaux aux très faibles doses rendrait cette vérification extrêmement lourde sur le plan expérimental et nous ne l'avons pas faite.
- 2) un authentique effet de saturation ou d'auto absorption des photoélectrons par le milieu lui-même peut augmenter avec la concentration d'iode et contribuer à cet écart.
- 3) enfin, le calcul de la DEF_{théorique} est surestimé car il ne tient pas compte des modifications de fluence photoniques liées à l'auto absorption des RX traversant l'épaisseur d'un tube de 1 cm de diamètre.

Nous retiendrons qu'à 50 keV, l'introduction dans le milieu de culture de 10 mg/ml d'iode conduit à réduire de moitié la dose de rayonnement nécessaire pour obtenir le même effet (en l'occurrence un taux de survie de 10%) sur les cellules non exposées à l'agent de contraste.

V.2.2.2. Optimisation de l'énergie des rayons X

L'influence du choix de l'énergie d'irradiation a été étudiée sur la gamme d'énergies disponibles en rayonnement synchrotron pour mettre en évidence un éventuel maximum de létalité pour les survies des cellules irradiées dans du milieu enrichi ou non en agent de contraste iodé.

La figure ci-dessous présente les courbes de survie des cellules SQ20B irradiées à plusieurs énergies en présence ou en l'absence de 10 mg.cm^{-3} d'iode dans leur milieu de culture (Iomeron®). Les débits de dose ont été calculés dans l'eau pour chaque énergie et ont été maintenus constants avec les changements d'énergie.

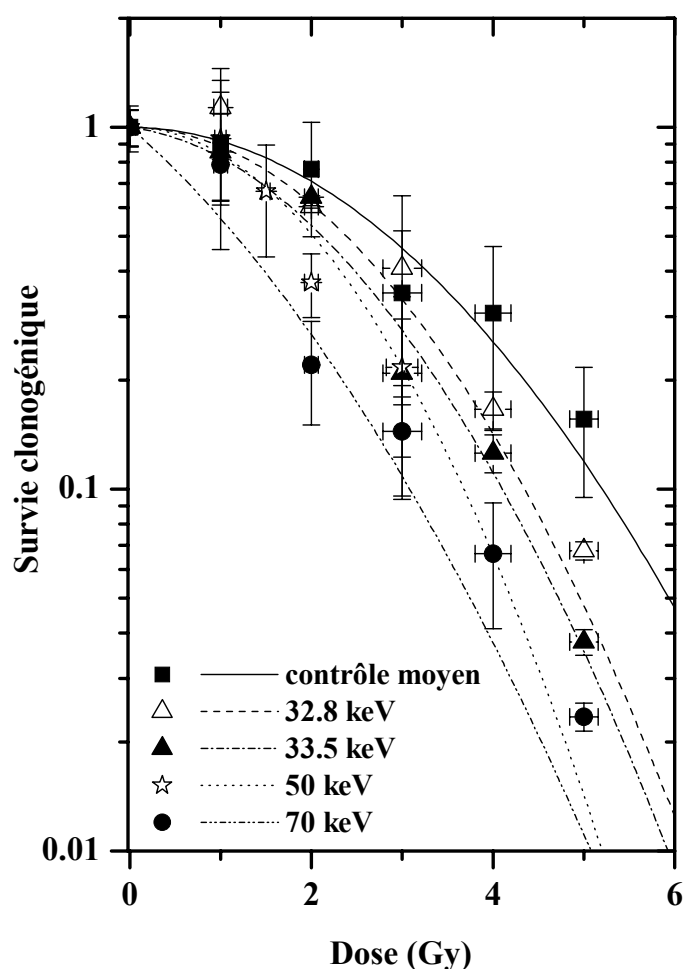


Figure V-23 : Courbes de survie des cellules SQ20B irradiées en présence d'Iomeron® dans leur milieu de culture (concentration d'iode : 10 mg.cm^{-3}) avec les RX d'énergie indiquée.

Le contrôle correspond aux cellules dont le milieu n'a pas été enrichi en agent de contraste pour l'irradiation, moyenné pour les 4 énergies d'irradiation. Les données représentées correspondent à une moyenne des survies obtenues pour trois expériences indépendantes. Le modèle linéaire quadratique a été ajusté aux données expérimentales. Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été considérés comme survivants. Les courbes ont été normalisées par rapport aux témoins non irradiés de chaque série. La survie spécifique moyenne des cellules SQ20B aux diverses expositions d'Iomeron® est de 90 %.

Ces résultats montrent que pour toutes les énergies de rayons X étudiées, l'iode présent dans le milieu de culture cellulaire contribue au renforcement de leur létalité. De plus, ce renforcement dépend du choix de l'énergie d'irradiation.

Nous avons comparé pour chaque énergie d'irradiation les valeurs des $SER^{10\%}$ calculés à partir des courbes de survie présentées ci-dessus⁴⁴ et les valeurs théoriques des DEF induits par la présence de 1% en masse d'iode dans un mélange aqueux. Les résultats sont présentés sur la figure suivante (Figure V-24).

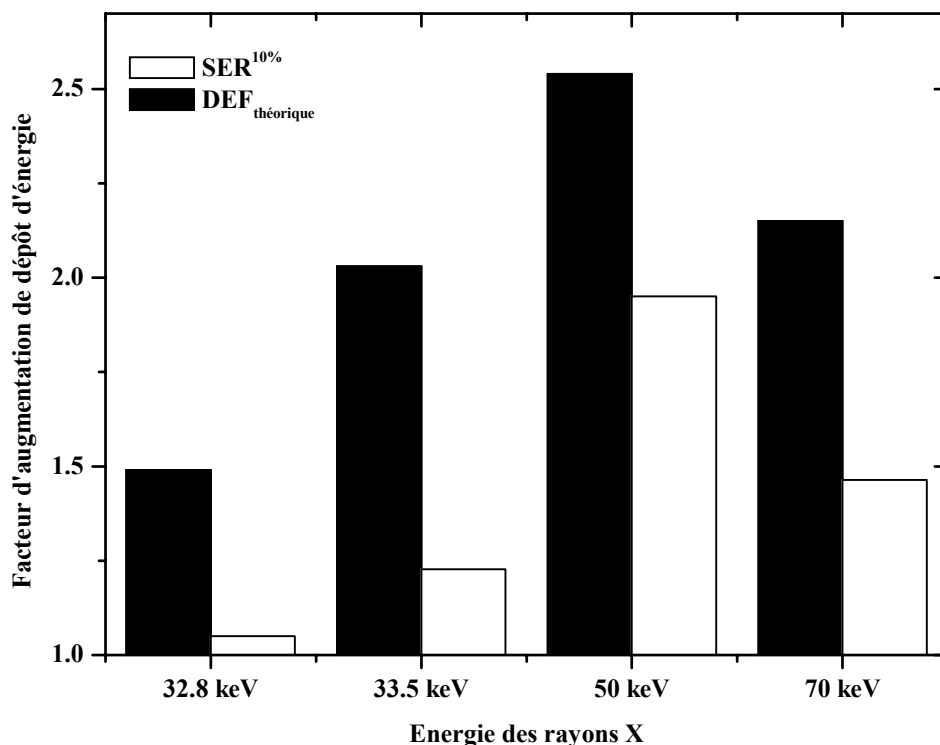


Figure V-24 : Comparaison des gains de dépôts d'énergie théorique et estimé par le calcul du $SER^{10\%}$ pour l'irradiation des cellules SQ20B à plusieurs énergies en présence de 10 mg/ml d'iode. (Iomeron®)

Ces résultats montrent que le gain de radiosensibilisation induit par la présence de 10 mg.ml⁻¹ d'iode dans le milieu de culture cellulaire dépend du choix de l'énergie d'irradiation. Ce facteur est maximum à 50 keV et il est minimum en dessous du seuil d'absorption K de l'iode. Le passage au-delà de ce seuil semble induire une légère augmentation de l'effet létal des rayons X, avec une augmentation du $SER^{10\%}$ de 1.05 à 1.23.

Ces résultats radiobiologiques suivent harmonieusement l'allure des variations théoriques du DEF correspondant en fonction de l'énergie. Celle-ci prédisait également un

⁴⁴ Nous attirons l'attention du lecteur sur le fait que les $SER^{10\%}$ ont été calculés par rapport aux contrôles de chaque énergie d'irradiation et non par rapport au contrôle moyenné sur les quatre énergies. Les survies

optimum aux alentours de 50 keV, ce qui est vérifié ici. Les facteurs d'augmentation de radiosensibilisation cellulaire sont toutefois systématiquement plus faibles que les gains de dose attendus : cette différence est minimale à 50 keV (30% d'écart) et maximale au-dessus du seuil K de l'iode (65% d'écart). L'origine probable de cette différence a été discutée précédemment.

V.2.2.3. Influence du débit de dose sur le gain d'énergie déposée

Le monochromateur d'angiographie a été utilisé pour augmenter d'un facteur 10 le débit de dose par rapport aux expériences précédentes. En déformant légèrement la courbure du monochromateur, un faisceau de 1 cm de haut a pu être obtenu au prix d'une perte de finesse de monochromaticité du faisceau (l'énergie d'irradiation était en l'occurrence de 52 ± 0.5 keV contre 50 ± 0.1 keV avec le monochromateur de tomographie). La largeur du faisceau a permis d'éviter la translation des échantillons cellulaires dans le faisceau puisque la dimension des cryotubes était inférieure. Toutefois ces derniers ont tout de même été maintenus en rotation constante, pour éviter le dépôt des cellules au fond des tubes.

La comparaison des résultats a été réalisée en terme de fraction de cellules survivantes à 2 Gy (SF_2), et de calcul des facteurs de radiosensibilisation pour deux critères de survie différents (10 et 80%). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-après, pour différentes concentrations d'iode (Tableau V-4).

Le multiplication par un facteur 10 du débit de dose conduit comme attendu (cf. Figure II-13 p.40) à une nette diminution de la proportion de cellules survivantes : celles-ci sont en moyenne deux fois moins nombreuses lorsqu'elles sont irradiées avec le débit de dose le plus important, et ce quelle que soit la quantité d'iode introduite dans le milieu de culture. Par contre, ces modifications dans les taux de survie ne modifient pratiquement pas les gains de radiosensibilisation engendrés par la présence d'iode dans le milieu de culture.

cellulaires des témoins non iodés présentent quelques différences en fonction de l'énergie d'irradiation et ce n'est que pour un confort visuel qu'elles ont été moyennées sur la Figure V-23.

Tableau V-4 : Comparaison des paramètres d'augmentation de radiosensibilisation mesurés pour les cellules SQ20B en présence d'Iomeron® dans le milieu de culture, en fonction du débit de dose. L'énergie d'irradiation était de 50 et 52 keV, respectivement pour le monochromateur de tomographie et d'angiographie.

		Monochromateur de tomographie	Monochromateur d'angiographie
	$\dot{F}_{cal}(mGy.mA^{-1}.s^{-1})$	2.5	25
	Hauteur faisceau	500 μm	10 mm
0 mg/ml d'iode	SF ₂	80 %	45 %
	SER ^{10%}	1	1
	SER ^{80%}	1	1
3 mg/ml d'iode	SF ₂	56 %	30 %
	SER ^{10%}	1.4	1.2
	SER ^{80%}	1.5	1.7
10 mg/ml d'iode	SF ₂	40 %	20 %
	SER ^{10%}	2	1.4
	SER ^{80%}	2	2
20 mg/ml d'iode	SF ₂	25 %	10 %
	SER ^{10%}	2.3	1.7
	SER ^{80%}	2.3	2.7

V.2.2.4. Interprétation du phénomène physique et de ses conséquences biologiques

Ces expériences ont permis de montrer que les cellules SQ20B sont plus sensibles aux rayons X de basses énergies lorsqu'elles sont irradiées en présence d'agent de contraste iodé. Cette radiosensibilisation augmente avec la quantité d'iode introduite, varie avec le choix de l'énergie d'irradiation mais ne dépend pas du débit de dose.

Les valeurs de radiosensibilisation cellulaire, estimées à partir de l'ajustement par le modèle linéaire quadratique des courbes de survie, suivent les variations en énergie du facteur théorique d'augmentation de dose, tout en les sous-estimant systématiquement. La valeur du SER dépend entre autres de la géométrie de l'irradiation, du taux de survie considéré et de la lignée cellulaire, données qui ne sont pas prises en compte dans notre approche simplifiée du DEF. Le simple fait de tenir compte des modifications de fluence photonique liées à l'auto-absorption des RX traversant l'épaisseur d'un tube de 1 cm de diamètre diminue les valeurs des DEF théoriques (au-dessus du seuil K de l'iode, le DEF passe ainsi de 2.03 à 1.65 en présence de 10 mg.cm⁻³ d'iode dans un mélange). Ces différences nous poussent à penser qu'une simulation plus fine des phénomènes physiques réduirait les différences observées.

V.2.3. Vers une application thérapeutique ?

Ces expériences radiobiologiques ont permis mettre en évidence une augmentation de l'effet létal de rayons X de basses énergies en présence d'iode dans le milieu de culture. Cet effet est provoqué par l'augmentation de dose liée à l'interaction de rayons X par effet photoélectrique sur cet élément, de numéro atomique élevé [Call79]. L'utilisation d'un rayonnement plus énergétique, γ par exemple, n'aurait pas conduit à des résultats similaires, ainsi que l'ont montré Matsudaira *et al.* [Mats80]. A ces énergies plus élevées, typiquement de l'ordre de grandeur de celles utilisées actuellement en radiothérapie externe, c'est l'effet Compton qui domine les processus d'interaction entre le rayonnement et la matière et cet effet ne varie que très peu avec le numéro atomique du matériau irradié. Cette équipe a utilisé un tube à rayons X de tension d'alimentation 200 kV_p pour prouver que 5% d'iode dans le milieu de culture modifiait la réponse cellulaire à une irradiation de basse énergie (en terme de survie cellulaire, de formation de micro noyaux et de cassures de brins de l'ADN), alors qu'aucun effet n'apparaissait pour une irradiation au ^{60}Co . A partir de leur courbes de survie, le SER^{10%} a été estimé à 2.24 pour 50 mg.cm⁻³ d'iode et une irradiation à 200 kV_p. De la même manière, des résultats comparables ont été obtenus par Dawson *et al.* [Daws87] avec un SER^{10%} estimé à 1.8 pour 20 mg.cm⁻³ d'iode et une irradiation avec un tube à rayons X de 250 kV_p. L'interpolation de leurs données pour 10 mg.cm⁻³ d'iode aurait conduit à un SER^{10%} de 1.3 environ. Ce facteur a été ramené à 2.25 grâce à l'utilisation d'un rayonnement encore moins énergétique, un tube à rayons X de 140 kV_p [Iwam87, Solb92a]. Toutefois cette dernière estimation ne provient pas de l'établissement de courbes de survies cellulaire mais du comptage de la fréquence des micro-noyaux formés après irradiation.

La démonstration expérimentale de l'augmentation de radiotoxicité due à la présence d'agents de contraste pendant une irradiation à basses et moyennes énergies a eu quelques retombées dans le monde du radiodiagnostic, avec la crainte d'effets mutagènes engendrés par la simple présence d'agent de contraste pendant un acte diagnostique [Adam77, Norm01, Norm78]. Toutefois les doses d'irradiation diagnostiques ne sont pas comparables avec les doses des irradiations thérapeutiques réalisées dans les travaux précédents.

Ces travaux ont également conduit à mettre au point une nouvelle technique de radiothérapie, appelée CTRx, en modifiant un scanner classique (tension de 140 kV_p) pour qu'il puisse délivrer des faisceaux de taille adaptable à celle des tumeurs. Un essai de phase I est en cours à Los Alamos sur des patients porteurs d'au moins deux tumeurs cérébrales [Rose99]. Le gain attendu est de pouvoir concentrer les isodoses autour de la tumeur chargée

en agent de contraste par interaction photoélectrique des rayons X d'énergie maximale 140 keV, bien mieux que ne le ferait un accélérateur linéaire de 10 MV, même en conditions stéréotaxiques [Mesa99].

Toutefois, la polychromaticité des tubes à rayons X conventionnels ne conduit pas une augmentation maximale du dépôt d'énergie (dégradation du spectre du faisceau en profondeur) tandis que le rayonnement synchrotron doit permettre de choisir précisément l'énergie préférable pour maximaliser la dose absorbée dans la tumeur chargée en agent de contraste par rapport aux tissus sains vierges [Solb01, Solb92b].

Nos résultats prouvent qu'un tel optimum d'énergie existe et que conformément aux calculs théoriques, il est situé à 50 keV. Même si les ordres de grandeur des facteurs de radiosensibilisation trouvés avec l'irradiation monochromatique apparaissent au premier abord similaires à ceux trouvés avec des rayonnements polychromatiques, nous rappellerons simplement que notre lignée est particulièrement radiorésistante et non apoptotique et que les comparaisons sont difficiles à interpréter entre lignées cellulaires différentes. De plus la monochromaticité du rayonnement synchrotron devrait permettre de réduire la dose absorbée par les os à l'entrée du patient [Rose99] et de délivrer une dose plus homogène dans la tumeur. Le dernier avantage du rayonnement synchrotron provient de l'existence de l'outil d'irradiation SRCT, qui en plus d'une imagerie en temps réel, assurerait une mesure précise des concentrations de l'agent de contraste présent dans la tumeur au moment de l'irradiation. Cette donnée nous semble essentielle à une bonne planification dosimétrique et n'est pas disponible sur les scanners conventionnels. A notre avis, l'utilisation d'un rayonnement purement monochromatique ne sera pas essentielle : une gamme d'énergies comprises entre 50 et 70 keV devrait permettre d'augmenter la fluence photonique sans toutefois dégrader les $DEF_{théoriques}$.

V.3. EFFICACITE BIOLOGIQUE DE L'INDUCTION PHOTONIQUE EXTERNE DE CASCADES D'ELECTRONS AUGER SUR UN HETEROATOME DE L'ADN

Une dernière approche de l'exploitation de l'effet photoélectrique pour augmenter l'énergie déposée consistait à optimiser la géométrie de l'irradiation à l'échelle *subcellulaire* pour tenter d'exploiter très spécifiquement la toxicité des électrons Auger de plus faible énergie. En véhiculant des atomes lourds au cœur même du système supposé à l'origine de la radiosensibilité cellulaire, l'ADN, et en se plaçant dans des conditions expérimentales telles que des électrons K soient arrachés du cortège électronique de l'hétéroatome, nous avons souhaité comprendre les mécanismes d'action biologique des événements de type K sur l'inactivation cellulaire et étudier leurs conséquences à l'échelle cellulaire, puis moléculaire. Deux agents vecteurs ont principalement été étudiés pour véhiculer ces atomes lourds au cœur de l'ADN : l'iodo-désoxyuridine et le cisplatine.

V.3.1. Mesure de l'impact sur la survie cellulaire de l'ionisation d'atomes d'iode portés par un nucléoside se substituant à la Thymidine de l'ADN et comparaison avec la présence d'iode extracellulaire

Notre objectif a été de déterminer *in vitro* l'effet cytotoxique sur la survie des cellules SQ20B d'une thérapie binaire associant le rayonnement synchrotron (d'énergie optimale, à déterminer) et l'iode, incorporé à l'aide d'un analogue de thymidine dans l'ADN, pendant sa phase de synthèse. L'agent pharmacologique a été mis en présence des cellules en croissance exponentielle dans du milieu de culture frais, à la concentration de 10 μM pendant deux temps de doublement de population (48 heures). Le choix de cette exposition découle de plusieurs travaux similaires reportés dans la littérature [Mil87a, Nath87]. Pour les cellules SQ20B, cette exposition correspondait au maximum tolérable pour une toxicité de l'agent pharmacologique très limitée. Les cellules ont été irradiées en suspension dans des tubes en rotation. Le choix de cette géométrie particulière ne se justifie pas particulièrement pour cette expérience, mais plutôt pour celle reportée dans la paragraphe précédent, avec laquelle nous souhaitions pouvoir comparer les résultats. Un essai d'association des deux agents pharmacologiques (10 μM d'IUdR pendant 48 heures ET 10 mg.cm^{-3} d'iode dans le milieu de culture) a été également testé. Un test de clonogénicité standard a été réalisé pour quantifier l'effet du traitement. Plusieurs énergies d'irradiation ont été utilisées : 400 eV en dessous et en dessus du seuil K de l'iode (33.17 keV), 50 et 70 keV. Les irradiations ont eu lieu dans

l'obscurité pour préserver la stabilité de l'IUdR, photosensible. Le mode de fonctionnement du synchrotron était le mode uniforme, avec une intensité variant de 200 à 170 mA. Le gap du wiggler a été réglé à 50 mm pour les trois premières énergies et 45 mm pour la dernière afin d'irradier l'ensemble des cellules avec un débit de dose identique (soit $2.5 \text{ mGy.mA}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Dans ces conditions, le débit de dose ne sera pas responsable d'une éventuelle différence de réponse des cellules à l'irradiation, dans le cadre de l'étude de l'effet du choix de l'énergie des RX.

V.3.1.1. Influence de l'énergie d'excitation sur le gain de radiotoxicité

Les courbes de survie des cellules SQ20B pré-traitées par $10 \mu\text{M}$ d'IUdR 48 heures avant les irradiations en rayonnement monochromatique sont présentées ci-dessous (Figure V-25). A notre connaissance, c'est la première fois que ce type d'irradiation en rayonnement synchrotron a été envisagé à d'autres énergies que celles situées de part et d'autre du seuil K de l'iode.

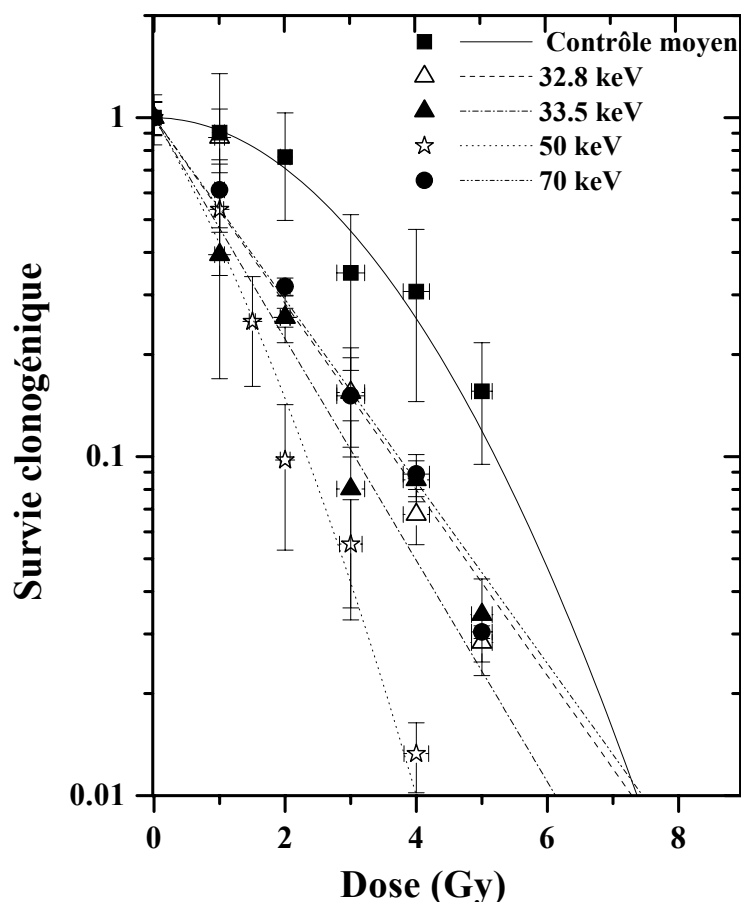


Figure V-25 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à $10 \mu\text{M}$ d'IUdR pendant 48 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, aux énergies indiquées.

Les contrôles (■) ont été incubés sans IUdR et leur survie aux différentes énergies moyennée. Les données représentées correspondent à une moyenne des survies obtenues pour trois expériences indépendantes. Le modèle linéaire quadratique a été ajusté aux données expérimentales. Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été considérés comme survivants. La normalisation des survies des cellules traitées à l'IUdR a été réalisée par

rapport au témoin non irradié mais exposé à l'agent pharmacologique, qui présentait une survie spécifique de 70 %

Ces résultats montrent une radiosensibilisation des cellules SQ20B lorsqu'elles sont pré-traitées avec 10 μM d'IUdR pendant 48 heures. L'efficacité de cette radiosensibilisation dépend du choix de l'énergie d'irradiation. A 32.8 et 70 keV, les effets létaux de l'association de l'IUdR et du rayonnement sont à peu près semblables et moindres qu'à 33.5 et 50 keV. Cette dernière énergie correspond au maximum d'effet observé.

La forme des courbes de survie de cellules pré-traitées par 10 μM d'IUdR pendant 48 heures ne présente pas d'épaulement, contrairement aux courbes de survie obtenues dans des conditions expérimentales semblables, avec 10 mg.cm^{-3} d'iode sous forme d'agent de contraste (cf. Figure V-23 p.225).

Cette particularité rend le calcul du $\text{SER}^{S\%}$ encore plus dépendant du choix du taux de survie S pour l'estimation de l'efficacité de la radiosensibilisation. A titre d'illustration, nous avons reporté ci-dessous les valeurs du SER calculées à partir des courbes de la figure précédente, pour différents taux de survie S.

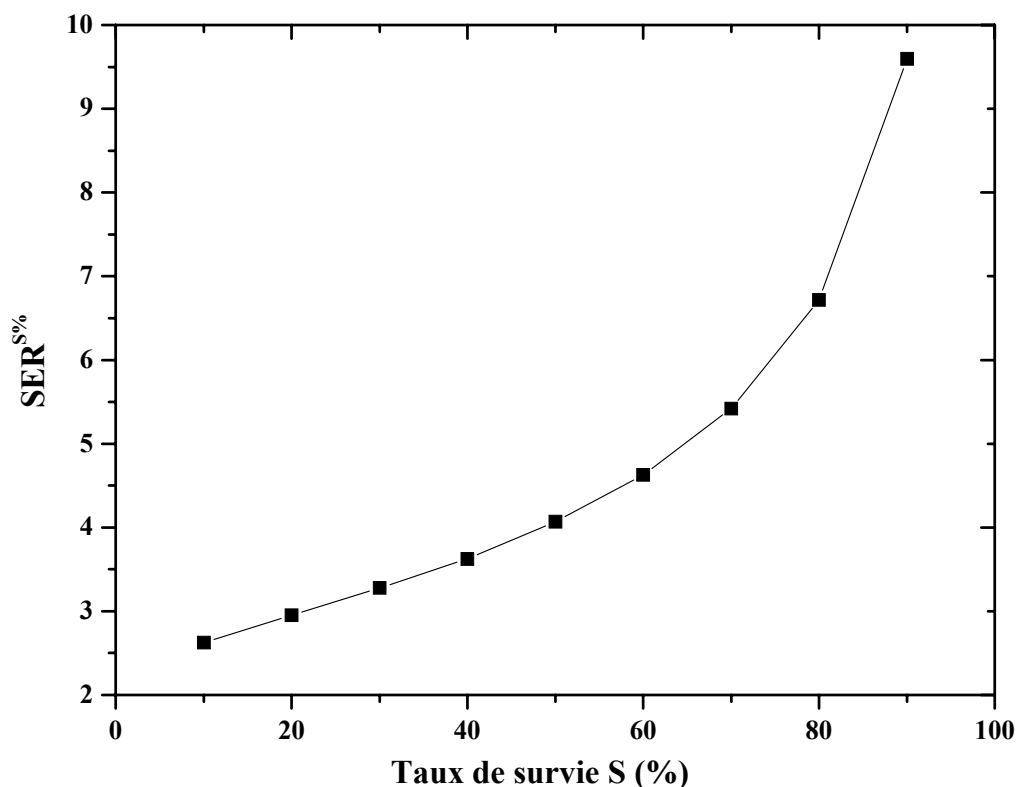


Figure V-26 : Variation du facteur de radiosensibilisation cellulaire en fonction du taux de survie de référence. Exemple pour la courbe de survie cellulaire des SQ20B pré-traitées avec 10 μM d'IUdR pendant 48 heures et irradiées à 50 keV, comme les contrôles.

Nous constatons qu'à 50 keV, si le facteur de radiosensibilisation est égal à 2.62 pour le taux de survie de 10%, il atteint la valeur de 9.6 à 90% de survie, c'est à dire aux faibles doses de rayonnement.

V.3.1.2. Comparaison avec l'agent de contraste iodé

En conservant la grandeur $SER^{10\%}$ comme critère de comparaison de l'efficacité radiobiologique des différentes associations de traitements, l'effet létal de l'exposition des cellules SQ20B à 10 μ M d'IUdR pendant 48 heures a été comparé à celui de la mise en présence de 10 mg/ml d'iode dans leur milieu de culture, pendant les irradiations aux différentes énergies (Figure V-27). Une fois encore, ces facteurs ont été calculés par rapport au témoin non traité, et irradié à la même énergie.

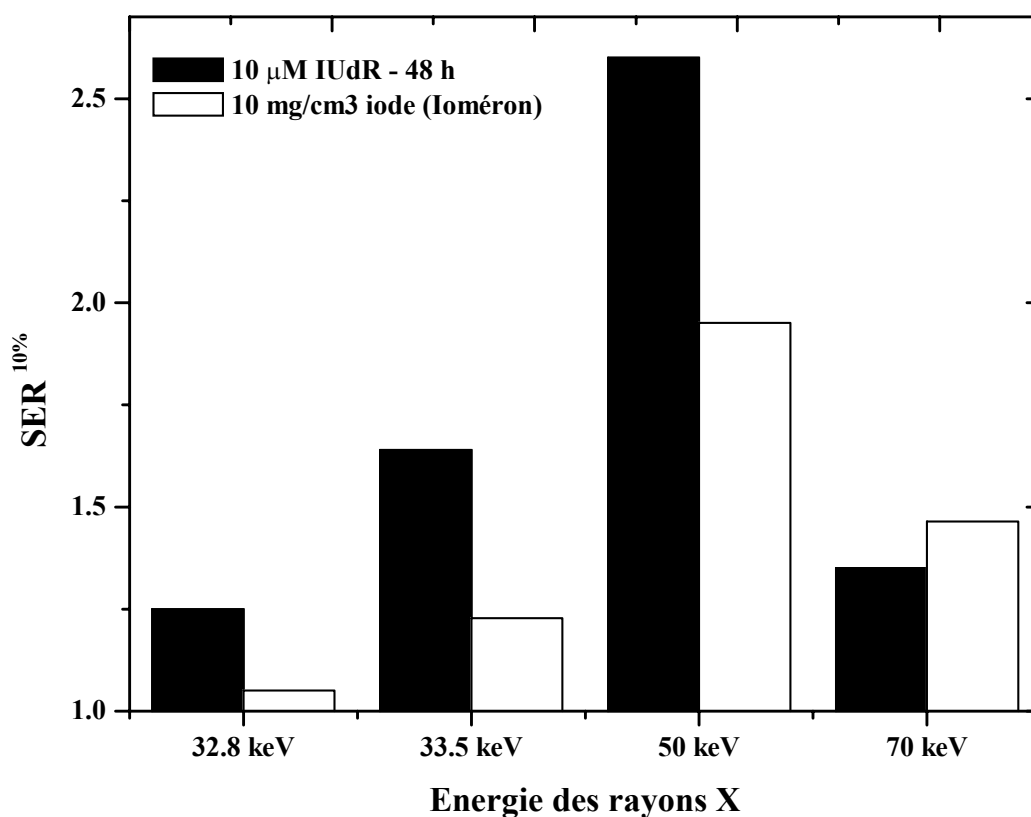


Figure V-27 : Comparaison de l'efficacité respective de l'effet sur la radiosensibilité cellulaire de 10 μ M d'IUdR appliqué pendant 48 heures ou de 10 mg/cm³ d'iode (Iomeron®) rajouté dans le milieu de culture. Le critère de comparaison a été le taux de survie de 10% de la population cellulaire

Ces résultats montrent qu'à l'exception de l'énergie d'irradiation de 70 keV, le pré-traitement des cellules SQ20B par 10 μ M d'IUdR pendant 48 heures rend ces cellules plus sensibles au traitement que le rajout de 10 mg/ml d'iode dans leur milieu de culture. L'augmentation de sensibilité liée à la présence de l'iode dans l'ADN plutôt que dans le

milieu extra-cellulaire est de 30% à 50 et 33.5 keV, contre 20% à 32.8 keV. En revanche, à 70 keV, l'agent de contraste iodé est 8% plus efficace que l'IUdR.

V.3.1.3. La combinaison des deux traitements pharmacologiques conduit à une supra-additivité des radiosensibilisations

La différence de formes des courbes de survie obtenues pour la combinaison de l'irradiation en rayonnement monochromatique pouvait suggérer une différence de mode d'action des deux traitements, l'efficacité des deux traitements combinés a été testée, pour les énergies situées de part et d'autre du seuil K de l'iode et 70 keV. Sur la figure ci-dessous (Figure V-28), les $SER^{10\%}$ mesurés à partir des courbes de survie obtenues pour les cellules SQ20B dans ces conditions ont été reportés et comparés à l'effet attendu dans l'hypothèse d'une simple additivité de l'efficacité des traitements pris indépendamment.

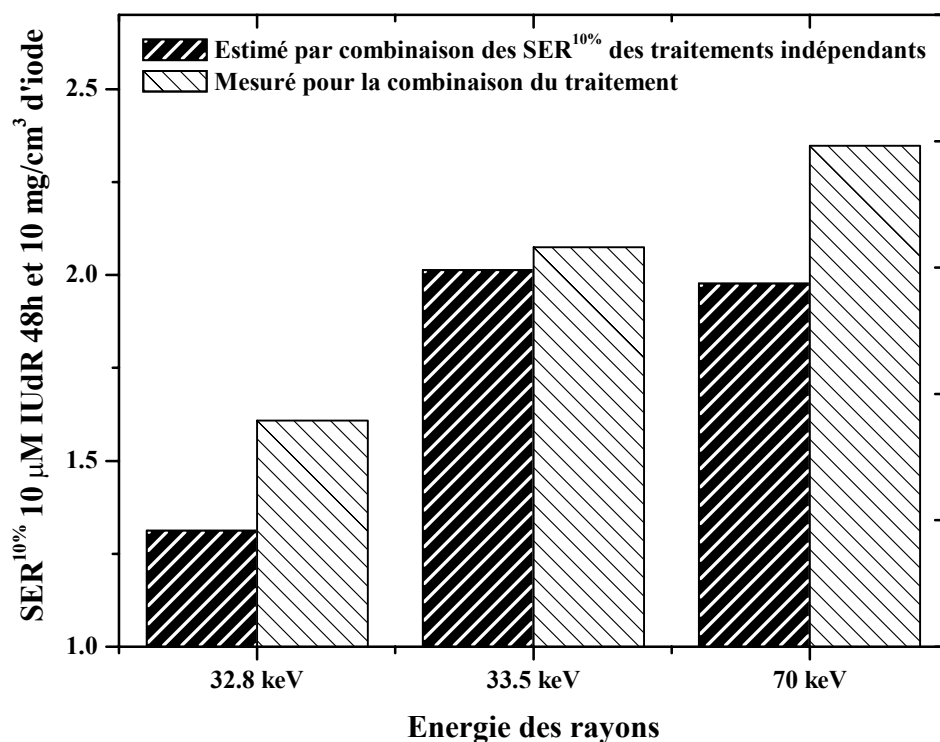


Figure V-28 : L'association du pré-traitement des cellules SQ20B par 10 μ M d'IUdR pendant 48 heures et de leur irradiation dans un milieu de culture enrichi par 10 $mg.cm^{-3}$ d'iode (Iomeron®) conduit à une létalité cellulaire plus grande que l'association des effets pris indépendamment

Ces résultats montrent que l'efficacité des deux combinaisons de traitements pourrait être supra-additive. Cette constatation pourrait indiquer la création de dégâts différents à l'échelle moléculaire.

V.3.1.4. Quel intérêt thérapeutique ?

L'IUdR est un composé connu pour sensibiliser les cellules de mammifères aux dégâts générés par les rayonnements ionisants, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Grâce à une structure chimique analogue à celle de la thymidine de l'ADN, l'IUdR est capable de s'y substituer et donc de s'incorporer à l'ADN cellulaire pendant sa phase de synthèse. Nécessitant une activité de prolifération cellulaire, ce composé pourrait être capable de cibler préférentiellement les tumeurs à vitesse de prolifération rapide. Afin d'éviter la fixation de l'IUdR marqué avec un émetteur Auger radioactif sur l'ensemble des tissus sains qui se renouvellent rapidement, l'idée de déclencher par un rayonnement externe l'ionisation d'atomes d'iode stable a été étudiée par Fairchild *et al.* qui ont évalué que le facteur de sensibilisation pouvait être compris entre 1.5 et 3 selon que 10 ou 50% de bases thymidine étaient remplacées par de l'iode [Fair82]. Le mécanisme de radiosensibilisation de l'IUdR n'est pas encore entièrement élucidé mais il est possible qu'il détériore la structure de l'ADN [Ilia89] ou qu'il diminue la capacité de réparation des lésions [Wang92, Wang94].

Si l'utilisation de l'IUdR en essais cliniques avec des rayonnements très énergétiques (supérieurs au mégavolt) n'a donné que des résultats mitigés [Epst92], la thérapie par activation photonique (PAT) proposée par Fairchild et Bond [Fair84] repose non seulement sur l'utilisation de l'IUdR mais également sur l'idée qu'une énergie d'excitation optimale existe. La prédominance de l'effet photoélectrique pour les basses énergies de rayons X et la présence des seuils d'absorption a conduit à penser que l'énergie optimale était celle située juste au-dessus du seuil K de l'iode. Les travaux de Laster *et al.* ont montré qu'à cette énergie-là, la dose nécessaire pour produire un taux survie cellulaire de 10% des cellules de hamster V79 est trois fois moindre que pour les contrôles non traités et 1.4 fois moindre que pour les cellules traitées à l'IUdR et irradiées juste en dessous du seuil K. Ces résultats apparaissent être les plus satisfaisants d'une série de travaux dont les objectifs, plus que les méthodes, étaient identiques. Un gain de sensibilisation de 1.8 a ainsi été observé par Shinohara *et al.* avec 20% de substitution de base thymidine par l'iode et une irradiation avec des photons γ du ^{60}Co . Une étude avec du ^{137}Cs et une quantité similaire d'iode a donné des résultats comparables [Fair85]. Ce facteur a été trouvé égal à 1.5 par Nath *et al.* avec des RX de 250 kVp.

A l'instar de Karnas *et al.* [Karn99], nous nous sommes interrogés sur la pertinence du choix de l'énergie optimale d'irradiation. Si celle située juste en dessous du seuil K de l'élément ciblé est certes celle qui assurera la création d'un événement K avec un maximum

de probabilité, nos calculs semblaient indiquer que l'essentiel est avant tout de créer un maximum d'effet différentiel par rapport aux tissus non enrichis en agent lourd. Le comportement des cellules non traitées par l'agent pharmacologique est donc à prendre en considération. Si le calcul théorique du DEF macroscopique lié à la présence de $10\text{ }\mu\text{M}$ d'iode ($1.3\text{ }\mu\text{g.cm}^{-3}$) dans une solution d'eau conduirait à des valeurs très proches de l'unité, un calcul à l'échelle microscopique, tel qu'il a été proposé par Karnas, semble conduire à des grandeurs plus proches de la réalité. En considérant l'apport micro dosimétrique des atomes d'iode par rapport à la masse de l'ADN, ces auteurs s'attendaient à trouver un facteur d'augmentation compris entre 2 et 3 à 50 keV, respectivement pour 10 et 20% de taux de substitution de bases thymidine par l'ADN.

D'après les données rapportées par d'autres auteurs, l'exposition de cellules en croissance exponentielle à $10\text{ }\mu\text{M}$ d'IUdR doit vraisemblablement conduire à des taux de substitution très proches, typiquement entre 10 et 20% [Last93].

Nos résultats confirment donc la validité des calculs de Karnas. Leurs expériences n'ont pu être mises en œuvre en rayonnement synchrotron du fait du manque d'accessibilité de ce type de technologie ; par contre les $\text{SER}^{1\%}$ atteignaient, pour une exposition des cellules CHO à $10\text{ }\mu\text{M}$ d'IUdR pendant 3 jours, les valeurs de 1.8 avec un spectre de rayons X de moyenne énergie (100 kVp) et 1.4 à basse énergie (30 kVp). Par filtration au tungstène du faisceau 100 kVp, le $\text{SER}^{1\%}$ a été évalué à 2.7, ce qui correspondait à leur estimation théorique pour un taux de substitution de bases thymidine de l'ADN par l'analogue iodé de 18%.

En rayonnement monochromatique, le $\text{SER}^{10\%}$ mesuré à 50 keV est de 2.62 pour une exposition des cellules SQ20B à $10\text{ }\mu\text{M}$ d'IUdR pendant 2 jours. Cette énergie correspond au maximum expérimental de radiosensibilisation. En effet, même si le $\text{SER}^{10\%}$ augmente légèrement au delà du seuil K (de 1.25 à 1.64), ces facteurs restent environ deux fois plus faibles que ceux trouvés par Laster *et al.* [Last93] et de plus ne correspondent pas à l'optimum énergétique.

Le fait que la radiosensibilisation des cellules SQ20B dépende de l'énergie du rayonnement monochromatique semble prouver que cette action découle d'un effet photoélectrique sur les atomes d'iode de l'ADN, préférentiellement à une action sensibilisatrice intrinsèque de l'IUdR, dont la dépendance en énergie semble plus difficile à justifier.

Les courbes de survie des cellules SQ20B pré-traitées avec $10\text{ }\mu\text{M}$ d'IUdR pendant 48 heures et irradiées à 50 keV présentent une forme caractéristique d'une irradiation avec un

rayonnement à fort TEL (typique notamment des électrons Auger), ce qui conduit à une très nette augmentation du SER pour les faibles doses de rayons X. Ainsi pour un taux de survie d'intérêt de 90%, la radiosensibilisation est près de dix fois plus importante pour les cellules traitées à l'IUdR et irradiées à 50 keV par rapport aux cellules de contrôle. Ceci est potentiellement intéressant dans la perspective d'une irradiation multifractionnée à faible dose.

La comparaison de l'efficacité létale de l'irradiation par rayonnement monochromatique combinée avec une administration d'iode, substituant l'ADN ou extracellulaire, a montré que l'IUdR est, jusqu'à 50 keV, 30% plus efficace que la présence de 10 mg.cm^{-3} d'iode dans le milieu de culture (Iomeron[®]). Pour une énergie plus importante, la tendance s'inverse, peut-être en raison d'une énergie trop importante des photoélectrons qui ne peuvent plus être localement létaux du fait d'un parcours trop important.

Toutefois il est intéressant de constater que les modes d'action de l'IUdR de l'agent de contraste iodé sont plus que cumulatifs. Il est dommage que l'énergie 50 keV n'ait pas été testée dans le cadre de cette comparaison, mais si les règles d'additivité sont vérifiées également à cette énergie, on pourrait s'attendre à un $\text{SER}^{10\%}$ de 4.6 ou plus. Cette supra-additivité peut être une évidence supplémentaire de l'efficacité biologique des cascades d'électrons Auger induites par stimulation externe sur des atomes d'iode situés dans l'ADN : l'absence d'épaulement des courbes de survie avec IUdR indiquerait un défaut de réparation des lésions plus complexes tandis que les courbes de survie avec agent de contraste iodé pourraient être expliquées par la création d'un simple surnombre de cassures simple et double brins. L'association des deux serait ainsi plus létale que chaque effet pris indépendamment.

La toxicité intrinsèque de l'IUdR est relativement faible puisque la survie spécifique à une exposition de 10 μM pendant 48 heures est de 70% pour les cellules SQ20B. Malgré quelques réserves apparues dans la littérature quant à l'intérêt thérapeutique de l'activation photonique externe de l'IUdR, [Humm88a, Humm88b, Mil87a, Mil87b], les gains mesurés *in vitro* grâce à une irradiation en rayonnement monochromatique sont très encourageants. Ils permettent assurément de relancer le débat, d'autant plus que deux éléments nouveaux peuvent intervenir dans la discussion : en combinant les approches micro- et macroscopiques (iode dans ADN et en dehors de la cellule), le gain thérapeutique total peut encore être amélioré. Et 33.5 keV n'est pas forcément l'énergie optimale...

Cette étude a été réalisée en référence aux travaux originaux de Laster *et al.* qui prouvaient que l'énergie située juste au-dessus du seuil K était l'énergie optimale d'activation de l'iode stable dans l'ADN [Last93]. Sans nous attendre à trouver de meilleurs résultats pour

des énergies plus élevées avec l'IuDR, nous avons voulu tester la stimulation d'un élément lourd de numéro atomique plus élevé, afin d'atteindre des énergies d'irradiations plus compatibles avec une perspective d'application clinique, où les volumes traités sont souvent situés en profondeur. D'où notre intérêt pour le platine, dont l'énergie du seuil K, 78.39 keV semblait plus en accord avec cet objectif.

V.3.2. Effets biologiques de l'activation résonante d'atomes de platine incorporés dans l'ADN sous forme de Cisplatine

Le cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) a été utilisé dans le cadre de cette étude car il présentait le double avantage d'être un agent à comportement alkylant [Reed92] et de vectoriser des atomes de platine directement au cœur de l'ADN. Le seuil d'absorption K du platine étant situé à 78.39 keV [Hubb97], cette énergie de stimulation externe d'un renforcement d'effet photoélectrique intratumoral nous a semblé compatible avec une éventuelle application chez l'homme. Si la possibilité de combiner les actions spécifiques d'une drogue de chimiothérapie et la radiotoxicité des électrons Auger a déjà été suggérée dans la littérature [Howe94], les difficultés d'étude du gain thérapeutique total sont en général liées à la toxicité de ces agents cytotoxiques. Plusieurs critères d'étude d'efficacité du traitement ont donc dû être abordés pour appréhender les conséquences de l'activation résonante au seuil K de atomes de platine liés à l'ADN : survie radiobiologique, mesure de l'augmentation des taux de cassure de brins produites, cinétiques de leur réparation, identification des voies empruntées par la cellule pour réparer les lésions moléculaires. Ces études ont principalement porté sur le traitement par le CDDP des cellules SQ20B, lignée particulièrement radorésistante et qui de plus ne présentait pas une forte affinité pour cette drogue. D'autres modèles ont également été envisagés, tels que l'utilisation de substituts platinés moins toxiques pour les cellules ou de lignées cellulaires moins sensibles au CDDP ou plus à même, par leur statut génétique, de répondre aux dommages létaux générés.

V.3.2.1. Absence d'effet du platine sur la forme des courbes de survie cellulaire

Le premier critère d'étude de l'efficacité du traitement combinant les effets du CDDP et de l'irradiation au-dessus ou en dessous du seuil K du platine a été la survie cellulaire. Des tests de clonogénicité ont donc été réalisés après irradiation des cellules SQ20B et la survie cellulaire a été estimée par comptage du nombre de clones survivants après repiquage à faible densité d'inoculation. Un clone fut considéré comme survivant s'il contenait plus de 50

cellules et l'utilisation d'un logiciel de comptage semi-automatique assisté par ordinateur a permis de standardiser ce dénombrement et diminuer le manque de reproductibilité inter et intra-observateur.

V.3.2.1.1. Relations dose-effet

Le protocole expérimental choisi pour irradier les échantillons cellulaires a conduit à des irradiations souvent longues : l'irradiation des cellules en monocouches et en inhibition de contact (plateau phase) dans des flacons de culture, de dimensions importantes en comparaison de la hauteur du faisceau de 1 mm environ, (cf. Figure IV-38 p.166), permettait de limiter la rudesse de la séance d'irradiation et de s'assurer du maintien de la quiescence des cellules, mais a conduit à des débits de dose vus par les cellules plutôt faibles. Par exemple pour une vitesse de translation de 12.5 mm.s^{-1} et une hauteur de faisceau de 1 mm, le facteur de calibration était d'environ $0.15 \text{ mGy.mA.scan}^{-1}$ tandis que le débit de dose absorbée en mode statique pour une intensité dans l'anneau de stockage de 180 mA était de 15 Gy.min^{-1} , ce qui correspondait à une fluence dans l'air de $4.3 \times 10^9 \text{ photons.s}^{-1}.\text{mm}^{-2}$ pour 100 mA.

Notre première approche a donc consisté à vérifier que, sans traitement au cisplatine, l'allure des courbes de survie des cellules SQ20B irradiées dans ces conditions correspondait bien à celle obtenue avec un rayonnement de référence. Pour les deux énergies elles ont pu être ajustées au modèle linéaire-quadratique (Figure V-29). Les valeurs des coefficients α et β calculés sont respectivement 0.172 Gy^{-1} et 0.0384 Gy^{-2} .

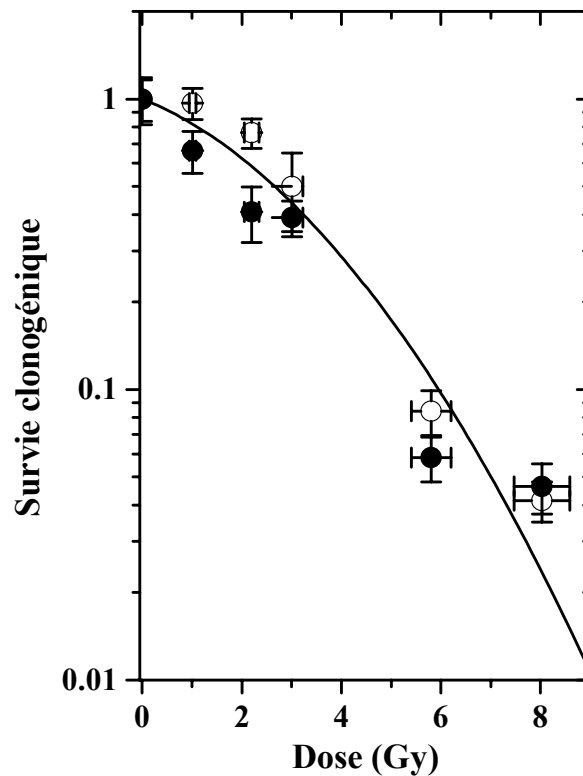


Figure V-29 : Courbes de survie des cellules SQ20B non traitées au CDDP et irradiées au-dessus (●) ou en dessous (○) du seuil d'absorption K du platine (78.39 keV). Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été pris en considération et chaque barre d'erreur représente l'écart type de la survie calculée avec 6 boîtes de Pétri. Les données ont été ajustées au modèle linéaire-quadratique : $S/S_0 = \exp(-0.172 D - 0.0384 D^2)$

Sans irradiation, la chimiotoxicité du cisplatine a réduit la survie clonogénique des cellules SQ20B. Leur survie spécifique n'était plus que de 66% pour une exposition au CDDP de 0.1 μM pendant 48 heures et cette valeur a été réduite à 17% pour une exposition de 1 μM pendant 1 heure. Inversement la toxicité intrinsèque du CDDP est donc respectivement de 34% et 83%. En normalisant les courbes de survie obtenues avec cette toxicité intrinsèque sans irradiation, celles-ci ne présentent aucun effet d'augmentation de radiotoxicité du rayonnement dont l'énergie est située juste au-dessus du seuil K en comparaison du rayonnement dont l'énergie est légèrement inférieure. Aucune différence d'allure de courbe de survie n'apparaît entre les différents groupes traités ou non, que ce soit avec la plus faible exposition (0.1 μM pendant 48 heures) ou la plus forte qu'il nous ait été possible de tester (1 μM pendant 12 heures) (Figure V-30 et Figure V-31).

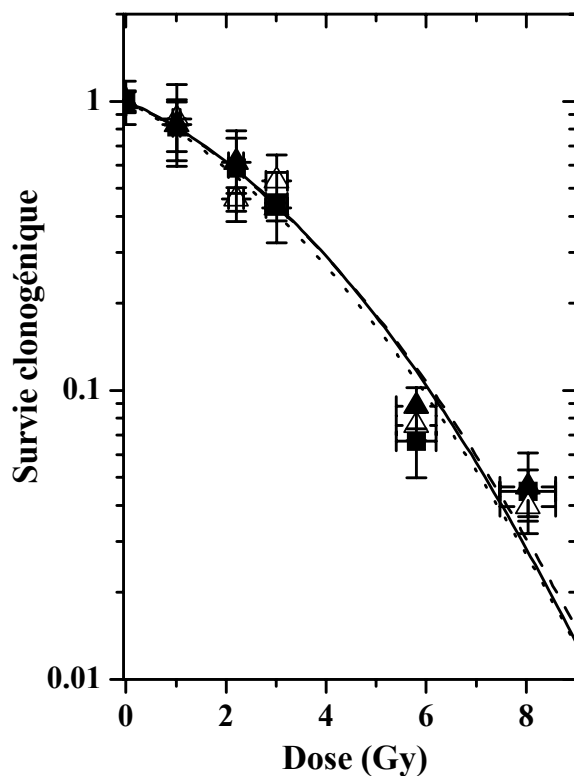


Figure V-30 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à 0.1 μ M de CDDP pendant 48 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, d'énergie située 400 eV au-dessus (▲) ou en dessous (△) du seuil d'absorption K du platine. Les contrôles (■) ont été incubés sans CDDP.

Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été considérés comme survivants. La normalisation des survies des cellules traitées au CDDP a été réalisée par rapport au témoin non irradié mais exposé à la drogue, qui présentait une survie spécifique de 66%.

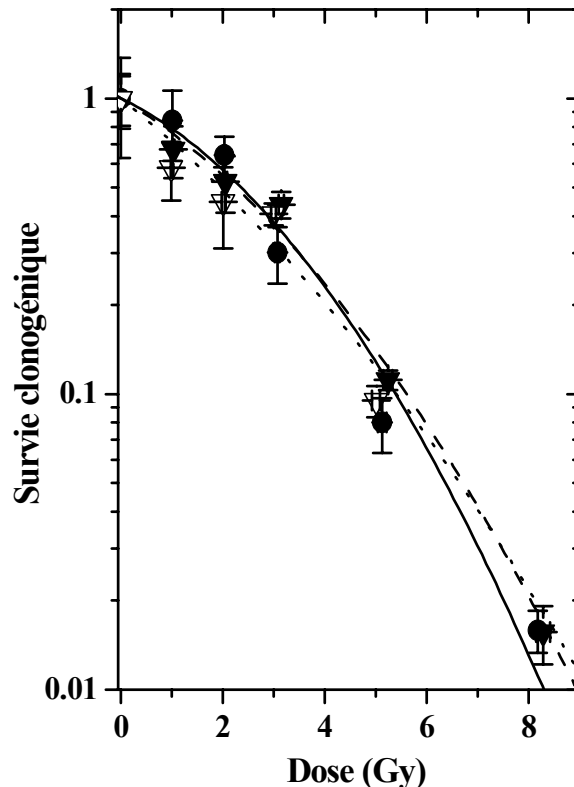


Figure V-31 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à 1 μ M de CDDP pendant 12 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, d'énergie située 400 eV au-dessus (▼) ou en dessous (▽) du seuil d'absorption K du platine. Les cellules de contrôle (●) ont été incubées sans CDDP.

Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été considérés comme survivants. La normalisation des survies des cellules traitées au CDDP a été réalisée par rapport au témoin non irradié mais exposé à la drogue, qui présentait une survie spécifique de 17%.

V.3.2.1.2. Cytométrie en flux

Au début de la procédure d'irradiation, les populations cellulaires étaient confluentes et distribuées de la manière suivante dans les différentes phases du cycle cellulaire : 70% des cellules en G0-G1, 15% en phase S et 15% en phase G2-M. Pendant la procédure d'irradiation des échantillons cellulaires (qui durait entre 0.5 et 6.5 heures selon la dose d'irradiation et qui était pratiquée à température ambiante dans du milieu de culture complété par du tampon de remplissage HBSS), ainsi que pendant la période de réparation des lésions potentiellement létales (PLDR) cette distribution a légèrement évolué, avec 5 % d'augmentation de la proportion de cellules en phase S de synthèse de l'ADN (Tableau V-5).

Tableau V-5 : Distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire à différents moments de leur irradiation en rayonnement synchrotron, pour les cellules traitées avec 0.1 μ M de CDDP pendant 48 heures et les contrôles (0.1 μ M CDDP pendant 48h)

État de l'échantillon	G0-G1 (%)	S (%)	G2-M (%)
Contrôles			
<i>Fin de culture cellulaire</i>	75.0	11.0	14.0
<i>Au moment de l'irradiation</i>	69.5	15.5	15.0
<i>Après l'irradiation</i>	70.0	16.3	13.7
<i>Après PLDR</i>	65.5	14.0	21.0
Cellules exposées à 0.1 μ M de CDDP pendant 48 heures			
<i>Fin de culture cellulaire</i>	66.0	18.8	15.2
<i>Au moment de l'irradiation</i>	64.4	19.5	16.1
<i>Après l'irradiation</i>	63.3	20.4	16.3
<i>Après PLDR</i>	66.0	14.0	20.0

Cette petite redistribution peut tout au plus réduire légèrement la radiosensibilité des cellules traitées au cisplatine. Par conséquent, la redistribution des cellules au cours de ces longues expériences n'est pas capable de mimer un éventuel effet Auger sur la survie cellulaire. Pour la plus forte exposition de CDDP, aucune redistribution des cellules ne s'est produite pendant l'exposition à la drogue (Tableau V-6).

Tableau V-6 : Distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire à différents moments de leur irradiation en rayonnement synchrotron, pour les cellules traitées avec 1 μ M de CDDP pendant 12 heures et les contrôles

État de l'échantillon	G0-G1 (%)	S (%)	G2-M (%)
Contrôles			
<i>Fin de culture cellulaire</i>	67.5	11.5	21.0
Cellules exposées à 1 μ M de CDDP pendant 12 heures			
<i>Fin de culture cellulaire</i>	64.8	11.9	23.3

V.3.2.1.3. Corrélation entre la chimiotoxicité du cisplatine, le contenu intracellulaire et la répartition subcellulaire du platine

En choisissant une drogue de chimiothérapie, le cisplatine, pour véhiculer un atome lourd directement au cœur de l'ADN, la principale difficulté a été de réaliser un compromis entre la chimiotoxicité cellulaire intrinsèque de la drogue et les quantités de platine incorporées dans la cellule. La connaissance de ce dernier paramètre était bien évidemment essentielle pour notre étude. Nous avons corrélé les quantités de platine intracellulaire mesurées par spectrométrie de masse à la toxicité intrinsèque de l'exposition au cisplatine testée sur la lignée cellulaire SQ20B (Tableau V-7).

Tableau V-7 :Contenu intracellulaire de platine, mesuré par ICP-MS, en fonction de l'exposition des cellules SQ20B au cisplatine et de sa toxicité.

Exposition au cisplatine	Survie spécifique (%)	Nombre d'atomes de platine par cellule
0.1 μ M pendant 48 heures	66	0.07×10^6
3 μ M pendant 6 heures	25	4.0×10^6
1 μ M pendant 12 heures	17	4.5×10^6
10 μ M pendant 6 heures	0.8	7.5×10^6
3 μ M pendant 12 heures	0.4	9.0×10^6

La plus forte exposition au cisplatine qu'il a été possible d'étudier pour comparer la radiotoxicité relative d'irradiations faites au-dessus et en dessous du seuil K du platine a été de 1 μ M pendant 12 heures. Pour cette exposition, seules 17 % des cellules traitées par le CDDP étaient survivantes 15 jours après l'irradiation et le nombre moyen d'atomes de platine incorporés par cellule était de 4.5×10^6 . Pour la plus faible exposition de cisplatine testée, i.e. 0.1 μ M de CDDP pendant 48 heures, l'incorporation de platine dans les cellules était 65 fois plus faible mais la survie cellulaire 4 fois plus importante. Ces résultats montrent qu'une bonne corrélation existe entre la toxicité intrinsèque du CDDP sur les cellules SQ20B et le contenu intracellulaire de platine (Figure V-32).

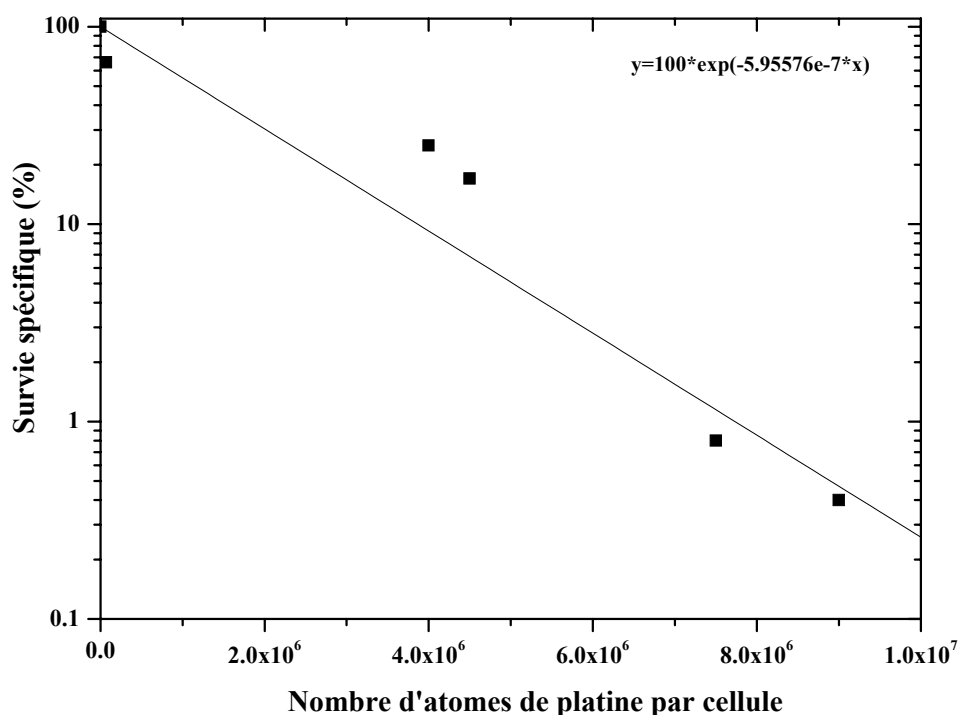


Figure V-32 : Corrélation entre la toxicité de l'exposition des cellules SQ20B au cisplatine et le contenu intracellulaire de platine, mesuré par ICP-MS

Ci-dessous sont présentées des cartographies bi-dimensionnelles de la distribution subcellulaire de quelques éléments traces constitutifs de la cellule et du platine incorporé après exposition de cellules SQ20B à 100 μ M de CDDP pendant 6 heures (Figure V-33). Cette exposition, plus forte que celles utilisées pour nos études sur la survie cellulaire, a été choisie après plusieurs tests et correspondait à la plus faible quantité de platine détectable par la technique d'imagerie SR-XRF sur cellule unique.

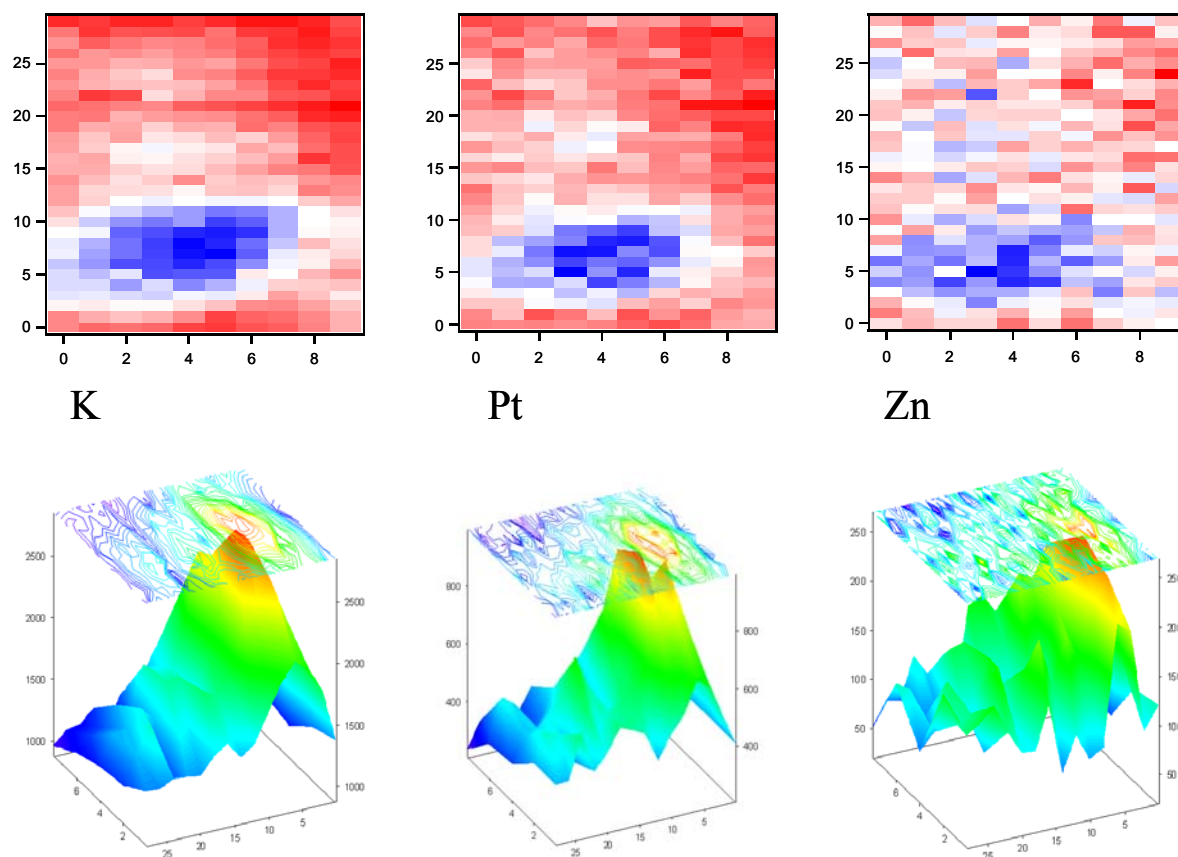


Figure V-33 : Cartographies de l'intensité du rayonnement de fluorescence mesuré pour les éléments potassium, platine et zinc. Mesures réalisées par SR-XRF sur une unique cellule SQ20B traitée avec 100 μM de CDDP pendant 6 heures. La taille de la matrice d'acquisition est de 30 x 30 μm^2 et la taille du pixel de 1 μm (vertical) x 3 μm (horizontal). Le temps d'intégration par point est de 100 secondes.

Les éléments traces tels que le phosphore, le soufre, le chlore, le potassium, le fer, le zinc, le cuivre et le platine ont été détectés. Puisque la distribution de potassium est représentative de l'architecture cellulaire et puisque l'imagerie SR-XRF de la répartition subcellulaire du platine est étroitement corrélée à celle du potassium, nous pouvons déduire de ces cartographies des éléments traces que le platine était localisé dans le noyau cellulaire.

V.3.2.1.4. Proposition d'interprétation

Les courbes de survie obtenues après irradiation par rayonnement monochromatique autour de 78.39 keV, à faible débit de dose (de l'ordre de 1 cGy/scan), après exposition prolongée à température ambiante (entre 0.5 et 6.5 heures) et après PLDR, possèdent la même forme et pratiquement les mêmes paramètres α et β que ceux obtenus après une irradiation plus conventionnelle sous un tube à rayons X classique (cf. Figure IV-37 p.162). Par conséquent, ces conditions d'irradiation, même si elles semblent très éloignées des conditions habituelles, conduisent à un comportement radiobiologique normal [Dahl92].

Les données de cytométrie en flux montrent qu'aucune redistribution significative des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire ne se produit pendant toute la durée de l'irradiation et ceci indépendamment du traitement au cisplatine. Ces vérifications nous permettent d'affirmer que le stress du processus expérimental lui-même ne pourra pas être à l'origine de différences observées dans la réponse des cellules aux diverses associations de traitements.

Deux niveaux d'exposition au cisplatine ont été testés, en l'occurrence 0.1 μM de CDDP pendant 48 heures et 1 μM pendant 12 heures. Malheureusement, même pour la plus forte exposition, aucune différence de taux de survie n'est apparue entre les irradiations d'énergies légèrement supérieure et inférieure au seuil d'absorption K du platine. Il a été choisi de présenter les courbes de survie normalisées par rapport au témoin traité par la drogue, afin de s'affranchir de sa chimiotoxicité. En augmentant l'exposition au cisplatine, la survie spécifique des cellules SQ20B a considérablement diminué et le contenu intracellulaire et donc intranucléaire de platine a par conséquent été optimisé. De plus fortes expositions au cisplatine à une toxicité de la drogue trop importante et n'ont donc pas été testées. Après une exposition de 1 μM de CDDP pendant 12 heures, la quantité d'atomes de platine mesurée par cellule (4.5×10^6) est strictement comparable aux quantités mesurées par Troger *et al.* chez des patients atteints de cancer à l'œsophage et traités par perfusion de 100 mg/m² de cisplatine [Trog91]. Les valeurs trouvées par ces auteurs sont de 4.6×10^6 ou 2.3×10^6 molécules de cisplatine par cellule, selon la quantité d'eau cellulaire supposée (60 ou 80 %). Par conséquent, notre modèle de cellules SQ20B exposées à 1 μM de CDDP pendant 12 heures conduit à un modèle représentatif des quantités de platine accessibles *in vivo* chez l'homme.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence de différence sur les courbes de survie selon les différentes associations entre la drogue et le rayonnement monochromatique.

La plus probable est que la quantité d'atomes de platine n'est pas suffisante dans le très proche voisinage de l'ADN pour modifier substantiellement la proportion d'interaction entre les photons incidents et les atomes de platine, préférentiellement aux interactions sur les atomes constitutifs de la cellule. Puisque les expériences de micro-imagerie par fluorescence induite par rayonnement synchrotron ont confirmé la localisation nucléaire du platine, celle-ci peut également être considérée comme optimisée. D'autre part, la chimiotoxicité du cisplatine sur notre lignée cellulaire limite l'étude de l'effet des rayonnements sur la survie de cellules contenant de plus grandes quantités de platine. En dépit de son caractère non réaliste en

comparaison des quantités intratumorales de platine mesurées chez l'homme *in vivo* [Trog91], l'augmentation du contenu en platine des noyaux cellulaires nous était de toute façon impossible, dans les conditions de travail choisies.

Une autre hypothèse est que la toxicité du cisplatine masque la létalité de l'interaction entre le rayonnement ionisant et les atomes de platine. L'hétérogénéité inter-cellulaire de l'incorporation du platine (dont nous avons été témoin lors de nos expériences de micro-imagerie X), peut à notre avis conduire à deux situations distinctes :

- 1) le cisplatine entre effectivement dans la cellule en quantité suffisante et forme des adduits dans l'ADN. Les rayonnements ionisants interagissent avec ces atomes de platine et produisent des dégâts moléculaires plus importants et plus létaux que dans les cellules non traitées au cisplatine. 15 jours après l'irradiation, ces différences ne sont pas visibles sur les courbes de survie car ces cellules sont mortes du fait de la toxicité intrinsèque de la drogue
- 2) le cisplatine n'entre pas dans la cellule et aucune différence liée à un traitement dont l'efficacité dépend de la présence dans l'ADN des cellules d'atomes de platine ne peut bien évidemment apparaître.

Finalement 15 jours après l'irradiation, les courbes de survie ne reflètent que la réponse des cellules dans lesquelles les quantités de platine intégrées étaient minimales ou nulles. D'où la superposition des trois courbes de survie, celle des cellules témoins et celles des cellules traitées au CDDP et irradiées en dessous et au-dessus du seuil d'absorption K du platine. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, il faudrait pouvoir doser uniquement les quantités de platine présentes dans les cellules radiobiologiquement survivantes, ce qui est impossible du fait du rejet de la drogue dans le milieu extracellulaire et de la multiplication des cellules.

D'autre part, nous pouvons souligner le fait que le choix de cette lignée cellulaire correspondait à un compromis qui n'était peut-être optimal pour observer cet effet, en particulier à cause de sa particulière radiorésistance et de son statut génétique.

Ces résultats présentent donc les limites de notre modèle d'effet de l'activation résonante d'atomes de platine, incorporés sous forme de cisplatine dans les cellules SQ20B, lorsque le critère d'étude est la survie cellulaire. Toutefois, ces résultats sont, à notre connaissance, la première application de l'activation résonante d'hétéroatomes de platine de l'ADN, incorporés dans des cellules vivantes au moyen d'une drogue de chimiothérapie.

Peu de travaux ont été réalisés dans l'objectif d'étudier l'effet de l'activation résonante au seuil K d'hétéroatomes stables incorporés dans l'ADN. Si un effet radiosensibilisateur important⁴⁵ a été montré sur les cellules de hamster V79 pour une irradiation avec des rayons X d'énergie légèrement supérieure au seuil K de l'iode, incorporé dans l'ADN sous forme d'IUdR [Last93], des résultats aussi convaincants n'ont pas pu être reproduits sur la même lignée avec des atomes de Brome (pourtant meilleur émetteur Auger que l'iode) [La89, Last92b] ou l'indium [Jöns96]). Pour ce dernier, la toxicité de l'oxine, utilisée pour véhiculer 5×10^7 atomes d'indium au cœur de l'ADN, était de l'ordre de 10 % (soit 90 % de survie spécifique sans irradiation). Les auteurs ont expliqué cette absence d'augmentation de radiotoxicité pour des irradiations de part et d'autre du seuil K de l'indium par l'insuffisance du nombre d'atomes présents dans et/ou suffisamment proches de la double hélice de l'ADN. Toutefois un effet de l'indium apparaît sur leurs courbes de survie puisque celles-ci se distinguent du contrôle non traité à l'oxine marquée à l'indium stable. Une autre explication pour cette absence de différence sur les courbes de survie cellulaire a été donnée par Usami *et al.* [Usam91] qui étudièrent les processus d'effet Auger sur des atomes de brome stable incorporés dans l'ADN de levures. Pour eux, l'absence de différence sur les courbes de survie s'explique par la très large prédominance de l'effet indirect dans l'interaction des rayons X avec la matière : les produits de la radiolyse de l'eau seraient responsables des effets biologiques observés et l'effet des électrons Auger serait masqué par la très grande proportion de radicaux libres générés. Leur hypothèse a été validée par l'observation en présence d'un piègeur de radicaux libres d'une nette radiosensibilisation après irradiation au-dessus du seuil K du brome, en comparaison de l'irradiation en dessous de ce seuil.

Le choix du platine comme émetteur Auger potentiel a déjà été évoqué dans la littérature. Howell *et al.* ont signalé le grand nombre d'électrons Auger spontanément émis par l'isotope radioactif ^{195m}Pt [Howe94]. Les courbes de survie obtenues sont semblables à celles résultant d'une irradiation par des particules à fort TEL ; ceci montre que des dommages à l'ADN non ou mal réparés étaient engendrés. De la même manière, les courbes de survie des cellules V79 exposées à du carboplatine marqué à l'isotope radioactif ^{193m}Pt montrent une très nette radiosensibilisation et une perte d'épaulement en comparaison des courbes obtenues après traitement au carboplatine stable [Azur92]. Mariani et Bodei ont également comparé plusieurs émetteurs Auger du point de vue de la quantité d'énergie

⁴⁵ Facteur d'efficacité Auger à 10 % de survie de 1.4 (différence de survie entre les cellules traitées à l'IUdR et irradiées au-dessus et en dessous du seuil K de l'iode), qui conduisait à un gain thérapeutique de 3.1 par

libérable et une fois de plus le $^{195\text{m}}\text{Pt}$ s'est révélé être des plus intéressant. Puisque les composés radioactifs métastables du platine sont difficilement disponibles pour des raisons économiques, l'activation par irradiation externe de composés contenant du platine stable est une alternative à envisager, comme l'ont suggéré par exemple Jönsson *et al.* [Jöns96]. Nous avons choisi le cisplatine comme agent vecteur car il s'agit du composé platiné le plus utilisé en clinique. Néanmoins la mise en garde de Howell à propos des effets combinés d'une drogue de chimiothérapie et d'un événement physique est plus que jamais d'actualité et la cytotoxicité de l'agent vecteur peut à notre avis masquer la toxicité des cascades d'électrons Auger.

C'est pour cette raison qu'il nous a semblé nécessaire de tester d'autres critères d'efficacité de traitement, toujours avec le cisplatine, comme la quantification des dégâts générés à l'échelle moléculaire ou leurs voies de réparation. Cette approche était pressentie pour permettre une vision plus instantanée de l'effet des électrons Auger, sans problème de toxicité de la drogue de chimiothérapie. D'autres composés platinés, non toxiques, ont également été testés. Les résultats obtenus par Le Sech *et al.* avec le chloroterpyridine platinum sur des plasmides ont montré la possibilité de générer des dégâts très localisés après excitation résonante du platine autour du seuil L_{III} à 11.5 keV [Koba02, LeSe00]. Ces résultats prouvent l'existence d'un effet moléculaire et sont très encourageants, même si de telles énergies semblent difficiles à utiliser chez l'homme, en irradiation externe.

V.3.2.2. A la recherche des phénomènes biophysiques primaires : approche moléculaire

Pour cette recherche des phénomènes biophysiques primaires, plus proches de l'événement physique initial, les conditions expérimentales requises pour pouvoir mettre en évidence des phénomènes à l'échelle moléculaire, ont nécessité de pousser à l'extrême la toxicité des traitements : plus forte incorporation de platine dans les cellules SQ20B, doses de rayonnement plus élevées, et parfois blocage des systèmes de réparation cellulaire durant l'irradiation. C'est à ce prix que les taux de cassures de brins de l'ADN générés par l'activation résonante du platine pouvaient être observés, ainsi que les mécanismes mis en œuvre par les cellules pour réparer les dommages étudiés.

V.3.2.2.1. Incidence et réparation des cassures de brins de l'ADN induites par l'activation résonante du platine

L'incidence et la cinétique de réparation des cassures simple brins produites après irradiation à 78 ou 78.8 keV à 4°C des cellules SQ20B traitées par 0, 3 ou 30 μ M de CDDP pendant 6 heures sont présentées ci-dessous (Figure V-34). Les données présentées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Le taux de CSB produites par l'activation résonante du platine incorporé sous forme de CDDP a été étudié par électrophorèse en champs pulsés pendant 96 heures à partir des blocs d'agarose contenant les lysats cellulaires (obtenus par un tampon de lyse alcalin) marqués à la ^{3} HtdR [Fora97a]. L'incidence des CSB est représentée par la FAR (fraction of activity released, cf. (Eq. IV-13) p.178), qui représente le pourcentage d'ADN ayant migré. Les cinétiques de réparation sont exprimées par cette même grandeur, normalisée à 1 lorsque aucun temps de réparation à 37°C n'a été accordé aux cellules.

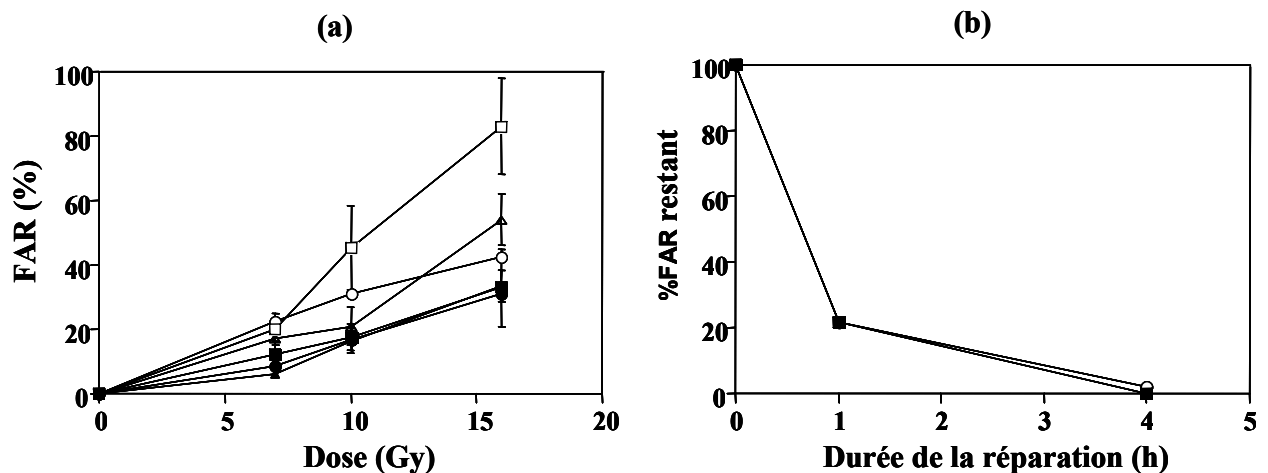


Figure V-34 : Cassures simple-brin induites par l'activation résonante de platine vectorisé dans les cellules SQ20B sous forme de CDDP. (a) incidence des CSB pour des cellules traitées au CDDP (contrôles : symbole rond, 3 μ M pendant 6 heures : symbole triangle ; 30 μ M pendant 6 heures : symbole carré) et irradiées 400 eV au-dessus (symboles blancs) ou en dessous (symboles noirs) du seuil K du platine. Chaque point représente la moyenne $\pm$ l'écart-type des valeurs obtenues après trois expériences indépendantes (b) Evolution temporelle normalisée de la réparation des CSB générées dans des cellules SQ20B pré-traitées par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées par 16 Gy au-dessus (O) ou en dessous (■) du seuil K du platine

Ces résultats montrent que les irradiations par des rayons X monochromatiques d'énergie légèrement supérieure ou inférieure au seuil K du platine (78.39 keV) ne produisent pas de différence significative dans le taux de CSB générées, pour les cellules pré-traitées par 0 ou 3 μ M de CDDP pendant 6 heures. Par contre, les cellules traitées par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures affichent quant à elles 4 fois plus de CSB après l'irradiation à 16 Gy pour 78.8 keV que pour celle à 78 keV. A cette dernière énergie, malgré le traitement

pharmacologique, le taux de CSB est confondu avec les contrôles, non traités au CDDP (Figure V-34 (a)). Ces résultats suggèrent que l'activation résonante du platine au-dessus de son seuil K conduit à une surproduction de cassures simple brins au niveau de l'ADN des cellules. L'excès de FAR observé après la dose de 16 Gy avec l'irradiation à 78.8 keV des cellules traitées avec 30 μ M de CDDP pendant 6 heures correspond à un surdosage de 12 Gy d'irradiation conventionnelle γ , soit 11000 CSB induites en surplus par cellule.

Dans les cellules humaines, la majorité des CSB radio-induites sont généralement réparées entre 10 et 15 minutes après l'irradiation [Fran89]. Des durées de réparation aussi courtes n'ont pas pu être étudiées dans notre protocole expérimental. Toutefois, les cinétiques de réparation réalisées (avec des temps de réparation assez tardifs puisque la durée la plus précoce était de 1 heure de réparation) ne montrent pas de différence significative entre les deux énergies d'irradiation, pour les cellules traitées avec 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées à 16 Gy (Figure V-34 (b)).

L'association d'une irradiation au-dessus du seuil K du platine avec la présence de platine au cœur de l'ADN cellulaire est supposée conduire à un accroissement du nombre d'événements photoélectriques dont les conséquences, les cascades d'électrons Auger, sont connues pour produire *in situ* des cassures double-brins [Ilia91b, Kass00a, Radf85].

L'incidence et la cinétique de réparation des CDB ont donc également été examinées pour savoir si la quantité et la complexité des CDB pouvaient différer entre une irradiation au-dessus et en dessous du seuil K du platine de cellules SQ20B pré-traitées au CDDP (Figure V-35). La technique est identique à celle rappelée pour les CSB, à l'exception du pH de la solution de lyse (8 au lieu de 12).

Les résultats obtenus pour les taux de CDB générés pour les différentes associations entre le rayonnement monochromatique et les expositions au CDDP montrent qu'à l'exception des données à 16 Gy, aucune différence significative n'apparaît entre les irradiations au-dessus et en dessous du seuil K du platine, pour les cellules traitées avec 0 et 3 μ M de CDDP pendant 6 heures (Figure V-35 (a)). Par contre, pour les cellules traitées avec 30 μ M de CDDP pendant 6 heures, le taux de CDB générées est trois fois plus important lorsque 16 Gy ont été délivrés avec l'énergie d'irradiation supérieure au seuil K du platine. En dessous de ce seuil, malgré les quantités de platine présentes, l'incidence des CDB est similaire à celle des contrôles, non traitées. Ces résultats suggèrent que l'activation résonante du platine au-dessus de son seuil K conduit à une surproduction de cassures double brins au niveau de l'ADN des cellules. L'excès de FAR de 20 % observé après la dose de 16 Gy avec l'irradiation à 78.8 keV des cellules traitées avec 30 μ M de CDDP pendant 6 heures

correspond à un surdosage de 8 Gy d'irradiation conventionnelle γ , soit 300 CDB induites en surplus par cellule. Pour les CSB, le surplus de dose était de l'ordre de 12 Gy dans les mêmes conditions, ce qui indique que les cassures simple-brin ne proviennent pas uniquement de la réparation des cassures double brins mais qu'il y a bien génération d'un surplus de CDB et de CSB.

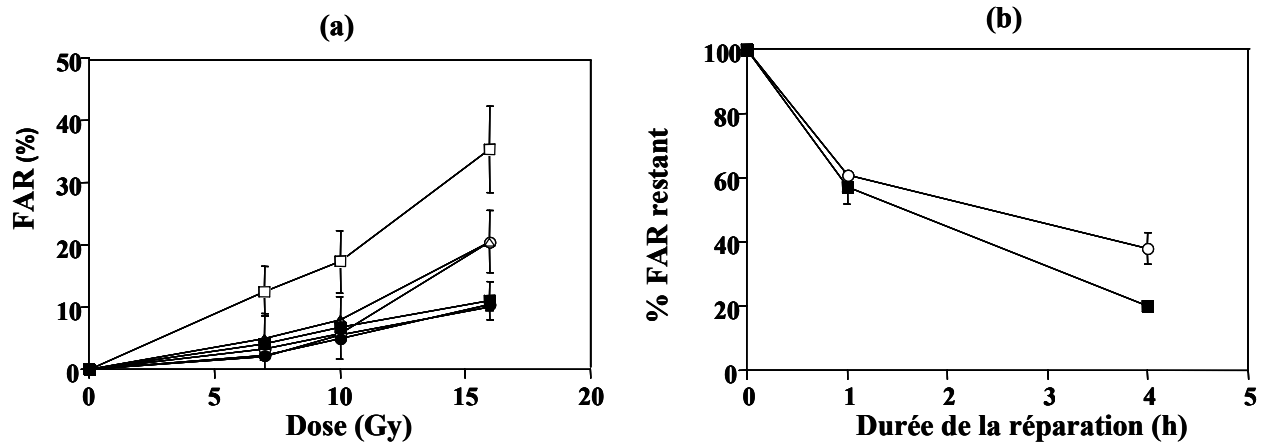


Figure V-35 : Cassures double-brins induites par l'activation résonante de platine vectorisé dans les cellules SQ20B sous forme de CDDP. (a) incidence de CDB pour des cellules traitées au CDDP (contrôles : symbole rond, 3 μ M pendant 6 heures : symbole triangle ; 30 μ M pendant 6 heures : symbole carré) et irradiées 400 eV au-dessus (symboles blancs) ou en dessous (symboles noirs) du seuil K du platine. Chaque point représente la moyenne $\pm$ l'écart-type des valeurs obtenues après trois expériences indépendantes (b) Évolution temporelle normalisée de la réparation des CDB générées dans des cellules SQ20B pré-traitées par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées par 16 Gy au-dessus (○) ou en dessous (■) du seuil K du platine

La réparabilité des CDB est présentée ci-dessus (Figure V-35 (b)). Après des périodes d'incubation à 37°C autorisées de 1 et de 4 heures après chaque type de traitement, la FAR résultante a été exprimée en pourcentage de la FAR initiale, sans réparation. Les cinétiques de réparation obtenues montrent qu'une plus grande quantité de CDB résiduelles non réparées existent après 4 heures de réparation pour les cellules traitées à 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées à 16 Gy au-dessus du seuil K du platine, en comparaison de celles mesurées après l'irradiation en dessous du seuil. La réparation plus lente des CDB après l'irradiation à 78.8 keV indique que les CDB sont non seulement plus nombreuses, mais également plus complexes.

Pour tenter d'élucider la nature de ces fragments d'ADN, une électrophorèse permettant la discrimination en taille des fragments inférieurs à 10 kpb a été utilisée. Les résultats sont présentés sur la figure suivante, pour les différentes associations d'énergie de rayonnement X et d'exposition au CDDP (Figure V-36).

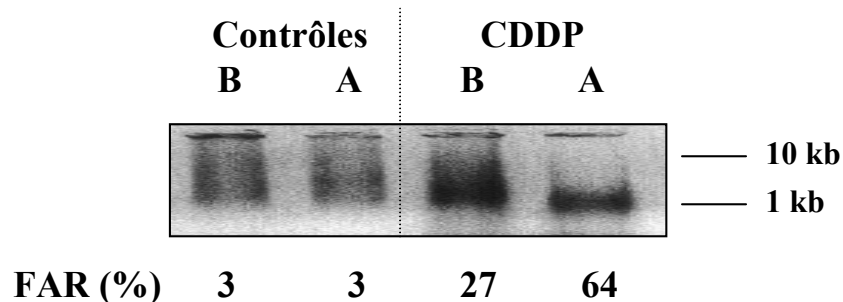


Figure V-36 : Migration en champs pulsés à partir des blocs d'agarose contenant des cellules SQ20B exposées à différentes combinaisons d'un traitement de 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et de 16 Gy de rayons X d'énergie supérieure (A) ou inférieure (B) au seuil K du platine.

Dans ces conditions, l'expression de la FAR montre qu'une sous-population de fragments d'ADN d'environ 1 kpb de long est largement plus importante après l'irradiation au-dessus du seuil K du platine (A) que pour celle en dessous (B), pour les cellules traitées avec 30 μ M de CDDP pendant 6 heures. Cette sous-population n'est pratiquement pas mise en évidence pour les témoins irradiés mais non traités au CDDP. Ces résultats suggèrent que l'activation résonante du platine au-dessus de son seuil K conduit à une surproduction de fragments d'ADN spécifiquement petits et très homogènes comme s'ils correspondaient à un motif particulier.

V.3.2.2.2. Une activité DNA-PK inhibée

Pour les cellules de mammifères, les CDB radio-induites provoquent généralement le recrutement de l'hétérodimère Ku, qui se fixe sur les extrémités lésées de l'ADN et assure la formation du complexe DNA-PK par l'intermédiaire de l'activation de la sous unité catalytique de la protéine kinase DNA-PKcs (cf. Figure II-11 p.32) [Smith99]. Cependant, les adduits générés par le CDDP dans l'ADN bloquent la translocation des protéines Ku le long des brins d'ADN, et conduisent à une inhibition de l'activité DNA-PK [Turc00]. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'activité de la protéine kinase DNA-PK en condition d'irradiation résonante autour du seuil K du platine, incorporé dans les cellules humaines tumorales SQ20B par du cisplatine. La protéine DNA-PKcs extraite des cellules ayant subi les différents traitements possibles a été immunoprécipitée et l'activité DNA-PK a été évaluée par la mise en évidence de son état de phosphorylation selon un protocole standard, basé sur l'utilisation d'un substrat spécifique marqué au ^{32} P.

Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure V-37). Sans traitement au CDDP, les irradiations en rayonnement synchrotron conduisent à une activation de la protéine kinase DNA-PK, comme un rayonnement ionisant standard [Shan00]. De plus, aucune différence

d'activation de DNA-PK n'apparaît après 4 heures de réparation entre les énergies légèrement supérieure ou inférieure au seuil K du platine. Ceci est concordant avec la similitude du taux de CDB induites par ces irradiations, en l'absence de CDDP (Figure V-35). Pour les cellules exposées à 30 μM de CDDP pendant 6 heures, la drogue de chimiothérapie inhibe d'un facteur 2 cette activité DNA-PK, que les cellules aient été irradiées ou non. Ni le choix de l'énergie d'irradiation, ni la durée de réparation, ne conduisent à des différences statistiquement significatives.

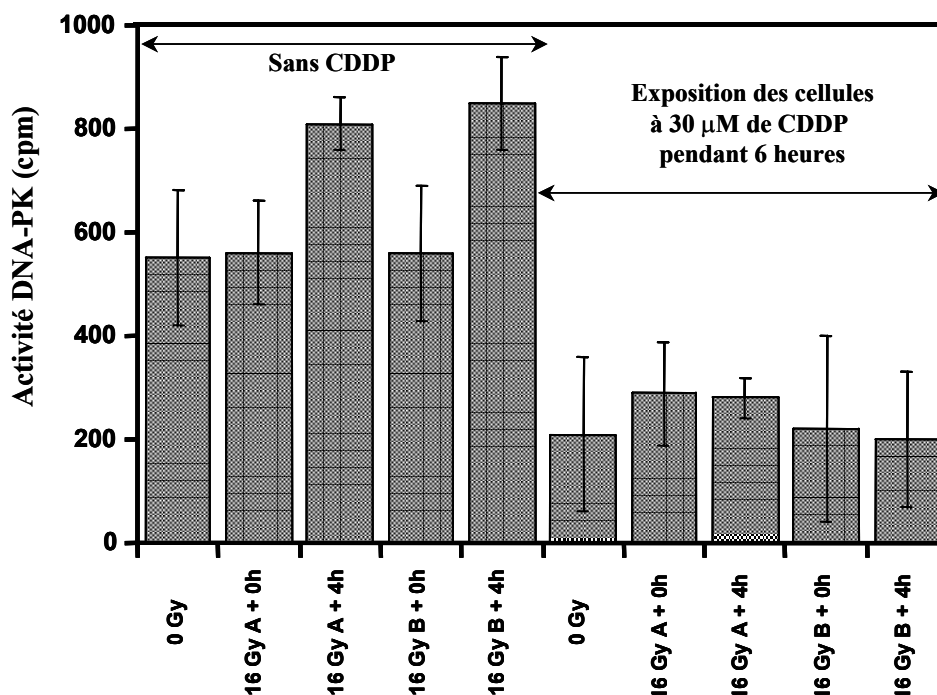


Figure V-37 : *Activité DNA-pK de cellules SQ20B exposées à 30 μM de CDDP pendant 6 heures et irradiées à 16 Gy au-dessus (A) ou en dessous (B) du seuil K du platine. Deux durées de réparation à 37°C ont été étudiées : 0 et 4 heures. Les données représentent la moyenne $\pm$ l'écart-type des valeurs trouvées lors de deux expériences indépendantes.*

Par conséquent ces résultats montrent simplement que l'exposition des cellules SQ20B à 30 μM de CDDP pendant 6 heures provoque une nette diminution de l'activité DNA-PK, indépendamment de l'irradiation en condition de résonance du platine. Ces données confirment les travaux d'autres équipes [Turc00] et poussent à penser que la réparation des cassures double-brins n'aura pas lieu par suture non homologue. Le NHEJ, d'ordinaire majoritaire, devrait être inhibé du fait de la présence d'adduits du cisplatine dans l'ADN des cellules [Myin02].

V.3.2.2.3. Recombinaison homologue favorisée

La protéine RAD51 est un acteur essentiel des premières étapes de la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue (cf. Figure II-11 p.32) [Baum96]. Après une agression cellulaire du type d'une irradiation par rayonnements ionisants ou action d'une drogue de chimiothérapie, la protéine RAD51 se concentre sous forme de *foci* dans les noyaux cellulaires. Sortes d'usines à réparer ambulantes, ces sites de fixation des protéines RAD51 sont supposés cartographier directement les cassures de l'ADN qui seront réparés par recombinaison homologue [Scul97]. D'autre part, un bon nombre de lignées cellulaires déficientes en systèmes de réparation homologue ne présentent pas de *foci* RAD51 après un traitement génotoxique, ce qui laisse suggérer que la relocalisation des protéines RAD51 puisse servir de critère d'évaluation de l'activité de réparation par recombinaison homologue [Che99].

Pour étudier une éventuelle relocalisation des protéines RAD51 après activation résonante du platine introduit sous forme de CDDP, les cellules SQ20B ont été observées au microscope en immunofluorescence, après marquage par un anticorps anti-RAD51. Des images représentatives des populations cellulaires sont présentées ci-après (Figure V-38).

Sur ces images, il est possible de visualiser directement la localisation des sites d'activation des protéines RAD51 impliquées dans la réparation des lésions. Il apparaît clairement que les cellules traitées par 30 μ M de CDDP et irradiées par 10 Gy de rayons X de 78.8 keV possèdent des sites d'activation de la protéine RAD51 plus nombreux.

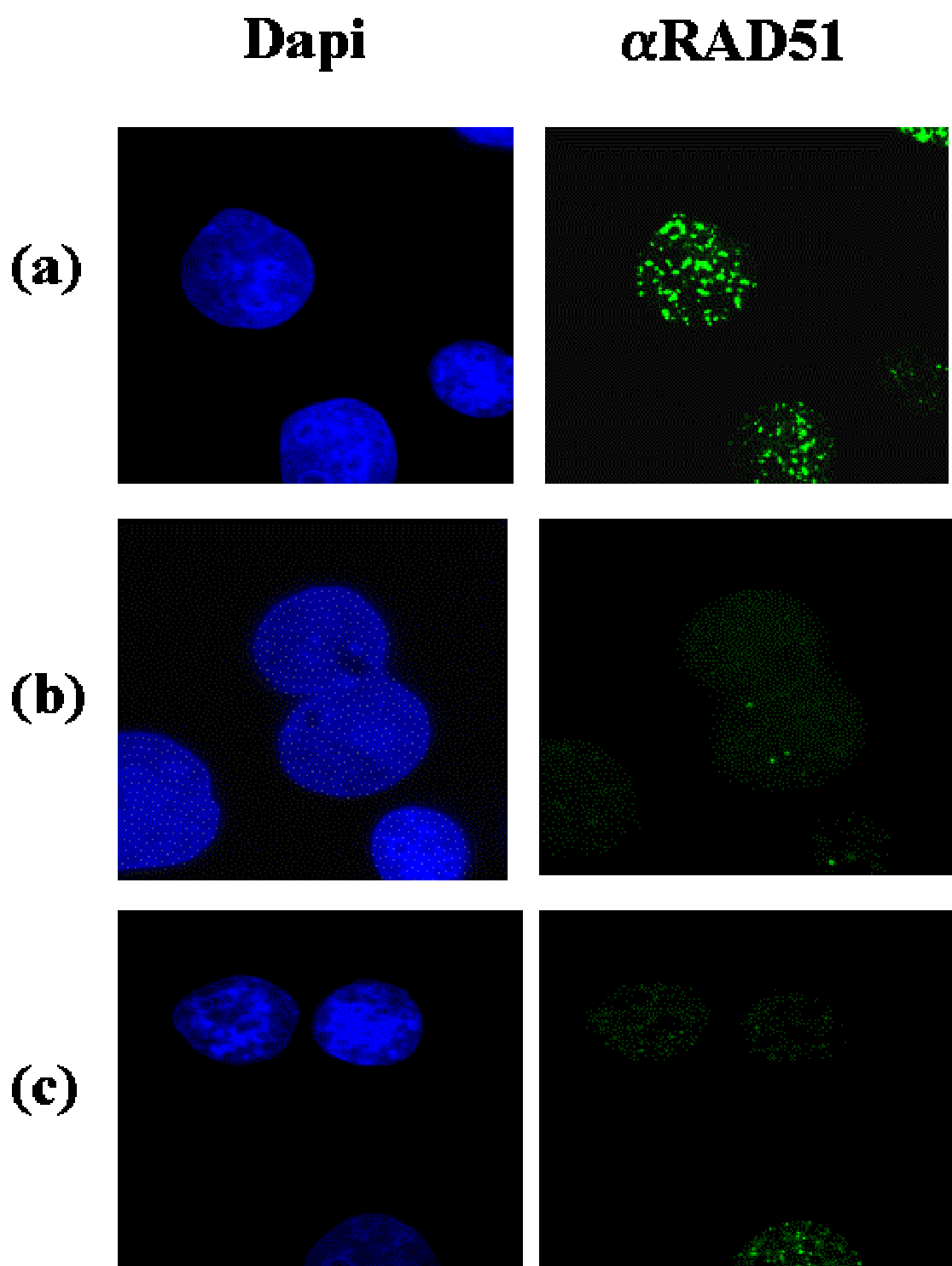


Figure V-38 : Localisation nucléaire de la protéine RAD51 dans des cellules SQ20B exposées à 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées à 10 Gy par des rayons X monochromatiques d'énergie supérieure (a) ou inférieure (b) au seuil K du platine. Les contrôles non traités et non irradiés sont représentés en (c). Les noyaux ont été colorés en bleu au DAPI et les foci rad51 apparaissent ici de couleur verte. La durée de réparation est de 1 heure.

Pour quantifier cette suractivité des protéines RAD51, deux critères ont été étudiés : le nombre de cellules avec *foci* et le nombre de *foci* par cellule (Figure V-39).

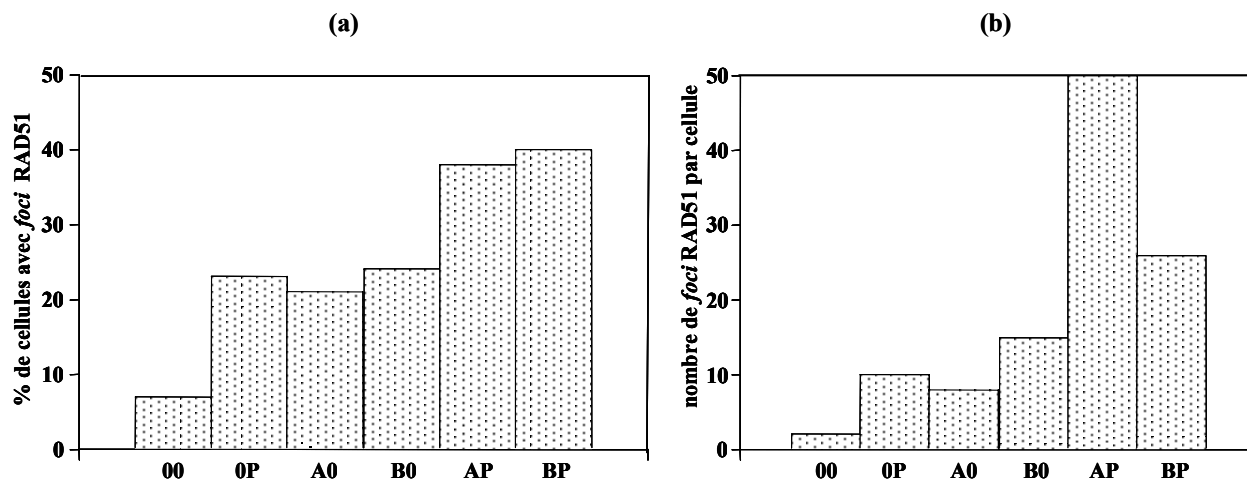


Figure V-39 : Quantification des foci RAD51 dans les noyaux cellulaires de cellules SQ20B traitées (_P) ou non (_0) par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées ou non (0_) par 10 Gy de rayons X d'énergie légèrement supérieure (A_) ou inférieure (B_) au seuil K du platine. Deux critères ont été étudiés : le comptage sur au moins 300 cellules (a) du nombre de cellules avec un nombre significatif de foci RAD51 et (b) le nombre moyen de foci RAD51 par cellule

Ces résultats montrent que le nombre de cellules avec *foci* est environ 1.5 fois plus important lorsque qu'une association CDDP et rayonnement X est réalisée, en comparaison avec des traitements pris indépendamment. L'énergie du rayonnement n'intervient pas dans cette approche. Par contre, si le nombre de *foci* par cellule est pris en considération, il apparaît clairement que les cellules traitées par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées par 10 Gy de rayonnement d'énergie légèrement supérieure au seuil K du platine affichent deux fois plus de sites d'activation de RAD51 par cellule que lorsque l'énergie est inférieure au seuil. L'excès de CDB induites par l'activation résonante du platine au-dessus du seuil K semble donc être réparé par des mécanismes dépendant de la protéine RAD51, comme la recombinaison homologue.

V.3.2.2.4. Discussion des phénomènes moléculaires

Actuellement, l'association de la radiothérapie avec des drogues de chimiothérapie halogénées permet d'augmenter significativement la réponse cellulaire au traitement et pourrait améliorer le pronostic de tumeurs malignes. En plus de cette synergie d'action, les composés halogénés marqués d'isotopes radioactifs ont prouvé une certaine efficacité thérapeutique, due à la génération spontanée de cascades d'électrons Auger à proximité de l'ADN des cellules tumorales. Les conséquences du déclenchement par irradiation externe d'événements photoélectrique sur une drogue de chimiothérapie, le cisplatine, ont été étudiées

à l'échelle moléculaire pour la première fois dans le cadre de ce travail. Nos résultats montrent que dans des conditions de toxicité de traitement aiguë, correspondant à la fenêtre de visibilité des dégâts moléculaires par les techniques expérimentales employées, l'irradiation résonante du platine, hétéroatome de l'ADN véhiculé dans les cellules SQ20B sous forme de CDDP, conduit à une augmentation du nombre de cassures simple et double brins de l'ADN. Les cassures double-brins sont d'une complexité plus importante et induisent la formation de fragments d'ADN de très petite taille (de l'ordre du kpb, qui est l'ordre de grandeur de la longueur d'ADN enroulé en solénoïdes formés eux-même par l'enroulement de la superstructure nucléosomale de la chromatine, soit 10 tours, ce qui pourrait signifier que la zone inter-histone est un site de fixation préférentiel du CDDP [Yane97]). Du fait de la présence d'adduits de cisplatine sur les brins de l'ADN, ces cassures sont préférentiellement réparées par recombinaison homologe, d'ordinaire mode de réparation minoritaire pour les cellules de mammifères. Les sites de concentrations de la protéine RAD51 après irradiation sont plus nombreux par cellule mais le nombre de cellules atteintes est sensiblement identique pour les deux énergies d'irradiation.

La conséquence directe attendue après génération d'une cascade d'électrons Auger autour de l'ADN est la production massive de cassures de l'ADN, simple ou double brins. Dans nos conditions, 300 CDB et 1100 CSB sont générées en excès après irradiation à 16 Gy de cellules SQ20B préalablement traitées avec 30 μ M de CDDP pendant 6 heures. Ceci correspond à un gain de d'énergie déposée compris entre 8 et 12 Gy. Puisque ces cassures sont susceptibles d'être créées à proximité des molécules de CDDP, source des électrons Auger, cette thérapie binaire reposant sur l'association de l'effet d'une drogue de chimiothérapie et d'un rayonnement d'énergie bien particulière, doit être source de sites de dommages multiples et très localisés (LMDS). Puisque les sites de fixation de la protéine RAD51 reflètent à la fois la présence de cassures de brins et celle d'adduits, leur très importante accumulation observée par immunofluorescence laisse penser qu'elle est due à plusieurs centaines de LMDS.

Dans les cellules humaines, le NHEJ est le mode de réparation prépondérant des dégâts à l'ADN. Par simple suture des brins lésés, la cellule parvient à réparer son ADN au prix parfois de quelques erreurs mineures au niveau de la séquence de l'ADN. Si l'irradiation des cellules non traitées au CDDP a bien montré une augmentation de l'activité DNA-PK caractéristique du NHEJ, celle-ci a été inhibée complètement du fait de la présence du CDDP. Toutefois l'étude de la cinétique de réparation des CDB des cellules traitées au CDDP et irradiées n'a pas mis en évidence une proportion conséquente de dégâts non réparés au bout

de 4 heures, même si celle-ci était plus importante dans le cas de l'irradiation au-dessus du seuil K. Turchi *et al.* ont montré que le CDDP empêche la translocation des protéines Ku sur les brins d'ADN, inhibe la formation du complexe DNA-PK et par conséquent bloque l'accès des sites de CDB aux ligases [Turc00]. Si le NHEJ est impossible il reste à la cellule le mode de réparation par recombinaison homologue. La distribution des sites d'activation de la protéine RAD51, impliquée dans cette réparation, semble conforter cette hypothèse. Pour les cellules traitées au CDDP, la quantification de cette distribution de *foci* RAD51 montre que le nombre de cellules touchées n'est pas plus important pour l'irradiation au-dessus du seuil K en comparaison de l'énergie inférieure, mais plutôt que le nombre de sites d'impacts par cellule est plus important.

V.3.2.3. Conclusions

En conclusion, l'étude des effets biologiques de l'activation résonante d'un hétéroatome de l'ADN, le platine, véhiculé au cœur du noyau des cellules humaines tumorales SQ20B a conduit à deux types d'approches, complémentaires dans leur finalité mais se différenciant par la fenêtre d'observation des différents effets.

Les expériences de survie cellulaire n'ont pas permis de mettre en évidence un phénomène d'augmentation de radiotoxicité dû à l'excitation sélective des atomes de platine. 15 jours après l'irradiation, les courbes de survie normalisées par rapport au témoin traité au CDDP mais non irradié se superposent parfaitement aux contrôles, non traités au CDDP. L'extrême toxicité du CDDP pour notre lignée cellulaire a limité l'augmentation des quantités intracellulaires de platine à quelques millions d'atomes par cellule. Au-delà, il nous était impossible de dissocier l'effet de la chimiothérapie de celui de la radiothérapie, puisque aucune cellule ne pouvait survivre au traitement pharmacologique. Nous avons néanmoins vérifié que le platine était bien présent dans le noyau des cellules mais ne sommes toutefois pas en mesure de dire si le platine a réellement formé des adduits dans l'ADN. L'allure des courbes de survie laisse suggérer l'absence de CDDP lors du traitement, ce qui nous a poussés à conclure que la chimiotoxicité du CDDP sur les cellules SQ20B masque un éventuel gain de radiotoxicité dû au renforcement de l'effet photoélectrique sur les atomes de platine.

L'approche moléculaire nous a néanmoins conforté dans l'existence du phénomène physique primaire. En se plaçant dans des conditions adéquates d'observation des effets (fortes doses de rayons X, fortes concentrations de CDDP, blocage de tout système de réparation), il a été possible d'observer une nette augmentation du taux de cassures produites sur l'ADN du fait de l'interaction résonante entre le platine et le rayonnement X d'énergie

supérieure à son seuil K. La génération de très petits fragments d'ADN et la multiplication des sites d'activation de la protéine RAD51 semblent prouver que ce sont des LMDS qui sont à l'origine de ces dégâts. La recombinaison homologue, plus fidèle dans sa réparation que la suture, peut éventuellement mieux gérer ces dégâts et amoindrir d'éventuelles différences de réponse au traitement. Cette possibilité est à prendre aussi en considération pour expliquer l'absence de différence de survie des SQ20B, en effet ces cellules se sont révélées fort compétentes pour la recombinaison homologue, et nous ont permis de mettre ce phénomène biochimique en évidence. D'autre part, l'augmentation de dommages à l'ADN créés par l'irradiation au-dessus du seuil K n'augmente pas la proportion de cellules touchées mais plutôt la quantité de dégâts générés par cellule, ce qui pourrait être invisible sur la survie cellulaire car encore une fois, cet excès de dégâts touchent des cellules déjà très affectées.

V.3.2.4. Propositions visant à rechercher un modèle de travail plus adapté

Même si les résultats de l'approche moléculaire n'ont pas été retrouvés *in vitro* sur la survie cellulaire, ils nous ont rassurés quant à l'existence des phénomènes biophysiques primaires. De nombreuses interrogations ont toutefois été soulevées, concernant la pertinence des choix de l'agent pharmacologique et de la lignée cellulaire SQ20B, particulièrement radorésistante et compétente pour la réparation. C'est pour cette raison que nous avons tenté d'optimiser notre modèle d'étude en étudiant un autre composé platiné, intercalant de l'ADN mais non toxique, ainsi que d'autres cellules, présentant une plus grande affinité pour le CDDP ou une moindre radorésistance du fait d'une déficience dans leur système de réparation.

V.3.2.4.1. Un agent pharmacologique platiné moins toxique pour la lignée SQ20B : le PtTC

Dans ce paragraphe, des résultats préliminaires sont présentés concernant l'irradiation de cellules SQ20B pré-traitées par 350 μM de chloroterpyridine platinum (PtTC) pendant 6 heures. Le choix de cette exposition a été motivé par les résultats de dosage par spectrométrie de masse, qui, pour les cellules SQ20B exposées à 300 μM de PtTC pendant 6 heures ont montré que 2.21×10^8 atomes de platine avaient pénétré en moyenne dans les cellules sans aucune toxicité intrinsèque. Il est toutefois intéressant de noter que pour une exposition de 30 μM de PtTC pendant 6 heures, 1.3×10^7 atomes de platine ont été dosés en moyenne, ce qui représente une quantité 20 fois moindre que pour le CDDP. Par conséquent il serait incorrect de prétendre que le PtTC assure une meilleure incorporation de platine à l'intérieur des

cellules. Son absence de toxicité permet simplement d'envisager des expositions plus importantes, et donc d'augmenter le contenu intracellulaire en platine.

Les cellules ont été irradiées en suspension dans des tubes en rotation. Un radioprotecteur a été parfois rajouté au milieu de culture cellulaire pour appréhender le caractère direct ou indirect des effets cellulaires observés (10% de DMSO en volume comme conseillé par Bishayee *et al.* [Bish00a] pour assurer un maximum de protection). Un test de clonogénicité standard a été réalisé pour quantifier l'effet du traitement. Plusieurs énergies d'irradiation ont été utilisées : 400 eV en dessous et en dessus du seuil K du platine (78.4 keV, gap 40 mm), 48 keV (gap 45 mm) et 33 keV (gap 50 mm). Le mode de fonctionnement du synchrotron était le mode uniforme, avec une intensité variant de 200 à 170 mA. Les gaps du wiggler ont été choisis afin d'irradier l'ensemble des cellules avec un débit de dose identique (soit $0.5 \text{ mGy.mA}^{-1}.\text{scan}^{-1}$).

Les courbes de survie obtenues pour les énergies situées de part et d'autre du seuil K du platine sont présentées ci-après (Figure V-40).

Malgré le caractère préliminaire de ces résultats, un effet du PtTC est observé sur ces courbes de survie. L'irradiation des cellules SQ20B avec 10% de DMSO correspond bien au traitement le plus radioprotecteur et il est intéressant de noter que l'association du DMSO et de l'exposition au PtTC conduit à une radiotoxicité plus importante ce qui montre qu'une partie au moins des dégâts générés par l'association de l'irradiation et de la présence du PtTC n'a pas pour intermédiaire des radicaux libres. Toutefois, l'irradiation en dessous et en dessus du seuil K du platine ne conduit pas à la différence escomptée au niveau des courbes de survie cellulaire et apparaît sur ces résultats préliminaires légèrement inversée.

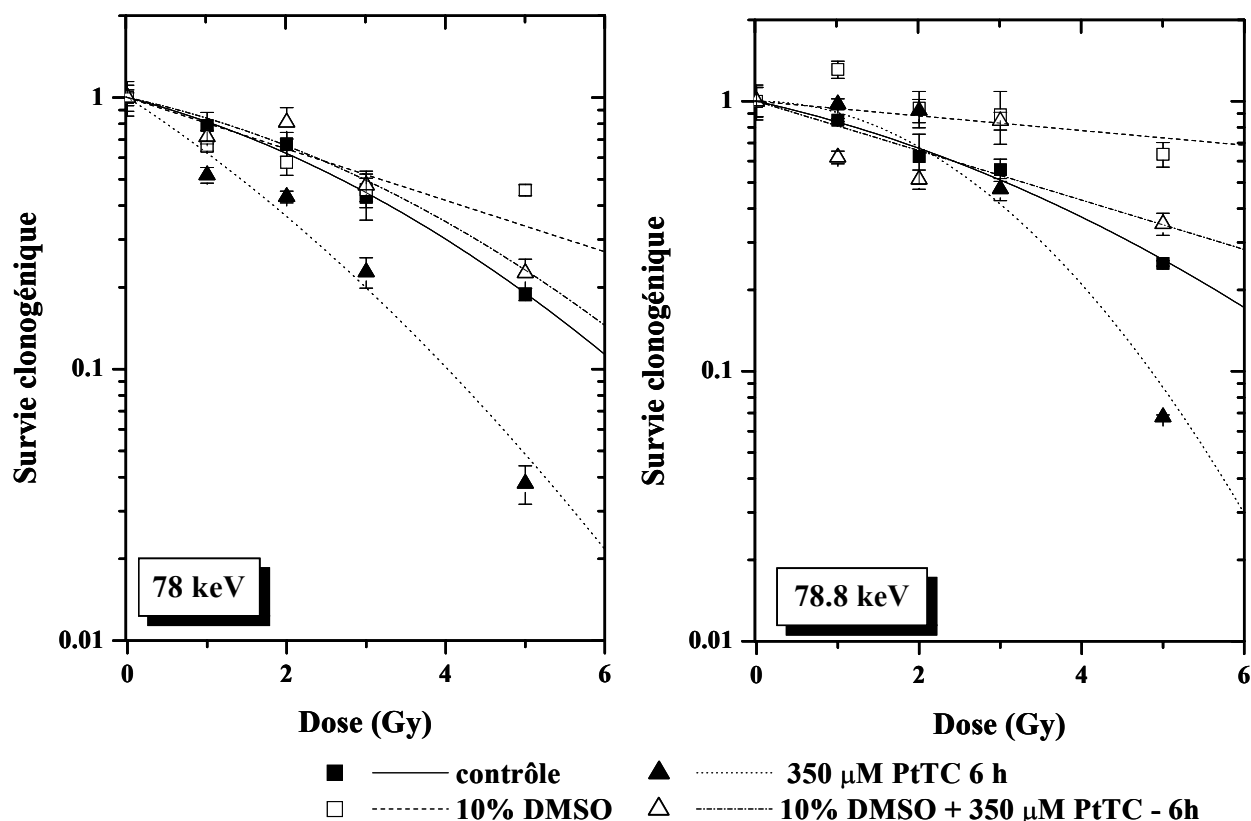


Figure V-40 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à 350 μ M de PtTC pendant 6 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, en dessous et au-dessus du seuil K du platine. Les cellules de contrôle ont été incubées sans PtTC. L'ajustement des données expérimentales a été réalisé selon le modèle linéaire quadratique. Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été considérés comme survivants. La normalisation des survies des cellules traitées au PtTC a été réalisée par rapport au témoin non irradié mais exposé à l'agent pharmacologique, qui présentait une survie spécifique de 98%

Sur la figure suivante sont présentés les $SER^{10\%}$ pour l'ensemble des traitements pharmacologiques et des énergies d'irradiation testés.

Quelque soit l'énergie d'irradiation choisie, le pré-traitement des cellules SQ20B par 350 μ M de PtTC conduit à une radiosensibilisation cellulaire. Celle-ci conduit à un $SER^{10\%}$ compris entre 1.2 et 1.6, avec une augmentation pratiquement monotone avec l'énergie du rayonnement. L'efficacité de la protection par le DMSO des dommages générés par l'association RX+ pré-traitement des cellules par 350 μ M de PtTC pendant 6 heures semble sur ces données légèrement moins efficace aux basses énergies (33 et 48 keV) qu'aux plus hautes. Le DMSO semble également posséder une activité radioprotectrice dépendant de l'énergie de l'irradiation, avec une efficacité plus importante à 33 ou 78.8 keV.

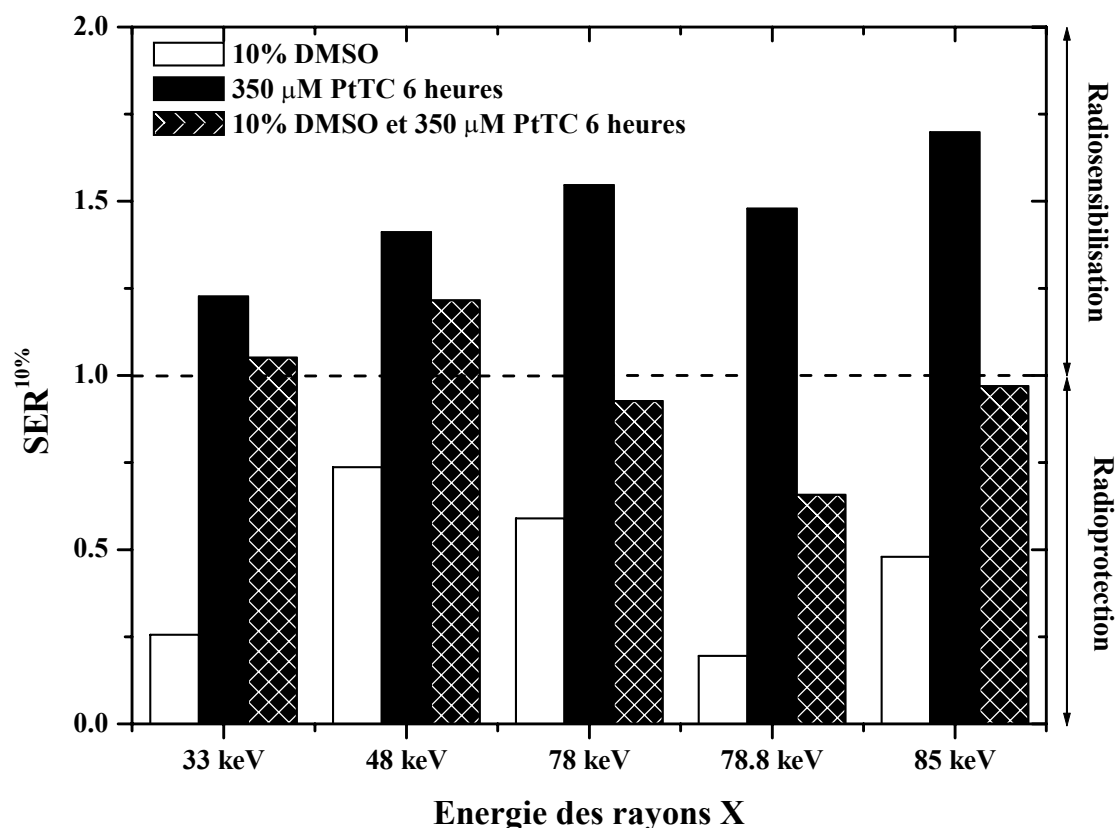


Figure V-41 : Radiosensibilisation et radioprotection des dommages créés aux cellules SQ20B par l'association d'une irradiation en rayonnement monochromatique et une exposition de 6 heures à 350 μ M de PtTC.

Malgré les précautions de rigueur qui doivent affecter nos conclusions avec des résultats préliminaires, nous pouvons en déduire que l'irradiation des cellules SQ20B pré-traitées par 350 μ M de PtTC pendant 6 heures (non toxique) conduit à une radiosensibilisation cellulaire, qui n'a jamais pu être mise en évidence avec le CDDP. Cette différence peut s'expliquer par le nombre d'atomes de platine incorporés dans les cellules, qui est 50 fois plus important dans cette configuration que pour l'exposition à 1 μ M de CDDP pendant 12 heures ce qui correspond à la plus forte exposition qui a pu être testée sur la survie radiobiologique des cellules SQ20B. En revanche cette quantité de platine intracellulaire, qui a été atteinte grâce au PtTC est rigoureusement semblable à celle qui a été dosée pour 30 μ M de CDDP pendant 6 heures, exposition utilisée pour la quantification des cassures de brins de l'ADN des cellules de la lignée SQ20B.

Ces résultats confirment les études menées par Le Sech *et al.* autour du seuil L_{III} du platine (11 keV), fixé à des plasmides d'ADN déshydratés par l'intermédiaire du même intercalant, le PtTC [LeSe00, LeSe01]. Un effet de l'excitation résonante du platine autour de ce seuil d'absorption a été mis en évidence, par mesure du taux de cassures de brins produites sur les plasmides. Sur des complexes identiques en solution aqueuse, l'effet du PtTC apparaît

toujours sur l'incidence des cassures simple et double brins [Koba02]. En revanche l'effet du choix de l'énergie d'activation est moins évident et les taux de CSB et CDB produits juste en dessous et juste au-dessus du seuil L_{III} sont sensiblement équivalents. Le rajout de 1 M de DMSO montre que 87% des CDB sont ainsi protégés, indiquant la nature indirecte de l'action du platine ionisé sur l'ADN.

Ainsi, nos études autour du seuil K du platine confirment l'efficacité de l'association du PtTC avec les rayonnements X de basses ou moyennes énergies pour augmenter leur effet létal. Elles semblent également indiquer que leur efficacité est liée à une augmentation de produits de la radiolyse de l'eau, plus qu'à des événements directement létaux. Les atomes de platine ionisés par effet photoélectrique se réorganiseraient donc en récupérant des électrons auprès des molécules d'eau qui se dissocieraient en radicaux agressifs pour l'intégrité de la structure de l'ADN. Une autre hypothèse est que les électrons Auger soient suffisamment énergétiques pour agir au-delà de la centaine de paires de bases du lieu d'ionisation de l'hétéroatome. Ce dernier point expliquerait la possibilité de protéger les cassures produites, puisque le DMSO est capable de protéger l'ADN sur un rayon d'action supérieur ou égal à 100 paires de bases. En revanche, encore une fois, le passage de l'énergie d'irradiation située en dessous par rapport à au-dessus du seuil K ne montre pas de résultats significativement différents.

L'absence de toxicité de PtTC sur notre lignée cellulaire en fait un excellent modèle d'étude en substitution au CDDP, trop agressif.

V.3.2.4.2. Utilisation d'une lignée cellulaire moins sensible au cisplatine : IGROV1

Le choix de cette lignée issue d'un adénocarcinome ovarien a été motivé par les travaux de Ortega *et al.* [Orte96], orientés vers l'étude par micro-analyse nucléaire PIXE des quantités de platine incorporées après exposition des IGROV au CDDP. D'après leurs travaux, celles-ci ont été estimées à environ 3.10^8 atomes de platine par cellule, après une exposition à 33.6 μM de CDDP pendant 5 heures (cf. § IV.5.1.2 p.162). Si les quantités de platine dosées dans les cellules SQ20B après une exposition comparable sont similaires, la viabilité des IGROV après une telle exposition est plus élevée : elle est de l'ordre de⁴⁶ 10% [Poul98].

⁴⁶ donnée extrapolée à partir des données publiée pour un exposition à 10 μg de CDDP/ml pendant 2 heures

L'incidence et la cinétique de réparation des cassures double brins produites après irradiation à 78 ou 78.8 keV à 4°C des cellules IGROV1 traitées par 1 μ M de CDDP pendant 6 heures ont été comparées à celles des cellules SQ20B traitées par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures (Figure V-42).

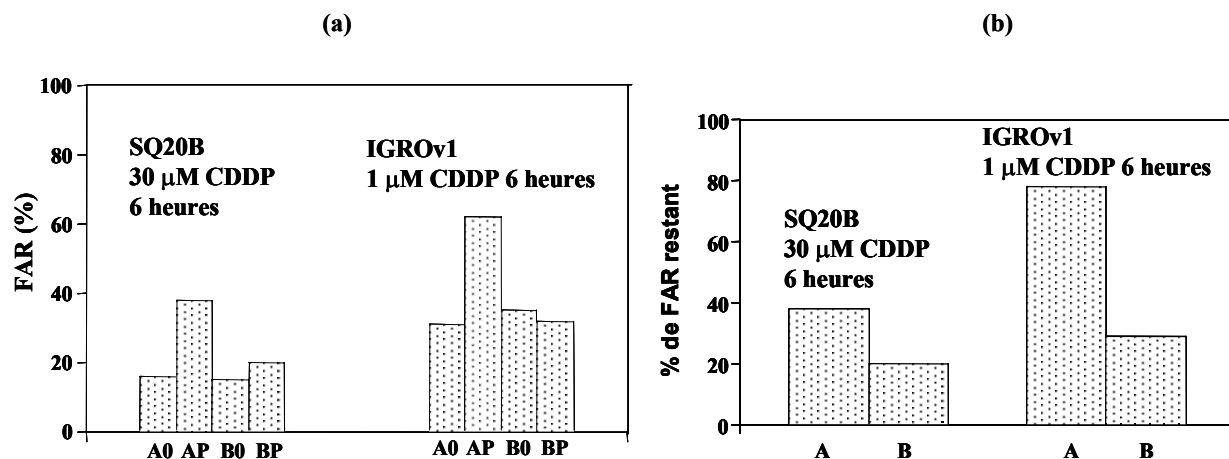


Figure V-42 : (a) Incidence et (b) pourcentage de non-réparation après 4 heures des cassures double-brins induites par une irradiation de 16 Gy au-dessus (A) ou en dessous (B) du seuil K du platine introduit (P) par une exposition de 30 μ M de CDDP pendant 6 heures pour les cellules SQ20B et 1 μ M pendant 6 heures pour les IGROV1.

Ces résultats montrent que le taux de CDB est 1.5 fois plus important pour les cellules IGROV1 irradiées au-dessus du seuil K du platine et exposées à une concentration 30 fois moins importante de CDDP en comparaison des SQ20B. Après une durée de réparation de 4 heures à 37°C, le taux de CDB restant dans les cellules IGROV est 3.2 fois plus élevé pour l'irradiation au-dessus que pour celle en dessous du seuil K, contre un facteur 2 pour les cellules SQ20B.

Ces résultats sont encourageants et il serait très intéressant de tester les modifications de survie cellulaire de la lignée IGROV après exposition au CDDP et stimulation photonique résonante externe du platine.

V.3.2.4.3. Priver les lignées BRCA1 déficientes de tout mode de réparation des lésions :

Le mode d'action très spécifique du CDDP qui bloque les systèmes de réparation cellulaires par suture nous a conduit à nous demander comment réagiraient des lignées cellulaires déficientes dans l'autre mode de réparation, la recombinaison homologue.

Pour ce faire, l'activité de la tyrosine kinase c-Abl a été mesurée, à la fois chez les cellules SQ20B et HCC1937 (BRCA1 mutée) traitées ou non avec 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiées par 16 Gy de rayonnement d'énergie supérieure ou inférieure au seuil K

du platine. La phosphorylation de la protéine BRCA1, qui permet la formation d'un complexe, avec entre autres RAD51, pour réparer par recombinaison homologue les dégâts à l'ADN, entraîne la rupture de son association entre la tyrosine kinase c-Abl. L'activité de cette dernière augmente donc avec la phosphorylation de la protéine BRCA1 et constitue un indicateur indirect de la mise en œuvre des systèmes de réparation par recombinaison homologue. A l'inverse, cette même activité c-Abl apparaît également comme un indicateur de blocage de la recombinaison homologue dans des lignées cellulaires BRCA1 mutée, pour lesquelles le complexe BRCA1-c-Abl n'est jamais actif. Ces dernières lignées cellulaires, dérivant généralement de cancers du sein ou de l'ovaire, ne peuvent donc utiliser cette voie de réparation [Moyn99]. La phosphorylation de BRCA1 peut intervenir après l'action de radiations ionisantes, mais également après l'agression par des drogues de chimiothérapie comme le CDDP, ce qui peut laisser envisager un éventuel effet additif [Bhat00, Scul97].

Ci-dessous sont présentés les résultats de l'étude de l'influence de choix de l'énergie d'irradiation sur l'activité c-Abl des cellules SQ20B (non mutée BRCA1) et HCC1937 (mutée BRCA1) traitées au CDDP (Figure V-43). La modification d'activité de c-Abl visible pour la lignée cellulaire SQ20B lorsque l'énergie d'irradiation est choisie légèrement supérieure ou inférieure au seuil K du platine n'est pas reproduite sur la lignée HCC1937. L'hyperphosphorylation de BRCA1 après traitement des cellules SQ20B par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiation au-dessus du seuil K du platine n'est donc pas mise en œuvre pour la lignée BRCA1 mutée, qui ne peut pas non plus réparer ses lésions par suture NHEJ du fait du blocage de ce type de réparation par le CDDP.

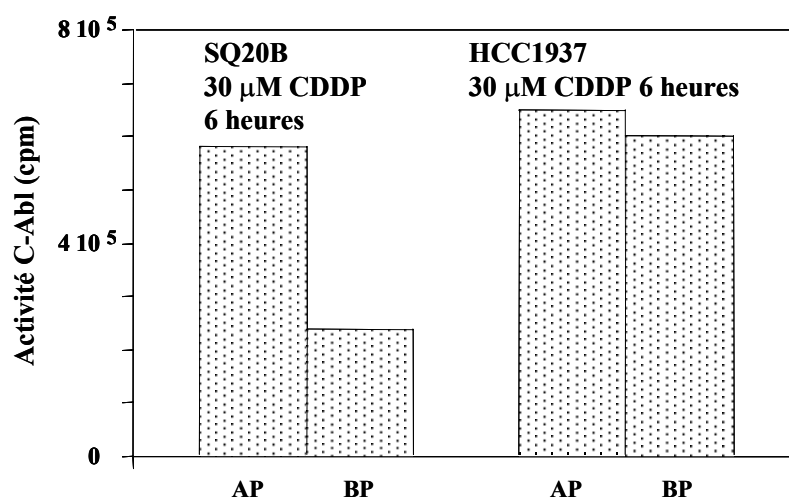


Figure V-43 : Activité de la tyrosine kinase c-Abl pour les cellules SQ20B et HCC1937 exposées à 30 μ M de CDDP et irradiées par 16 Gy de rayons X d'énergie légèrement supérieure (AP) ou inférieure (BP) au seuil K du platine. La période de réparation après irradiation est de 4 heures.

V.3.3. Vectorisation d'un atome lourd au sein de l'ADN : propriétés et contraintes fondamentales

Que ce soit avec l'analogue de base thymidine de l'ADN marqué à l'iode stable, le cisplatine ou le chloroterpyridine platinum, la principale difficulté dans cette approche d'excitation par stimulation photonique externe d'événements létaux est de parvenir à introduire des quantités suffisantes d'atomes lourds dans l'ADN génomique des cellules cancéreuses, sans toutefois être trop cytotoxique pour pouvoir observer *in vitro* les conséquences du traitement étudié.

Les stratégies de vectorisation sont aujourd'hui au cœur de l'actualité des traitements anticancéreux. De nombreuses molécules sont étudiées pour qu'elles puissent spécifiquement reconnaître des cellules cancéreuses, quelle que soit leur localisation, et les agresser avec suffisamment d'intensité pour faire régresser l'évolution tumorale sans toutefois causer des dommages trop importants aux tissus sains environnants [O'Do96b]. A ce jour, malgré les efforts développés pour synthétiser de tels composés, aucun ne remplit correctement l'ensemble de ces critères et c'est ce qui limite notamment l'efficacité des radiopharmaceutiques marqués avec des émetteurs Auger [Hans00]. Si un tel agent miracle existait (la « magic bullet » des américains), s'il était effectivement capable à la fois de reconnaître une cellule tumorale, de pénétrer son ADN pour la détruire, alors la radiothérapie anticancéreuse n'existerait probablement plus car la thérapie génique serait parvenue à ses fins.

Le problème du choix de l'agent vecteur a été le point clé de notre étude. Intégrer des atomes lourds au cœur de l'ADN est un vaste problème en soi, surtout lorsque l'intégrité cellulaire doit être préservée afin d'étudier indépendamment l'effet de l'irradiation. Toutefois, si ce challenge est correctement relevé, la stimulation photonique externe d'ionisations sur ces hétéroatomes sera très agressive pour les cellules tumorales. Les taux de cassures de brins de l'ADN sera plus important car l'énergie sera directement et uniquement déposée au niveau de la cible de radiosensibilité cellulaire, l'ADN. De plus, l'intrusion d'atomes lourds dans l'intimité des cellules tumorales en modifiera ses réactions et pourra bloquer une partie de ses mécanismes de défense et de réparation naturels.

V.4. SYNTHÈSE DES RESULTATS : REFLEXION AUTOUR DE L'INTERET DE L'EVENEMENT TYPE K EN IMAGERIE ET EN RADIOTHERAPIE

Finaleme nt, il a été montré dans le cadre de cette thèse que l'éjection par effet photoélectrique des électrons de la couche la plus interne du cortège électronique d'un élément lourd était favorable pour optimiser le contraste radiologique et créer une atténuation du rayonnement primaire suffisamment importante pour pouvoir doser les quantités d'éléments lourds présentes. Le passage d'une énergie d'excitation photonique légèrement inférieure à une énergie légèrement supérieure au seuil K permet d'obtenir un gain en terme de dose absorbée et de létalité cellulaire. Mais nous avons montré expérimentalement que ce gain est modeste en comparaison du contraste de dépôt d'énergie qu'il est possible d'obtenir à d'autres énergies, correspondant à l'optimum de réponse entre les tissus chargés en éléments lourds (de manière microscopique ou macroscopique) et les tissus non enrichis. Même si ces valeurs d'énergies optimales ne sont pas forcément singulières mais correspondent plutôt à une gamme d'énergies pouvant s'étendre sur plusieurs dizaines de keV, le rayonnement synchrotron demeure l'outil idéal pour étudier l'augmentation de létalité générée par cette radiothérapie binaire, renforçant de manière optimale l'effet photoélectrique dans des tissus tumoraux chargés en éléments lourds par rapport aux tissus sains adjacents.

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but de cette thèse a été de développer les méthodes associées à un concept original en radiothérapie anticancéreuse : augmenter l'efficacité létale des rayons X de basses énergies, grâce à une interaction photoélectrique ciblée, par rayonnement synchrotron, sur un agent pharmacologique situé dans le proche voisinage des cellules tumorales ou à l'intérieur de celles-ci.

Comme pour tout type de radiothérapie binaire, nécessitant la présence d'un composé dans la tumeur pour produire l'effet recherché, la détermination précise des quantités d'agents pharmacologiques présents au moment de l'irradiation est la première donnée essentielle à la planification dosimétrique du traitement. La connaissance de l'ampleur de l'effet en est la seconde. Ces deux impératifs constituent les deux piliers de ce travail.

Ainsi nous avons participé à la démonstration de la faisabilité de la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron. Du fait de la monochromaticité du rayonnement synchrotron, les images tomodensitométriques obtenues après soustraction de deux images, prises dans des conditions énergétiques ou temporelles différentes, peuvent être converties en cartographies résolues en concentration d'agent de contraste, pour l'iode comme pour le gadolinium. Sur un modèle de rat porteur de gliome, il a été montré que la SRCT permettait la

détermination précise *in vivo* des quantités d'agents de contraste présents dans le système de néoangiogenèse tumorale. Du fait de la perméabilité anormale du réseau sanguin tumoral, les prises de contraste des gliomes de rats, préalablement injectés avec des produits de contraste iodé ou paramagnétique à base de gadolinium, ont été étudiées. Même si les agents de contraste à base de gadolinium ne sont à l'heure actuelle pas suffisamment concentrés pour permettre d'augmenter le contraste aux rayons X, aux doses d'injections cliniques, ils constitueraient néanmoins une excellente alternative aux agents iodés, plus néphrotoxiques. Les études cinétiques réalisées avec du Gadovist[®], agent de contraste molaire, montre qu'il possède des caractéristiques de diffusion semblables au Magnevist[®], héli-molaire. L'extrapolation des données pré-cliniques recueillies chez le rat aux conditions cliniques nous laisse penser que des concentrations intra-tumorales de 1 à 10 mg d'iode ou de gadolinium par cm³ de tissu cérébral doivent être possibles.

Pour mesurer l'effet létal de la présence de ces agents de contraste lors d'une irradiation par des rayons X monoénergétiques, deux modèles enrichis en éléments lourds ont été étudiés. Le dosimètre chimique de Fricke, dopé par des agents de contraste iodé ou baryté, n'a pas donné lieu à une augmentation de sensibilité directement corrélée aux probabilités de dépôt d'énergie par effet photoélectrique. Nous avons montré en effet, que les phénomènes chimiques, engendrés par l'introduction d'iode, masquaient l'augmentation de dose recherchée. Une forte augmentation de la sensibilité du gel de Fricke aux basses énergies de rayons X après introduction de sulfate de baryum a toutefois été mise en évidence. Ainsi, à 50 keV, 10 mg/ml de baryum permet d'augmenter d'un facteur 8 la réponse du gel sous irradiation.

L'utilisation d'une lignée de cellules humaines tumorales (SQ20B) comme dosimètre biologique a permis de montrer plus efficacement l'augmentation de l'effet létal des rayons X de basses énergies. L'augmentation de la létalité a été mesurée comme étant proportionnelle à la quantité d'agent de contraste iodé présente dans le milieu de culture et dépendant de l'énergie d'irradiation, mais moins élevée que le laissaient prévoir nos modèles théoriques, sûrement trop simples pour appréhender les phénomènes impliqués dans toute leur complexité.

Les expériences réalisées *in vitro* ont montré que le gain de létalité cellulaire provoquée par une irradiation par rayons X d'énergie légèrement supérieure au seuil K de l'iode est modeste en comparaison du gain qu'il est possible d'obtenir à des énergies plus élevées. Ainsi à l'optimum énergétique, i.e. 50 keV, la présence de 10 mg d'iode par ml de

milieu de culture permet de diminuer d'un facteur 2 la dose de rayons X nécessaire pour réduire la survie clonogénique à 10% par rapport aux cellules contrôles.

En vectorisant les atomes lourds, cibles de l'interaction photoélectrique, directement au cœur de l'ADN, la probabilité de générer des événements létaux d'emblée pour la cellule augmente. Les cascades d'électrons Auger et les remaniements électroniques suivant l'ionisation des atomes ciblés par l'irradiation sont à l'origine de ce phénomène. Il a été montré que le pré-traitement des cellules SQ20B pendant 48 heures par 10 μ M d'IUdR, analogue de base thymidine de l'ADN, permet d'obtenir un gain de radiosensibilisation 30% plus important à 50 keV que celui lié à la présence de 10 mg/ml d'iode extracellulaire dans le milieu de culture pour la même énergie. La combinaison des deux approches a conduit à la mise en évidence d'un effet supra-additif, laissant envisager des modes d'actions complémentaires. Ces irradiations de cellules, ayant incorporé de l'iode dans leur ADN, ont été réalisées pour la première fois à des énergies différentes de celles situées de part et d'autre du seuil K de l'iode. Elles ont confirmé que, même à l'échelle microscopique, un optimum d'énergie d'irradiation existe, et qu'il est une fois de plus situé à 50 keV.

En tentant de transporter par l'intermédiaire du cisplatine, des atomes de platine au contact de l'ADN des cellules tumorale SQ20B, nous nous sommes confrontés à des problèmes de chimiotoxicité de cette drogue sur cette lignée cellulaire. Ces effets ont probablement participé à masquer un effet de radiosensibilisation due à l'interaction entre les atomes de platine et le rayonnement sur la survie cellulaire. En effet, cette absence d'effet ne pouvait pas être expliquée par l'absence de platine dans les cellules, qui a été contrôlée par spectrométrie de masse, ni par sa localisation intranucléaire, qui a été imagée par SR-XRF. En augmentant la toxicité du traitement, à la fois en terme de doses de rayons X et d'exposition à la drogue, et en se plaçant également dans des conditions idéales (où les systèmes de réparations cellulaires étaient inopérants), il a toutefois été montré que l'irradiation juste en dessus du seuil K du platine conduit à la création de cassures simple et double brins en surnombre. De plus, ces dernières sont plus complexes et plus lentement réparées pour cette énergie, toujours en comparaison de l'énergie située en dessous du seuil. La présence du cisplatine conduit à une inhibition de l'activité DNA-pK et à une importante relocalisation des protéines RAD51, actrices de la réparation des cassures de brins d'ADN par recombinaison homologe, d'ordinaire minoritaire chez l'homme. Au-dessus du seuil K, les cellules pré-traitées par 30 μ M de CDDP pendant 6 heures et irradiés par 10 Gy de rayons X d'énergie supérieure au seuil K du platine affichent deux fois plus de *foci* RAD51 par cellule que si l'irradiation avait eu lieu en dessous du seuil. Par contre le nombre de cellules avec *foci*

RAD51 n'est pas affecté par ce changement d'énergie, même si la combinaison du cisplatine et de l'irradiation l'augmente par rapport aux témoins. L'ensemble de ces résultats montre qu'à l'échelle moléculaire l'activation résonante du platine transporté dans l'ADN des cellules humaines tumorales SQ20B conduit à la formation de dommages multiples et très localisés, réparés par le mode le plus fidèle de réparation des dommages à l'ADN, la recombinaison.

Les perspectives d'un tel travail sont nombreuses :

Pour la tomographie quantitative par rayonnement synchrotron, les expériences précliniques devraient être étendues à de nouveaux modèles d'animaux, de taille plus importante. Un suivi de l'évolution de tumeurs traitées par des facteurs anti-angiogéniques pourrait constituer un bon modèle expérimental. D'autre part, un protocole de recherche clinique est tout à fait envisageable sur ce projet et entrerait parfaitement dans le cadre d'une étude comparative avec les techniques utilisées en IRM. Il nous fournirait en outre une excellente base de donnée concernant les quantités d'iode ou de gadolinium susceptibles de se concentrer dans les tumeurs cérébrales de haut grade.

Ce tomodensitomètre sophistiqué deviendrait un système possédant l'avantage extraordinaire de permettre dans le même temps de vérifier la position de la cible, d'imager en temps réel la tumeur, tant sur le plan anatomique que fonctionnel, et enfin de la traiter. La présence de l'agent de contraste dans le réseau vasculaire tumoral permettrait d'atteindre ce triple objectif, par l'augmentation des probabilités d'interaction par effet photoélectrique.

Si les énergies de rayons X synchrotron ne semblent actuellement plus idéales en clinique, la tendance actuelle de disposer voire de superposer les deux types d'informations, anatomique et fonctionnelle, pour planifier le traitement dosimétrique rendrait un tel outil très attrayant, permettant de s'affranchir des problèmes de recalage d'images largement évoqués dans la littérature. De plus le contrôle en temps réel du positionnement des tumeurs et du dosage de leur contenu en éléments lourds serait un atout majeur pour garantir la qualité de l'irradiation et prédire ses effets.

Cette idée devra être validée *in vivo* sur des modèles animaux avant qu'un essai clinique de phase I-II puisse être envisagé pour traiter des patients porteurs de lésions métastatiques ou primitives cérébrales en rechute locale. Une vérification préalable du comportement *in vivo* des agents de contraste avec de telles doses de rayons X devra être étudiée.

Pour optimiser encore l'effet de cette radiothérapie binaire par rayonnement synchrotron, il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie les mécanismes d'action

d'un élément lourd localisé au cœur de l'ADN en association avec une irradiation monochromatique, à l'énergie idéale pour obtenir un effet létal maximum à l'échelle cellulaire. La compréhension des phénomènes moléculaires observés est difficile et des simulations de Monte-Carlo devraient être mises en place pour élucider l'origine des événements observés : Électrons Auger ? Recombinaison de charges ? Ré-absorption de la fluorescence ? Photoélectrons ? L'origine de l'augmentation des cassures double-brins demeure mystérieuse. Un modèle physique devrait être mis en place pour prédire les conséquences de ce type d'irradiation résonante sur la survie cellulaire.

In vitro, d'autres lignées cellulaires et d'autres composés platinés (PtTC) ou non (gadolinium texaphyrin [Bern00, Vial99, You96]) pourraient être étudiés pour trouver le tiercé gagnant (cible, agent pharmacologique, énergie d'irradiation). Un vaste domaine d'investigation s'ouvre dans le domaine fondamental pour progresser dans la compréhension des phénomènes mis en jeu. Bien évidemment, quelques combinaisons peuvent d'ores et déjà être testées *in vivo* sur un modèle animal porteur de tumeur cérébrale.

De manière plus générale, ce travail ouvre la voie à des concepts intéressants de sélection génotypique des tumeurs candidates pour un tel traitement. Connaître le génotype des tumeurs avant leur traitement anticancéreux est une problématique des plus actuelle grâce au progrès des biotechnologies post-génomiques (PCR, RT-PCR, Transcriptome,...). La radiothérapie pourrait profiter de cette information qui permettrait d'ajuster finement les modalités du traitement. Ainsi des mutations au niveau des gènes BRCA1 ou BRCA2 associées à un traitement au cisplatine (ce qui permettrait de bloquer tous les systèmes de réparation cellulaire tumorale) pourrait constituer un traitement spécifique pour ces tumeurs.

Le rayonnement synchrotron est sans aucun doute l'outil idéal pour étudier et optimiser l'ensemble des paramètres impliqués dans cette modalité thérapeutique. Il est néanmoins intéressant de se demander quelles pourraient en être les retombées cliniques. Les techniques de curiethérapie pourraient constituer un domaine direct d'application : en effet, les sources radioactives sont quasi-monochromatiques et sont directement implantées au cœur des tumeurs. La présence d'agents pharmacologiques lourds dans le proche voisinage permettrait d'augmenter l'efficacité biologique létale de cette technique d'irradiation, si l'association rayons γ – agents pharmacologiques est judicieusement choisie.

Enfin, en dehors des rayons X et des rayons γ , nous pensons que ce type d'approche doit pouvoir parfaitement se transposer à d'autres particules, directement ionisantes. Ainsi aucune approche similaire n'a été réellement développée avec les faisceaux d'ions lourds, de protons ou d'électrons. Des « capteurs d'interactions physiques » pourraient être placés

spécifiquement dans des lieux stratégiques de la viabilité des cellules tumorales, pour augmenter significativement les dégâts moléculaires générés par l'irradiation et la rendre biologiquement plus efficace.

VII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [Adam77] **Adams F.H., Norman A., Mello R.S. and Bass D.**
Effect of radiation and contrast media on chromosomes. Preliminary report.
Radiology **124** (3): 823-826 (1977)
- [Adel93] **Adelstein S.J.**
Merill C. Sosm ecture. The Auger process : a therapeutic promise?
Am. J. Roentgenol. **160** (4): 707-713 (1993)
- [Albe89] **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D.**
Biologie moléculaire de la cellule.
Médecine-Sciences, Flammarion. Paris. (1989)
- [Alla88] **Allard A., Doucet D., Kien P., Bonnemain B. and Caillé J.M.**
Experimental study of DOTA-gadolinium pharmacokinetics and pharmacologic properties.
Invest. Radiol. **23**: S271-S274 (1988)
- [Alta99] **Altarelli M., Schlachter F. and Cross J.**
Les nouvelles sources de rayons X.
Pour la science **256**: 74-81 (1999)
- [Aro94] **Aronen H.J., Gazit I.E., Louis D.N., Buchbinder B.R., Pardo F.S., Weisskoff R.M., Harsh G.R., Cosgrove G.R., Halpern E.F. and Hochberg F.H.**
Cerebral blood volume maps of gliomas: comparison with tumor grade and histologic findings.
Radiology **191** (1): 41-51 (1994)

- [Auge25] **Auger P.**
Sur les rayons β secondaires produits dans un gaz des rayons X.
Compt. Rend. **180**: 65-68 (1925)
- [Axel80] **Axel L.**
Cerebral flow determination by rapid-sequence computed tomography.
Radiology **137**: 679-686 (1980)
- [Azur92] **Azure M.T., Sastry K.S.R., Archer R.D., Howell R.W. and Rao D.V.**
Microscale synthesis of carboplatin labeled with the Auger emitter platinum-193m: radiotoxicity versus chemotoxicity of the antitumor drug in mammalian cells.
In *Biophysical aspects of Auger processes*; R. Howell, V. Narra, K. Sastry and D. Rao eds., American Institute of physics, Woodbury, NY. p. 336-351 (1992)
- [Badi95] **Badie C., Iliakis G., Foray N., Alsbeih G., Pantellias G.E., Okayasu R., Cheong N., Russell N.S., Begg A.C. and Arlett C.F.**
Defective repair of DNA double-strand breaks and chromosome damage in fibroblasts from a radiosensitive leukemia patient.
Cancer Res. **55** (6): 1232-1234 (1995)
- [Bald98] **Baldock C., Burford R.P., Billingham N., Wagner G.S., Patval S., Badawi R.D. and Keevil S.F.**
Experimental procedure for the manufacture and calibration of polyacrylamide gel (PAG) for magnetic resonance imaging (MRI) radiation dosimetry.
Phys. Med. Biol. **43**: 695-702 (1998)
- [Bald99] **Baldock C., Murry P. and Kron T.**
Uncertainty analysis in polymer gel dosimetry.
Phys. Med. Biol. **44** (11): N243-N246 (1999)
- [Balo97] **Balosso J.**
Mécanismes radiobiologiques des associations concomitantes radiothérapie-poisons de topoisomérase II.
Thèse, Institut d'hématologie, Paris VII, 277 p. (1997)
- [Bar85] **Barat H.A., Laverick M. and Nias A.H.W.**
The radiomimetic properties of a platinum drug.
Br. J. Radiol. **58**: 51-62 (1985)
- [Bara91] **Baranowska-Kortylewicz J., Makrigiorgos G.M., Van den Abbeele A.D., Berman R.M., Adelstein S.J. and Kassis A.I.**
5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine in the radiotherapy of an early ascites tumor model.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **21** (6): 1541-1551 (1991)
- [Barb01] **Barber P.R., Vojnovic B., Kelly J., Mayes C.R., Boulton P., Woodcock M. and Joiner M.C.**
Automated counting of mammalian cell colonies.
Phys. Med. Biol. **46**: 63-76 (2001)
- [Bare68] **Barendsen R.W.**
Responses of cultured cells, tumors and normal tissues to radiation of different linear energy transfer.
Curr. Top. Radiat. Res. Quarterly **4**: 293-356 (1968)
- [Bart90a] **Barth R.F., Soloway A.H. and Fairchild R.G.**
Boron neutron capture therapy for cancer.
Scientific American. **263** (4): 100-107 (1990)

- [Bart90b] **Barth R.F., Soloway A.H. and Fairchild R.G.**
Boron neutron capture therapy of cancer.
Cancer Res. **50** (4): 1061-1070 (1990)
- [Bart98] **Barth R.F.**
Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT2 and CNS-1 gliomas.
J. Neurooncol. **36** (1): 91-102 (1998)
- [Baum96] **Baumann P., Benson F.E. and West S.C.**
Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro.
Cell **87**: 757-766 (1996)
- [Baya01] **Bayat S., Le Duc G., Porra L., Berruyer G., Nemoz C., Monfraix S., Fiedler S., Thomlinson W., Suortti P., Standertskjöld-Nordenstam C.G. and Sovijärvi A.R.A.**
Quantitative functional lung imaging with synchrotron radiation using inhaled xenon as contrast agent.
Phys. Med. Biol. **46**: 3287-3299 (2001)
- [Bedf91] **Bedford J.S.**
Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **21** (6): 1457-1469 (1991)
- [Bén85] **Bénard J., Da Silva J., De Blois M.C., Boyer P., Duvillard P., Chiric E. and Riou G.**
Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice.
Cancer Res. **45**: 4970-4975 (1985)
- [Bena86] **Benabib A.L., Rémy C. and Chauvin C.**
Experimental model of rat brain tumors by stereotactic injection of C6 glioma and HTC hepatoma cell lines.
In *Biology of brain tumors*; M.D. Walker and D.G.T. Thomas eds., Marinus Nijhoff, Amsterdam, Netherlands. p. 221-226 (1986)
- [Bend71] **Benda P., Someda K., Messer J. and Sweet W.**
Morphological and immunochemical studies of rats glial cells in tumors and clonal strains propagated in tissue culture.
J. Neurosurg. **34**: 310-323 (1971)
- [Ber97] **Berger B., Fischer C.O., Lawaczek R., Platzk J., Schwartz-Porsche D. and Semmler W.**
Neutron capture therapy (NCT) with a macrocyclic Gd-complex.
In *Advances in neutron capture therapy (Chemistry and Biology)*; B. Larsson, J. Crawford and R. Weinreich eds., Elsevier Science, **II**: p. 440-446 (1997)
- [Berg99] **Berger M.J., Coursey J.S. and Zucker M.A.**
ESTAR, PSTAR, and ASTAR: Computer Programs for Calculating Stopping-Power and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions (version 1.21), [Online]. Available: <http://physics.nist.gov/Star>.
National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. 24 April 1997. (1999)
- [Bern00] **Bernhard E.J., Mitchell J.B., Deen D., Cardell M., Rosenthal D.I. and Brown J.M.**
Re-evaluating gadolinium(III) texaphyrin as a radiosensitizing agent.
Cancer Res. **60** (1): 86-91 (2000)
- [Bhat00] **Bhattacharyya A., Ear U.S., Koller B.H., Weichselbaum R.R. and Bishop D.K.**
The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of RAD51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin.
J. Biol. Chem. **275**: 23899-23903 (2000)

- [Biag83] **Biaglow J.E. and Varnes M.E.**
The role of thiols in cellular response to radiation and drugs.
Radiat. Res. **95**: 437-455 (1983)
- [Bish00a] **Bishayee A., Rao D.V., Bouchet L.G., Bolch W.E. and Howell R.W.**
Protection by DMSO against cell death caused by intracellularly localized iodine-125, iodine-131 and polonium-210.
Radiat. Res. **153** (4): 416-427 (2000)
- [Bish00b] **Bishayee A., Rao D.V. and Howell R.W.**
Radiation protection by cysteamine against the lethal effects of intracellularly localized Auger electron, α - and β -particle emitting radionuclides.
Acta Oncol. **39** (6): 713-720 (2000)
- [Bist99] **Biston M.C.**
Le dosimètre de Fricke: étalonnage et effet Auger.
Grenoble I, Université Joseph Fourier rapport de maitrise de chimie-physique , 45 p. (1999)
- [Bist00] **Biston M.C.**
Etude expérimentale de la mesure par analyse d'images de la survie cellulaire après traitement par activation photonique.
Toulouse III, 18 Septembre 2000, Université Paul Sabatier rapport de DEA, 46 p. (2000)
- [Bohi01a] **Bohic S., Simionovici A., Snigirev A., Ortega R., Devès G., Heymann D. and Schroer C.G.**
Synchrotron hard x-ray microprobe: Fluorescence imaging of single cells.
Appl. Phys. Lett. **78** (22): 3544-3546 (2001)
- [Bohi01b] **Bohic S., Simionovici A., Ortega R., Heymann D., Schroer C.G. and Snigirev A.**
Synchrotron-induced X-ray microfluorescence on single cells.
Nucl. Instr. Meth. B **181**: 728-733 (2001)
- [Boon96] **Boone J.M. and Chavez A.E.**
Comparison of x-ray cross sections for diagnostic and therapeutic medical physics.
Med. Phys. **23** (12): 1997-2005 (1996)
- [Brac93] **Brachman D.G., Beckett M., Graves D., Haraf D., Vokes E. and Weichselbaum R.R.**
p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines.
Cancer Res. **53**: 3667-3669 (1993)
- [Brad97] **Bradshaw K.M., Schweitzer M.P., Hadley J.R. and Hendee S.P.**
In vivo quantitation of boron using MRI.
In *Advances in neutron capture therapy (Chemistry and Biology)*; C.J. Larsson B, Weinreich R eds., Elsevier Science, **II**: p. 640-644 (1997)
- [Bren89] **Brenner D.J., Geard C.R. and Hall E.J.**
Mössbauer cancer therapy doubts.
Nature **339** (6221): 185-186 (1989)
- [Cagn75] **Cagnac B. and Pebay-Peyroula J.C.**
Physique atomique.
Collection Dunod Université. Paris. 602 p. (1975)
- [Call79] **Callisen H.H., Norman A. and Adams F.H.**
Absorbed dose in the presence of contrast agents during pediatric cardiac catheterization.
Med. Phys. **6** (6): 504-509 (1979)

- [Carl94] **Carlsson J., Gedda L., Grönvik C., Hartman T., Lindström A., Lindström P., Lundqvist H., Löfqvist A., Malmqvist J., Olsson P., Essand M., Pontén J., Sjöberg S. and Westermark B.**
Strategy for boron neutron capture therapy against tumor cells with over-expression of the epidermal growth factor-receptor.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys **30** (1): 105-115 (1994)
- [Carm00] **Carmeliet P. and Jain R.K.**
Angiogenesis in cancer and other diseases.
Nature **407** (14): 249-257 (2000)
- [Ceni00] **Cenic A., Nabavi D.G., Craen R.A., Gelb A.W. and Lee T.Y.**
A CT method to measure haemodynamics in brain tumors: validation and application of cerebral blood flow maps.
Am. J. Neuroradiol. **21**: 462-470 (2000)
- [Chad76] **Chadwick H.K., Leenhouts H.P., Szumiel I. and Nias A.H.W.**
An analysis of the interaction of a platinum complexe and radiation with CHO cells using the molecular theory of cell survival.
Int. J. Radiat. Biol. **30**: 511-524 (1976)
- [Chang98] **Chang E.L., Loeffler J.S., Riese N.E., Wen P.Y., Alexander E., Black P.M. and Coleman C.N.**
Survival results from a phase I study of etanidazole (SR2508) and radiotherapy in patients with malignant glioma.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **40** (1): 65-70 (1998)
- [Chap92] **Chapman D., Moulin H. and Garrett R.F.**
Monochromator harmonic content measurements and calculations at energies above 20 keV.
IEEE Trans. Nucl. Sci. **1**: 30 (1992)
- [Chap97] **Chapman D., Thomlinson W., Johnston R.E., Washburn D., Pisano E., Gmür N., Zhong Z., Menk R., Arfelli F. and Sayers D.**
Diffraction enhanced x-ray imaging.
Phys. Med. Biol. **42**: 2015-2025 (1997)
- [Char96] **Charvet A.M., Le Bas J.F., Elleaume H., Schultze C., Suortti P. and Spanne P.**
Medical applications of synchrotron radiation at the ESRF.
Proceedings of *international school of physics « Enrico Fermi » Course CXXVIII*, IOS press Amsterdam: 355-377 (1996)
- [Charl81] **Charlton D.E. and Booz J.**
A Monte-Carlo treatment of the decay of ¹²⁵I.
Radiat. Res. **87** (1): 10-23 (1981)
- [Chau99] **Chauvet B., Oozeer R., Bey P., Pontvert D. and Bolla M.**
Conformal radiotherapy of prostatic cancer: a general review.
Cancer Radiother. **3** (5): 393-406 (1999)
- [Che99] **Chen C.F., Chen P.L., Zhong Q., Sharp Z.D. and Lee W.H.**
Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G2/M checkpoint control.
J. Biol. Chem. **274**: 32931-32935 (1999)
- [Chen90] **Chen J.R., Chao E.C.T., Minkin J.A., Back J.M., Jones K.W., Rivers M.L. and Sutton S.R.**
The uses of synchrotron radiation sources for elemental and chemical micro-analysis.
Nucl. Instru. Meth. Phys. Res. **B49**: 533-543 (1990)

- [Chol01] **Cholewa M., Dillon C., Lay P., Phillips D., Talarico T. and Lai B.**
High resolution nuclear and X-ray microprobes and their applications in single cell analysis.
Nucl. Instr. Meth. B **181**: 715-722 (2001)
- [Chu98] **Chu W.C., Guo W.Y., Wu M.C., Chung W.Y. and Pan D.H.**
The radiation induced magnetic resonance image intensity change provides a more efficient three-dimensional dose measurement in MRI-Fricke-agarose gel dosimetry.
Med. Phys. **25** (12): 2326-2332 (1998)
- [Code98] **Coderre J.A., Chanana A.D., Joel D.D., Elowitz E.H., Micca P.L., Nawrocky M.M., Chadha M., Gebbers J.O., Shady M., Peress N.S. and Slatkin D.N.**
Biodistribution of boronophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity.
Radiat. Res. **149** (2): 163-170 (1998)
- [Comm80] **Commerford S.L., Bond V.P., Conkrite E.P. and Reincke U.**
Radiotoxicity of intranuclear ^{125}I atoms not bound to DNA.
Int. J. Radiat. Biol. **37** (5): 547-554 (1980)
- [Coop97] **Cooper G.M.**
The Cell: A molecular approach.
ASM Press. Washington, VA, USA. 673 p. (1997)
- [Cord01] **Corde S., Bohic S., Ducros V., Elleaume H., Estève F., Joubert A., Le Bas J.,F. Thomlinson W.C. and Balosso J.**
Cellular radiosensitivity enhancement by incorporation and photon-stimulation of platinum: importance of drug incorporation.
Proceedings of *Workshop on medical Applications of synchrotron radiation*, Grenoble, France: abstract p.77 (2001)
- [Cull89] **Cullen D.E., Chen M.H., Hubbell J.H., Perkins S.T., Pletchaty E.F., Rathkopf J.A. and Scofield J.H.**
Tables and graphs of photon-interaction cross sections from 10 eV to 100 GeV derived from the LLNL evaluated atomic data library (EADL), Z=1-100.
Lawrence Livermore National Laboratory Publication. UCRL-50400, vol. 6 (1989)
- [Dahl92] **Dahlberg W.K. and Little J.B.**
Differential sensitization of human tumor cells by ara-A to X irradiation and its relationship to inherent radioresponse.
Radiat. Res. **130**: 303-308 (1992)
- [Daws87] **Dawson P., Penhaligon M., Smith E. and Saunders J.**
Iodinated contrast agents as "radiosensitizers".
Br. J. Radiol. **60** (710): 201-203 (1987)
- [DeDe01] **De Deene Y. and De Wagter C.**
Artefacts in multi-echo T_2 imaging for high precision gel dosimetry: III. Effects of temperature drift during scanning.
Phys. Med. Biol. **46**: 2697-2711 (2001)
- [Dewi87] **Dewit L.**
Combined treatment of radiation and cis-diamminedichloroplatinum (II) : a review of experimental and clinical data.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **13**: 403-426 (1987)

- [Dilm91] **Dilmanian F.A., Garrett R.F., Thomlinson W.C., Berman L.E., Chapman L.D., Hastings J.B., Luke P.N., Oversluizen T., Siddons D.P., Slatkin D.N., Stojanoff V., Thompson A.C., Volkow N.D. and Zeman H.D.**
Computed tomography with monochromatic X-rays from the National Synchrotron Light Source.
Nucl. Instr. Methods B **56-57**: 1208-1213 (1991)
- [Dilm97] **Dilmanian F.A., Wu X.Y., Parsons E.C., Ren B., Kress J., Button T.M., Chapman L.D., Coderre J.A., Giron F., Green berg D., Krus D.J., Liang Z., Marcovici S., Petersen M.J., Roque C.T., Schleifer M., Slatkin D.N., Thomlinson W.C., Yamamoto K. and Zhong Z.**
Single- and dual-energy CT with monochromatic synchrotron x-rays.
Phys. Med. Biol. **42**: 371-387 (1997)
- [Disc91] **Dische S.**
Hypoxia and local tumour control. Part 2.
Radiother. Oncol. **20 Suppl 1**: 9-11 (1991)
- [Dix95] **Dix W.R.**
Intravenous coronary angiography with synchrotron radiation.
Prog. Biophys. Mol. Biol. **63** (2): 159-191 (1995)
- [Doup80] **Douple E.B. and Richmond R.C.**
A review of interactions between platinum coordination complexes and ionizing radiation: Implications for cancer therapy.
In *Cisplatin, current status and new developements*; A.W. Prestayko, S.T. Crooke and S.K. Carter eds., Academic Press, Orlando. p. 125-147 (1980)
- [Duva98] **Duvauchelle P.**
Tomographie par diffusion rayleigh et compton avec un rayonnement synchrotron: application à la pathologie cérébrale.
Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble, 239 p. (1998)
- [East90] **Eastman A.**
Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system.
Cancer cells **2** (8): 275-280 (1990)
- [Ehrl93] **Ehrlich S.D., Bierne H., D'Alençon E., Vilette D., Petranovic M., Noirot P. and Michel B.**
Mechanisms of illegitimate recombination.
Gene **135**: 161-166 (1993)
- [Elki59] **Elkind M.M. and Sutton H.**
X-Ray damage and recovery in mammalian cells in culture.
Nature **184**: 1293-1295 (1959)
- [Elle97] **Elleume H., Charvet A.M. and LeBas J.F.**
The synchrotron beam, a new dimension for contrast media research ?
Acta Radiologica suppl n°412:: 29-41 (1997)
- [Elle99] **Elleume H., Charvet A.M., Berkvens P., Berruyer G., Brochard T., Dabin Y., Dominguez M.C., Draperi A., Fiedler S., Goujon G., Le Duc G., Mattenet M., Nemoz C., Perez M., Renier M., Schulze C., Spanne P., Suortti P., Thomlinson W., Estève F., Bertrand B. and Le Bas J.F.**
Instrumentation of the ESRF Medical Imaging Facility.
Nucl. Instr. Methods A **428**: 513-527 (1999)
- [Elle00a] **Elleume H., Charvet A.M., Le Duc G., Estève F., Bertrand B., Corde S., Farion R., Lefaix J.L., Leplat J.J., Berkvens P., Berruyer G., Brochard T., Dabin Y., Draperi A., Fiedler S., Nemoz C., Perez M., Renier M., Suortti P., Thomlinson W. and LeBas J.F.**
In vivo K-edge imaging with synchrotron radiation.
Cell. Mol. Biol. **46** (6): 1065-1075 (2000)

- [Elle00b] **Elleau H., Fiedler S., Estève F., Bertrand B., Charvet A.M., Berkvens P., Berruyer G., Brochard T., Le Duc G., Nemoz C., Rénier M., Suortti P., Thomlinson W. and LeBas J.F.**
First human transvenous coronary angiography at the European synchrotron radiation facility.
Phys. Med. Biol. **45** (9): L39-L43 (2000)
- [Elle01] **Elleau H., Corde S., Adam J.F., Joubert A., Charvet A.M., Balosso J., Le Bas J.F. and Estève F.**
Radiation dose enhancement in tumors loaded with iodine: potential advantages of synchrotron radiation.
Proceedings of *Workshop on medical Applications of synchrotron radiation*, Grenoble, France: Abstract p. 33 (2001)
- [Epst92] **Epstein A.H., Cook J.A., Goffman T. and Glatstein E.**
Tumour radiosensitization with the halogenated pyrimidines 5'-bromo- and 5'-iododeoxyuridine.
Br. J. Radiol. **24** (suppl.): 209-214 (1992)
- [Ertl70] **Ertl H.H., Feinendegen L.E. and Heiniger H.J.**
Iodine-125, a tracer in cell biology : physical properties and biological aspects.
Phys. Med. Biol. **15** (3): 447-456 (1970)
- [Este02] **Estève F., Elleau H., Bertrand B., Charvet A.M., Fiedler S., Le Duc G., Corde S., Nemoz C., Renier M., Lefaix J.L., Leplat J.J., Suortti P., Thomlinson W. and LeBas J.F.**
Coronary angiography with synchrotron X-Ray source on pigs after iodine or gadolinium intravenous injection.
Acad. Radiol. **9** (suppl. 1): S92-S97 (2002)
- [Ev01] **Evans S.M., Hahn S.M., Magarelli D.P., Zhang P.J., Jenkins W.T., Fraker D.L., Hsi R.A., McKenna W.G. and Koch C.J.**
Hypoxia in human intraperitoneal and extremity sarcomas.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **49** (2): 587-596 (2001)
- [Eva85] **Evans R.D.**
The atomic nucleus.
Krieger publishing compagny. Malabar, FL, USA. 972 p. (1955)
- [Evan88] **Evans A.C., Beil C., Marett S., Thompson C.J. and Hakim A.**
Anatomical-functional correlation using an adjustable MRI-based region of interest atlas with positron emission tomography.
J. Cereb. Blood Flow Metab. **8**: 513-530 (1988)
- [Fair82] **Fairchild R.G., Brill A.B. and Ettinger K.V.**
Radiation enhancement with iodinated deoxyuridine.
Invest. Radiol. **17**: 407-416 (1982)
- [Fair84] **Fairchild R.G. and Bond V.P.**
Photon Activation Therapy.
Strahlentherapie **160**: 758-763 (1984)
- [Fair85] **Fairchild R.G., Laster B.H., Commerford S.L., Furcinitti F.S., Sylvester B., Gabel D., Popenoe E. and Foster S.**
Photon activation therapy with ^{127}I -deoxyuridine : measurement of dose enhancement in cultured mammalian cells.
Workshop on Photon Activation Therapy, Upton, NY, April 18, 1985, Brookhaven National Laboratory rapport BNL 51997, p. 1-16 (1985)

- [Fair87a] **Fairchild R.G.**
Contribution to radiation enhancement from Auger cascades (letter).
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **13** (8): 1262-1263 (1987)
- [Fair87b] **Fairchild R.G., Kalef-Ezra J., Packer S., Wielopolski L., Laster B.H., Robertson J.S., Mausner L. and Kanellitsas C.**
Samarium-145: a new brachytherapy source.
Phys. Med. Biol. **32** (7): 847-858. (1987)
- [Fair90] **Fairchild R.G., Kahl S.B., Laster B.H., Kalef-Ezra J. and Popenoe E.A.**
In vitro determination of uptake, retention, distribution, biological efficacy, and toxicity of boronated compounds for neutron capture therapy : a comparison of porphyrins with sulfhydryl boron hydrides.
Cancer Res. **50** (16): 4860-4865 (1990)
- [Faja96] **Fajac A., Da Silva J., Ahomadegbe J.C., Rateau J.G., Bernaudin J.F., Riou G. and Bénard J.**
Cisplatin-induced apoptosis and p53 gene status in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line.
Int. J. Cancer **68** (1): 67-74 (1996)
- [Falk01] **Falk M.H. and Issels R.D.**
Hyperthermia in oncology.
Int. J. Hyperthermia **17** (1): 1-18 (2001)
- [Far00] **Farajollahi A.R., Bonnett D.E., Tattam D. and Green S.**
The potential use of polymer gel dosimetry in boron neutron capture therapy.
Phys. Med. Biol. **45**: N9-N14 (2000)
- [Fara94] **Faraggi M., Gardin I., deLabriolle-Vaylet C., Moretti J.L. and Bok B.D.**
The influence of tracer localization on the electron dose rate delivered to the cell nucleus.
J. Nucl. Med. **35** (1): 113-119 (1994)
- [Feat99] **Featherstone C. and Jackson S.P.**
Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions?
Mutat. Res. **434** (1): 3-15 (1999)
- [Fein71] **Feinendegen L.E., Ertl H.H. and Bond V.P.**
Biological toxicity associated with the Auger effect.
Proceedings of *Symposium on Biophysical aspects of radiation quality*, IAEA: 419-443 (1971)
- [Fich85] **Fichtinger-Schepman A.M., van der Veer J.L., den Hartog J.H., Lohman P.H. and Reedijk J.**
Adducts of the anti-tumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification and quantification.
Biochemistry **24** (3): 707-713 (1985)
- [Fied00] **Fiedler S., Elleaume H., Le Duc G., Nemoz C., Brochard T., Rénier M., Bertrand B., Estève F., Le Bas J.F., Suortti P. and Thomlinson W.**
Dual-energy coronary angiography in pigs using a Gd contrast agent.
Proceedings of *SPIE Medical Imaging 2000*, San Diego, California: 96-103 (2000)
- [Folk95] **Folkman J.**
Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases.
Nature & Medicine **1** (1): 27-31 (1995)
- [Folk96] **Folkman J.**
Fighting cancer by attacking its blood supply.
Sci. Am. **275** (3): 150-154 (1996)

- [Fora97a] **Foray N., Priestley A., Alsbeih G., Badie C., Capulas E.P., Arlett C.F. and Malaise E.P.**
Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks.
Int. J. Radiat. Biol. **72** (3): 271-283 (1997)
- [Fora97b] **Foray N., Arlett C.F. and Malaise E.P.**
Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: A closer look.
Biochimie **79**: 567-575 (1997)
- [Fora97c] **Foray N.**
Cassures double-brin de l'ADN, cassures chromosomiques et radiosensibilité des cellules humaines.
Thèse, Faculté de médecine de Paris Sud, Paris XI, 171 p. (1997)
- [Fora99] **Foray N., Randrianarison V., Marot D., Perricaudet M., Lenoir G. and Feunteun J.**
Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2.
Oncogene **18** (51): 7334-7342 (1999)
- [Fora02] **Foray N., Marot D., Randrianarison V., Dalla Venezia N., Picard D., Perricaudet M., Favaudon V. and Jeggo P.A.**
Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation.
Mol. Cell. Biol. **22**: 4020-4032 (2002)
- [Fra01] **Franken N.A., Van_Bree C., Veltmaat M.A., Rodermond H.M., Haveman J. and Barendsen G.W.**
Radiosensitization by bromodeoxyuridine and hyperthermia: analysis of linear and quadratic parameters of radiation survival curves of two human tumor cell lines.
J. Radiat. Res. (Tokyo) **42** (2): 179-190 (2001)
- [Fran89] **Frankenberg-Schwager M.**
Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation.
Radioth. Oncol. **14**: 307-320 (1989)
- [Fran90] **Frankenberg-Schwager M. and Frankenberg D.**
DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast.
Int. J. Radiat. Biol. **58** (4): 569-575 (1990)
- [Fric27] **Fricke H. and Morse S.**
The chemical action of Roentgen rays on dilute ferrous sulphate solutions as a measure of dose.
Am. J. Roentgenol. Radium Therapy Nucl. Med. **18**: 430-432 (1927)
- [Fu85] **Fu K.K.**
Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy.
Cancer **55** (9 Suppl): 2123-2130 (1985)
- [Fuku99] **Fukuda H., Honda C., Wadabayashi N., Kobayashi T., Yoshino K., Hiratsuka J., Takahashi J., Akaizawa T., Abe Y., Ichihashi M. and Mishima Y.**
Pharmacokinetics of ¹⁰B-p-boronophenylalanine in tumours, skin and blood of melanoma patients: a study of boron neutron capture therapy for malignant melanoma.
Melanoma Res. **9** (1): 75-83 (1999)
- [Gamb94] **Gambarini G., Arrigoni S., Cantone M.C., Molho N., Facchielli L. and Sichirollo A.E.**
Dose-response curve slope improvement and result reproductibility of ferrous-sulphate-doped gels analysed by NMR imaging.
Phys. Med. Biol. **39**: 703-717 (1994)

- [Gamb00] **Gambarini G., Agosteo S., Marchesi P., Nava E., Palazzi P., Pecci A., Rosi G. and Tinti R.**
Discrimination of various contributions to the absorbed dose in BNCT: Fricke-gel imaging and intercomparison with other experimental results.
Appl. Radiat. Iso. **53**: 765-772 (2000)
- [Gard96] **Gardin I., Faraggi M., Huc E. and Bok B.D.**
Absorbed fraction to the cell nucleus for low energy electrons.
Acta Oncol. **35** (7): 953-958 (1996)
- [Gier99] **Gierada D.S. and Bae K.T.**
Gadolinium as a CT Contrast agent: Assessment in a porcine model.
Radiology **210**: 829-834 (1999)
- [Gill70] **Gillespie F.C., Orr J.S. and Greig W.R.**
Microscopic dose distribution from I-125 in the toxic thyroid gland and its relation to therapy.
Br. J. Radiol. **43**: 40-47 (1970)
- [Gira97] **Girard F., Fukuda H., Nakamura H., Yamamoto K. and Yoshida K.**
MR imaging of a rat tumor with 10B carborane gadolinium complex.
In *Advances in neutron capture therapy (Chemistry and Biology)*; B. Larsson, J. Crawford and R. Weinreich eds., Elsevier Science, **II**: p. 271-275 (1997)
- [Gira99] **Giraud J.Y., Cohard C., Dusserre A., Vassal P., Bolla M., Troccaz J., Cinquin P., Menguy Y., Grand S., Esteve F. and Le Bas J.F.**
The use of semi-customized phantom for verification of conformal plans.
Med. Dosim. **24** (3): 183-188 (1999)
- [Godd96] **Goddu S.M., Narra V.R., Harapanhalli R.S., Howell R.W. and Rao D.V.**
Radioprotection by DMSO against the biological effects of incorporated radionuclides in vivo - Comparison with other radioprotectors and evidence for indirect action of Auger electrons.
Acta Oncol. **35** (7): 901-907 (1996)
- [Gum02] **Gum F., Scherer J., Bogner L., Solleder M., Rhein B. and Bock M.**
Preliminary study on the use of an inhomogeneous anthropomorphic Fricke gel phantom and 3D magnetic resonance dosimetry for verification of IMRT treatment plans.
Phys. Med. Biol. **47**: N67-N77 (2002)
- [Hall72] **Hall E.J.**
Radiation dose-rate: a factor of importance in radiobiology and radiotherapy.
Br. J. Radiol. **45**: 81-97 (1972)
- [Halp74] **Halpern A. and Stöcklin G.**
A radiation chemical resonance effect in solid 5-bromodeoxyuridine; chemical consequences of the Auger effect.
Radiat. Res. **58** (3): 329-337 (1974)
- [Halp78] **Halpern A. and Mutze B.**
Irradiation of micro-organisms with mono-energetic X-Rays; Biological consequences of the Auger effect.
Int. J. Radiat. Biol. **34** (1): 67-72 (1978)
- [Hans00] **Hanson R.N.**
Synthesis of Auger electron-emitting radiopharmaceuticals.
Curr. Pharm. Des. **6** (14): 1457-1468 (2000)
- [Hata94] **Hatanaka H. and Nakagawa Y.**
Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **28** (5): 1061-1066 (1994)

- [Hepw99] **Hepworth S.J., McJury M., Oldham M., Morton E.J. and Doran S.J.**
Dose mapping of inhomogeneities positioned in radiosensitive polymer gels.
Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A **422**: 756-760 (1999)
- [Herm89] **Herman G.T., Lewitt R.M., Ohdner D. and Rowland S.W.**
SNARK, a programming system for image reconstruction from projections, Medical imaging processing group, Department of radiology, University of Pennsylvania, Philadelphia (1989)
- [Hewi59] **Hewitt H.B. and W. W.C.**
A survival curve for mammalian cells irradiated in vivo.
Nature **183**: 1060-1061 (1959)
- [Hofe71] **Hofer K.G. and Hughes W.L.**
Radiotoxicity of intranuclear tritium, 125 iodine and 131 iodine.
Radiat. Res. **47** (1): 94-101 (1971)
- [Howe92] **Howell R.W.**
Radiation spectra for Auger-electron emitting radionuclides : report 2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No 6.
Med. Phys. **19** (6): 1371-1383 (1992)
- [Howe94] **Howell R.W., Kassis A.I., Adelstein S.J., Rao D.V., Wright H.A., Hamm R.N., Turner J.E. and Sastry K.S.**
Radiotoxicity of platinum-195m-labeled trans-platinum (II) in mammalian cells.
Radiat. Res. **140** (1): 55-62 (1994)
- [Hubb97] **Hubbell J.H. and Seltzer S.M.**
Tables of X-Ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy-Absorption Coefficients (version 1.02), [Online] Available: <http://physics.nist.gov/xaamdi>.
National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. 24 April 1997. (1997)
- [Hubb99] **Hubbell J.H.**
Review of photon interaction cross section data in the medical and biological context.
Phys. Med. Biol. **44**: R1-R22 (1999)
- [Humm88a] **Humm J.L. and Charlton D.E.**
Double strand breakage in DNA produced by the photoelectric interaction with incorporated 'cold' murine.
In *DNA damage by Auger electron emitters*; K. Baverstock and D. Charlton eds., Taylor & Francis, London. p. 111-122 (1988)
- [Humm88b] **Humm J.**
Therapy by photon activation?
Nature **336** (3201): 710-711 (1988)
- [Humm89] **Humm J.L. and Charlton D.E.**
A new calculational method to assess the therapeutic potential of Auger electron emission.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **17** (2): 351-360 (1989)
- [Ibbo97] **Ibbott G.S., Maryanski M.J., Eastman P., Holcomb S.D., Zhang Y., Avison R.G., Sanders M. and Gore J.C.**
Three-dimensional visualization and measurement of conformal dose distribution using magnetic resonance imaging of BANG gel dosimeters.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **38**: 1097-1103 (1997)
- [ICRU44] **ICRU**
Tissue Substitutes in Radiation Dosimetry and Measurement.
Bethesda, MD, International Commission on Radiation Units and Measurements rapport 44 (1989)

- [ICRU50] **ICRU**
Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy.
Bethesda, MD, International Commission on Radiation Units and Measurements rapport 50 (1993)
- [Ilia89] **Iliakis G. and Kurtzman S.**
Keynote adress: application of non-hypoxic cell sensitizers in radiobiology and radiotherapy: rationale and future prospects.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **16**: 1235-1241 (1989)
- [Ilia91a] **Iliakis G.**
The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells.
Bioessays **13** (12): 641-648 (1991)
- [Ilia91b] **Iliakis G.E., Cicilioni O. and Metzger L.**
Measurement of DNA double-strand breaks in CHO at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis : calibration by means of ¹²⁵I decay.
Int. J. Radiat. Biol. **59**: 343-357 (1991)
- [Iwam87] **Iwamoto K.S., Cochran S.T., Winter J., Holburt E., Higashida R.T. and Norman A.**
Radiation dose enhancement therapy with iodine in rabbit VX-2 brain tumors.
Radiother. Oncol. **8** (2): 161-170 (1987)
- [Iwam90] **Iwamoto K.S., Norman A., Kagan A.R., Wollin M., Olch A., Bellotti J., Ingram M. and Skillen R.G.**
The CT scanner as a therapy machine.
Radiother. Oncol. **19** (4): 337-343 (1990)
- [Iwam93] **Iwamoto K.S., Norman A., Freshwater D.B., Ingram M. and Skillen R.G.**
Diagnosis and treatment of spontaneous canine brain tumors with a CT scanner.
Radiother. Oncol. **26** (1): 76-78 (1993)
- [Jaco53] **Jacobson B.**
Dichromatic absorption radiography:dichromography.
Acta. Radiol. **39**: 437 (1953)
- [Jenn74] **Jennette K.W., Lippard S.J., Vassiliades G.A. and Bauer W.R.**
Metallointercalation reagents. 2-hydroxyethanethiolato(2,2',2''-terpyridine)-platinum(II) monocation binds strongly to DNA by intercalation.
Proc. Nat. Acad. Sci. **71** (10): 3839-3843 (1974)
- [John53] **Johns H.E. and Cunningham J.R.**
The physics of radiology.
C.C. Thomas eds., Springfield, Illinois. 796 p. (1953)
- [Jöns96] **Jönsson A.C., Jönsson B.A., Strand S.E., Grafström G. and Spanne P.**
Cell survival after Auger electron emission from stable intracellular indium exposed to monochromatic synchrotron radiation.
Acta Oncol. **35** (7): 947-952 (1996)
- [Joub01] **Joubert A.**
Contribution à l'étude de l'application des agents renforceurs de l'effet photo-électrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse.
Grenoble I, Université Joseph Fourier rapport de DEA, 30 p. (2001)
- [Kage97] **Kageji T., Nakagawa Y., Kitamura K., Matsumoto K. and Hatanaka H.**
Pharmacokinetics and boron uptake of BSH (Na₂B₁₂H₁₁SH) in patients with intracranial tumors.
J. Neurooncol. **33** (1-2): 117-130 (1997)

- [Kap61] **Kaplan H.S., Smith K.C. and Tomlin P.**
Radiosensitization of E. Coli by purine and pyrimidine analogues incorporated in deoxyribonucleic acid.
Nature **190**: 794-796 (1961)
- [Karn99] **Karnas S.J., Yu E., McGarry R.C. and Battista J.J.**
Optimal photon energies for IUDR K-edge radiosensitization with filtered X-ray and radioisotope sources.
Phys. Med. Biol. **44** (10): 2537-2549 (1999)
- [Karr00] **Karran P.**
DNA double strand breaks repair in mammalian cells.
Curr. Opin. Genet. Dev. **10**: 144-150 (2000)
- [Kasa98] **Kasai S., Nagasawa H., Kuwasaka H., Oshodani T., Nishioka A., Ogawa Y., Yoshida S., Inayama S., Inomata T. and Hori H.**
TX-1877: design, synthesis, and biological activities as a BRM-functional hypoxic cell radiosensitizer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **42** (4): 799-802 (1998)
- [Kass96] **Kassis A.I., Tumei S.S., Wen P.Y., Baranowska-Kortylewicz J., Van den Abeele A.D., Zimmerman R.E., Carvahlo P.A., Garada B.M., DeSisto W.C., Bailey N.O., Castronovo F.P.J., Mariani G., Black P.M. and Adelstein S.J.**
Intratumoral administration of 5-[¹²³I]iodo-2'-deoxyuridine in a patient with a brain tumor.
J. Nucl. Med. **37** (supplément 4): 19S-22S (1996)
- [Kass99] **Kassis A.I., Dahman B.A. and Adelstein S.J.**
In vivo therapy of neoplastic meningitis with methotrexate and 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine.
Proceedings of 4th international symposium on Biophysical aspects of Auger processes, Lund, Sweden: 48 (1999)
- [Kass00a] **Kassis A.I., Walicka M.A. and Adelstein S.J.**
Double-strand break yield following ¹²⁵I decay: Effects of DNA conformation.
Acta Oncol. **39** (6): 721-726 (2000)
- [Kass00b] **Kassis A.I., A. D.B. and Adelstein S.J.**
In vivo therapy of neoplastic meningitis with methotrexate and 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine.
Acta Oncol. **39** (6): 731-737 (2000)
- [Keal99] **Keall P. and Baldock C.**
A theoretical study of the radiological properties and water equivalence of Fricke and polymer gels used for radiation dosimetry.
Australas. Phys. Eng. Sci. Med. **22** (3): 85-91 (1999)
- [Khan01] **Khanna K.K. and Jackson S.P.**
DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.
Nat. Genet. **27**: 247-250 (2001)
- [Kinn93] **Kinno Y., Odagiri K., Andoh K., Itoh Y. and Tarao K.**
Gadopentate dimeglumine as an alternative contrast material for use in angiography.
Am. J. Radiol. **160**: 1293-1294 (1993)
- [Kins98] **Kinsella T.J., Kunugi K.A., Vielhuber K.A., Potter D.M., Fitzsimmons M.E. and Collins J.M.**
Preclinical evaluation of 5-iodo-2-pyrimidinone-2'-deoxyribose as a prodrug for 5-iodo-2'-deoxyuridine-mediated radiosensitization in mouse and human tissues.
Clin. Cancer Res. **4** (1): 99-109 (1998)

- [Klec85] **Klecker R.W., Jenkins J.F., Kinsella T.J., Fine R.L., Strong J.M. and Collins J.M.**
Clinical pharmacology of 5-iodo-2'-deoxyuridine and 5-iodouracil and endogenous pyrimidine modulation.
Clin. Pharmacol. Ther. **38** (1): 45-51 (1985)
- [Koba02] **Kobayashi K., Frohlich H., Usami N., Takakura K. and Le Sech C.**
Enhancement of X-Ray-Induced Breaks in DNA Bound to Molecules Containing Platinum: A Possible Application to Hadrontherapy.
Radiat. Res. **157**: 32–37 (2002)
- [Krau79] **Krause M.O.**
Atomic radiative and radiationless yields for K and L shell.
J. Phys. Chem. Ref. Data **8**: 307-327 (1979)
- [Kron93] **Kron T., Metcalfe P. and Pope J.M.**
Investigation of the tissue equivalence of gels used for NMR dosimetry.
Phys. Med. Biol. **38**: 139-150 (1993)
- [Krug77] **Kruger R.A., Riederer S.J. and Mistretta C.A.**
Relative properties of tomography, K-edge imaging and K-edge tomography.
Med. Phys. **4** (3): 244-249 (1977)
- [La89] **Larson D., Bodell W.J., Ling C., Phillips T.L., Schell M., Shrieve D. and Troxel T.**
Auger electron contribution to bromodeoxyuridine cellular radiosensitization.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **16** (1): 171-176 (1989)
- [Lais98] **Laissie J.A., Geiser G., Spanne P.O., Dilmanian F.A., Gebbers J.O., Geiser M., Wu X.Y., Makar M.S., Micca P.L., Nawrocky M.M., Joel D.D. and Slatkin D.N.**
Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated x-rays.
Int. J. Cancer **78**: 654-660 (1998)
- [Lars94] **Larsson B.**
The new radiations in cancer therapy.
In *Hadrontherapy in Oncology*; U. Amaldi and B. Larsson eds., Elsevier science, p. 33-44 (1994)
- [Lass79] **Lassen N.A. and Perl W.**
Tracer kinetic methods in medical physiology.
Raven Press. New York. (1979)
- [Last92a] **Laster B.H.**
Binary systems for the improvement of cancer therapy :biological efficacy of the Auger effect in iodine; therapeutic advantage of low dose rate irradiations; iododeoxyuridine as a radiosensitizer to protons.
Diss. Abstr. Int. **52** (11): 5702 (1992)
- [Last92b] **Laster B.H., Thomlinson W.C., Kalef-Ezra J., Benary V., Popenoe E.A., Bond V.P., Gordon C., Warkentien L., Gmür N., Lazarz N. and Fairchild R.G.**
The biological efficacy of induced Auger cascades: comparison of iodine and bromine as target atoms.
In *Biophysical aspects of Auger processes*; R.W. Howell, V.R. Narra, K.S.R. Sastry and D.V. Rao eds., American Institute of physics, Woodbury, NY. p. 91-105 (1992)
- [Last93] **Laster B.H., Thomlinson W.C. and Fairchild R.G.**
Photon activation of iododeoxyuridine : biological efficacy of Auger electrons.
Radiat. Res. **133** (2): 219-224 (1993)

- [Last01] **Laster B.H., Thomlinson W., Siddons P. and Shani G.**
Auger Electron Therapy: Overcoming the DNA target size problem.
Proceedings of *Workshop on medical Applications of synchrotron radiation*, Grenoble, France: Abstract p. 28 (2001)
- [LeBa85] **Le Bas J.F., Charvet A.M., Elleaume H., Bertrand B., Estève F., Spanne P. and Suortti P.**
Une nouvelle source de rayons X pour la recherche en imagerie médicale et en radiothérapie: le rayonnement synchrotron.
Bull. Cancer **82** (5): 544-548 (1985)
- [LeDu96] **Le Duc G.**
Mécanismes d'action et applications d'un agent de contraste superparamagnétique pour l'imagerie par résonance magnétique nucléaire.
Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble I, 263 p. (1996)
- [LeDu99] **Le Duc G., Péoc'h M., Rémy C., Charpy O., Muller R.N., Le Bas J.F. and Décorps M.**
Use of T2-weighted susceptibility contrast MRI for mapping the blood volume in the rat brain bearing a glioma.
Magn. Res. Med. **42**: 754-761 (1999)
- [LeDu00] **Le Duc G., Corde S., Elleaume H., Esteve F., Charvet A.M., Brochard T., Fiedler S., Collomb A. and Le Bas J.F.**
Feasibility of synchrotron radiation computed tomography on rats bearing glioma after iodine or gadolinium injection.
Eur. Radiol. **10** (9): 1487-1492 (2000)
- [Legg99] **Leggett D.A., Miles K.A. and Kelley B.B.**
Blood-brain barrier and blood volume imaging of cerebral glioma using functional CT: a pictorial review.
Eur. J. Radiol. **30** (3): 185-190. (1999)
- [Lepa01] **Lepage M., Jayasakera P.M., Bäck S.A.J. and Baldock C.**
Dose resolution optimization of polymer gel dosimeters using different monomers.
Phys. Med. Biol. **46**: 2665-2680 (2001)
- [LeSe96] **Le Sech C., Frohlich H., Saint-Marc C. and Charlier M.**
DNA breakage upon K-shell excitation of phosphorus as a model for direct effects in radiation biology.
Radiat. Res. **145**: 632-635 (1996)
- [LeSe00] **Le Sech C., Takakura K., Saint-Marc C., Frohlich H., Charlier M., Usami N. and Kobayashi K.**
Strand Break Induction by Photoabsorption in DNA-Bound Molecules.
Radiat. Res. **153** (4): 454-458 (2000)
- [LeSe01] **Le Sech C., Takakura K., Saint-Marc C., Frohlich H., Charlier M., Usami N. and Kobayashi K.**
Enhanced Strand Break Induction of DNA by resonant metal-innershell photoabsorption.
Can. J. Physiol. Pharmacol. **79**: 196-200 (2001)
- [Litt73] **Little J.B.**
Factors influencing the repair of potentially lethal radiation damage in growth-inhibited human cells.
Radiat. Res. **56**: 320-333 (1973)
- [Lope00] **Lopes R.T., Costa E.B. and de Jesus E.F.O.**
Computed tomography with monochromatic bremsstrahlung radiation.
Appl. Radiat. Isotop. **53**: 665-671 (2000)

- [MacM93] **MacMillan T.J. and Steel G.G.**
Molecular aspects of radiation biology.
In *Basic clinical radiobiology*; G.G. Steel eds., Edward Arnold, London. p. 211-224 (1993)
- [Maez88] **Maezawa H., Hieda K., Kobayashi K., Furusawa Y., Mori T., Susuki M. and Ito T.**
Effects of monoenergetic X-Rays with resonance energy of bromine K-absorption edge on bromouracil-labelled E. Coli cells.
Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. **53** (2): 301-308 (1988)
- [Maez99] **Maezawa H., Furusawa Y., Kobayashi K., Imamiya S. and Mori T.**
Lethality on V79 cells of monoenergetic X-rays on the K-shell photoabsorption peak of phosphorus.
Proceedings of 4th international symposium on Biophysical aspects of Auger processes, Lund, Sweden: 29 (1999)
- [Mair00] **Mairs R.J., Wideman C.L., Angerson W.J., Whateley T.L., Reza M.S., Reeves J.R., Robertson L.M., Neshasteh-Riz A., Rampling R., Owens J., Allan D. and Graham D.I.**
Comparison of different methods of intracerebral administration of radioiododeoxyuridine for glioma therapy using a rat model.
Br. J. Cancer **82** (1): 74-80 (2000)
- [Makr92] **Makrogiorgos G.M., Berman R.M., Baranowska-Kortylewicz J., Bump E., Humm J.L., Adelstein S.J. and Kassis A.I.**
DNA damage produced in V79 cells by DNA-incorporated iodine-123 : a comparison with iodine-125.
Radiat. Res. **129** (3): 309-314 (1992)
- [Mala86] **Malaise E.P., Fertil B., Chavaudra N. and Guichard M.**
Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: comparison of *in vitro* and *in vivo* data.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **13**: 617-624 (1986)
- [Mary93] **Maryanski M.J., Gore J.C., Kennan R.P. and Schultz R.J.**
NMR relaxation enhancement in gels polymerized and cross-linked by ionizing radiations : a new approach to 3D dosimetry by MRI.
Magn. Reson. Imaging. **11**: 253-258 (1993)
- [Mary96] **Maryanski M.J., Ibbott G.S., Eastman P., Schultz R.J. and Gore J.C.**
Radiation therapy dosimetry using magnetic resonance imaging of polymer gels.
Med. Phys. **23** (5): 699-705 (1996)
- [Mats80] **Matsudaira H., Ueno A.M. and Furuno I.**
Iodine contrast medium sensitizes cultured mammalian cells to X-rays but not to gamma rays.
Radiat. Res. **84** (1): 144-148 (1980)
- [Mell83] **Mello S.R., Callisen H., Winter J., Kagan A.R. and Norman A.**
Radiation dose enhancement in tumors with iodine.
Med. Phys. **10** (1): 75-78 (1983)
- [Mesa99] **Mesa A.V., Norman A., Solberg T.D., Demarco J.J. and Smathers J.B.**
Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents.
Phys. Med. Biol. **44** (8): 1955-1968 (1999)
- [Micha84] **Michalowski A.**
A critical appraisal of clonogenic survival assays in the evaluation of radiation damage to normal tissues.
Radiother. Oncol. **1** (3): 241-246 (1984)

- [Mil87a] **Miller R.W., DeGraff W., Kinsella T.J. and Mitchell J.B.**
Evaluation of incorporated iododeoxyuridine cellular radiosensitization by photon activation therapy.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **13** (8): 1193-1197 (1987)
- [Mil87b] **Miller R.W., DeGraff W., Mitchell J.B. and Kinsella T.J.**
Photon activation therapy (PAT) [letter].
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **13** (9): 1429 (1987)
- [Mile99] **Miles K.A.**
Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review.
Eur. J. Radiol. **30** (3): 198-205 (1999)
- [Mill88] **Mills R.L., Walter C.W., Venkataraman L., Pang K. and Farrell J.J.**
A novel cancer therapy using a Mössbauer-isotope compound.
Nature **336** (6201): 787-789 (1988)
- [Mist90] **Mistretta C.**
Time and energy subtraction techniques in digital radiography.
Physica Medica **VI** (3-4): 149-154 (1990)
- [Mitc98] **Mitchell G., Kron T. and Back M.**
High dose behind inhomogeneities during medium-energy x-ray irradiation.
Phys. Med. Biol. **43** (5): 1343-1350 (1998)
- [Moec00] **Moeckli R., Verdun F.R., Fiedler S., Pachoud M., Schnyder P. and Valley J.F.**
Objective comparison of image quality and dose between conventional and synchrotron radiation mammography.
Phys. Med. Biol. **45** (12): 3509-3523 (2000)
- [Moul93] **Moulin H., Suortti P. and Schulze C.**
Angiography beamline at the ESRF.
Physica Medica **9**: 161-164 (1993)
- [Mous00] **Moustacchi E.**
DNA damage and repair: consequences on dose-responses.
Mutat. Res. **464** (1): 35-40 (2000)
- [Moyn99] **Moynahan M.E., Chiu J.W., Koller B.H. and Jasin M.**
Brc1 controls homology-directed DNA repair.
Mol. Cell. **4** (4): 511-518 (1999)
- [Myin02] **Myint W.K., Ng C. and Raaphorst G.P.**
Examining the non-homologous repair process following cisplatin and radiation treatments.
Int. J. Radiat. Biol. **78** (5): 417-424 (2002)
- [Nach92] **Nachaliel E., Dilmanian F.A., Garrett R.F., Thomlinson W.C., Chapman L.D., Gmur N.F., Lazarz N., Moulin H., Rivers M., Rarback H., Stefan P.M. and Spanne P.**
Monochromatic computed tomography of the brain using synchrotron X-rays: technical feasibility.
Nucl. Instr. Methods **319**: 305-310 (1992)
- [Namb95] **Nambu K., Susuki R. and Hirakawa K.**
Cerebral blood flow: measurement with Xenon-enhanced dynamic helical CT.
Radiology **195**: 53-57 (1995)

- [Narr94] **Narra V.R., Harapanhalli R.S., Howell R.W., Sastry K.S. and Rao D.V.**
Vitamins as radioprotectors in vivo : I. Protection by vitamin C against internal radionuclides in mouse testes : implications to the mechanism of the Auger effect.
Radiat. Res. **137** (3): 394-399 (1994)
- [Nath87] **Nath R., Bongiorno P. and Rockwell S.**
Enhancement of IUDR radiosensitization by low energy photons.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **13** (7): 1071-1079 (1987)
- [Nath90] **Nath R., Bongiorno P., Rossi P.I. and Rockwell S.**
Enhanced IUDR radiosensitization by ^{241}Am photons relative to ^{226}Ra and ^{125}I photons at 0,72 Gy/h.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **18**: 1377-1385 (1990)
- [Nesh98] **Neshasteh-Riz A., Mairs R.J., Angerson W.J., Stanton P.D., Reeves J.R., Rampling R., Owens J. and Whelton T.E.**
Differential cytotoxicity of [^{123}I]IUDR, [^{125}I]IUDR and [^{131}I]IUDR to human glioma cells in monolayer or spheroid culture : effect of proliferative heterogeneity and radiation cross-fire.
Br. J. Cancer **77** (3): 385-390 (1998)
- [Nikj98] **Nikjoo H., Uehara S., Wilson W.E., Hoshi M. and Goodhead D.T.**
Track structure in radiation biology: theory and applications.
Int. J. Radiat. Biol. **73** (4): 355-364 (1998)
- [Nor78] **Norman D., Stevens E.A., Wing S.D., Levin V. and Newton T.H.**
Quantitative aspects of contrast enhancement in cranial computed tomography.
Radiology **129**: 683-688 (1978)
- [Norm78] **Norman A., Adams F.H. and Riley R.F.**
Cytogenetic effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivatives in human lymphocytes.
Radiology **129**: 199-203 (1978)
- [Norm97] **Norman A., Ingram M., Skillen R.G., Freshwater D.B., Iwamoto K.S. and Solberg T.**
X-Ray phototherapy for canine brain masses.
Radiat. Oncol. Invest. **5** (1): 8-14 (1997)
- [Norm99] **Norman A., Mesa A.V., Solberg T.D. and Cochran S.T.**
Contrast-enhanced brachytherapy for prostate cancer.
Proceedings of *Contrast Media Research'99*, Woodstock, VT (1999)
- [Norm01] **Norman A., Cochran S.T. and Sayre J.W.**
Meta-analysis of Increases in Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes after Angiography or Excretory Urography.
Radiat. Res. **155** (5): 740-743 (2001)
- [Nowo98] **Nowotny R.**
XMuDat: Photon attenuation data on PC. Version 1.0.1 of August 1998. Online available at <http://www-nds.iaea.org/reports/nds-195.htm>.
IAEA-NDS-195 Rev 0. Pronyaev , V. G. 01/08/98. (1998)
- [Nyma02] **Nyman U., Elmståhl B., Leander P., Nilsson M., Golman K. and Almén T.**
Are gadolinium-based contrast media really safer than iodinated media for digital subtraction angiography in patients with azotemia?
Radiology **223**: 311-318 (2002)
- [O'Do96a] **O'Donoghue J.A.**
Strategies for selective targeting of Auger electron emitters to tumor cells.
J. Nucl. Med. **37** (suppl 4): 3S-6S (1996)

- [O'Do96b] **O'Donoghue J.A. and Whelton T.E.**
Targeted radiotherapy using Auger electron emitters.
Phys. Med. Biol. **41** (10): 1973-1992 (1996)
- [Oelc96] **Oelckers S. and Graeff W.**
In situ measurement of iron overload in liver tissue by dual-energy methods.
Phys. Med. Biol. **41**: 1149-1165 (1996)
- [O'ha86] **O'hara J.A., Douple E.B. and Richmond R.C.**
Enhancement of radiation-induced cell kill by platinum complexes (carboplatin and iproplatin) in V79 cells.
Int. J. Radiation. Biol. Phys. **12** (8): 1419-1422 (1986)
- [Ohts01] **Ohtsubo T., Igawa H., Saito T., Matsumoto H., Park H., Song C.W., Kano E. and Saito H.**
Enhancement of cell killing by induction of apoptosis after treatment with mild hyperthermia at 42 degrees C and cisplatin.
Radiat. Res. **156** (1): 103-109 (2001)
- [Oldh98] **Oldham M., McJury M., Baustert I.B., Webb S. and Leach M.O.**
Improving calibration accuracy in gel dosimetry.
Phys. Med. Biol. **43** (10): 2709-2720 (1998)
- [Olei94] **Oleinick N.L. and Chiu S.M.**
Nuclear and chromatin structures and their influence on the radiosensitivity of DNA.
Radiat. Prot. Dosim. **52**: 353-358 (1994)
- [Orte94] **Ortega R.**
Analyse par microsonde nucléaire de cellules tumorales: étude de la chimiorésistance au cisplatine.
Thèse, Bordeaux I, 216 p. (1994)
- [Orte96] **Ortega R., Moretto P., Fajac A., Benard J., Llabador Y. and Simonoff M.**
Quantitative mapping of platinum and essential trace metal in cisplatin resistant and sensitive human ovarian adenocarcinoma cells.
Cell. Mol. Biol. **42** (1): 77-88 (1996)
- [Palm00] **Palm A. and Mattsson O.**
Influence of sulphuric acid contaminants on Fricke dosimetry.
Phys. Med. Biol. **45**: N111-N114 (2000)
- [Patl83] **Patlak C.S., Blasberg R.G. and Fenstermacher J.D.**
Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data.
J. Cereb. Blood Flow. Metab. **3** (1): 1-7 (1983)
- [Perk91] **Perkins S.T., Cullen D.E., Chen M.H., Hubbell J.H., Rathkopf J. and Scofield J.**
Tables and graphs of atomic subshell and relaxation data derived from the LLNL evaluated atomic data library (EADL), Z=1-100.
Lawrence Livermore National Laboratory Publication. UCRL-50400, vol. 30 (1991)
- [Pomp94] **Pomplun E. and Terrissol M.**
Low-energy electrons inside active DNA models : a tool to elucidate the radiation action mechanisms.
Radiat. Environ. Biophys. **33** (4): 279-292 (1994)
- [Pomp96] **Pomplun E., Terrissol M. and Demonchy M.**
Modelling of initial events and chemical behaviour of species induced in DNA units by Auger electrons from ¹²⁵I, ¹²³I and carbon.
Acta Oncol. **35** (7): 857-862 (1996)

- [Pomp00] **Pomplun E.**
Auger electron spectra--the basic data for understanding the Auger effect.
Acta Oncol. **39** (6): 673-679 (2000)
- [Pone00] **Ponette V., Le Péchoux C., Deniaux-Alexandre E., Fernet M., Giocanti N., Tourbez H. and Favaudon V.**
Hyperfast, early cell response to ionizing radiation.
Int. J. Radiat. Biol. **76**: 1233-1243 (2000)
- [Poul98] **Poulain L., Lincet H., Duigou F., Deslandes E., Sichel F., Gauduchon P. and Staedel C.**
Acquisition of chemoresistance in a human ovarian carcinoma cell line is linked to a defect in cell-cycle control.
Int. J. Cancer **78**: 454-463 (1998)
- [Pris89] **Prise K.M., Davies S. and Michael B.D.**
Non-linear dose-effect curve for DNA double strand breaks by low LET radiation: The effect of eluting buffer composition on the measurement of breaks by the filter elution technique.
Int. J. Radiat. Biol. **56**: 943-950 (1989)
- [Prus59] **Prusof W.H.**
Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine.
Biochem. biophys. **32**: 295-296 (1959)
- [Puck56] **Puck T.T. and Marcus P.I.**
Action of X-rays on mammalian cells.
J. Exptl. Med.: 656-666 (1956)
- [Quin94] **Quinn A.D., O'Hare N.J., Wallis F.J. and Wilson G.F.**
Gd-DTPA: an alternative contrast medium for CT.
J. Comput. Assist. Tomogr. **18**: 634-636 (1994)
- [Radf85] **Radford I.R. and Hodgson G.S.**
¹²⁵I induced DNA double strand breaks: use in calibration of the neutral filter elution technique and comparison with X ray induced breaks.
Int. J. Radiat. Biol. **48** (4): 555-566 (1985)
- [Re99] **Ren M.Q., Thong P.S.P., Kara U. and Watt F.**
Single cell elemental analysis using nuclear microscopy.
Nucl. Instr. Meth. **B 150**: 179-184 (1999)
- [Ree87] **Reedjik J.**
The mechanism of action of platinum anti-tumor drugs.
Pure & Appl. Chem. **59** (2): 181-182 (1987)
- [Ree91] **Reedjik J.**
New insights about the interaction of cisplatin with intracellular components.
In *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*; S.B. Howell eds., Plenum Press, New York. p. 13-23 (1991)
- [Reed90] **Reed E. and Kohn K.W.**
Platinum analogues.
In *Cancer chemotherapy: Principles and practice*; B. Chabner and J. Collins eds., J.B. Lippincott compagny, Philadelphia. p. 465-490 (1990)
- [Reed92] **Reed E.**
Cisplatin.
In *Cancer chemotherapy and biological response modifiers*; H. Pinedo, D. Longo and B. Chabner eds., Elsevier science, p. 83-90 (1992)

- [Rich78] **Richmond R.C. and Kelman A.D.**
Effect of radiation on cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA in aqueous solution.
Br. J. Cancer **37** (suppl. III): 20-23 (1978)
- [Rich81] **Richmond R.C. and Kelman A.D.**
Effect of aqueous free radicals and cis-diamminedichloroplatinum (II) on radiation-induced base released from DNA.
Radiat. Res. **88**: 476-488 (1981)
- [Robe78] **Roberts J.J. and Fraval H.N.A.**
The interaction of antitumor platinum compounds with cellular DNA in cultured cells and animal tissues: Relationship to DNA cellular repair processes.
Biochimie **60**: 869-877 (1978)
- [Rose94] **Rose J.H., Norman A. and Ingram M.**
First experience with radiation therapy of small brain tumors delivered by a computerized tomography scanner.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **30** (Supplement I, abstract 24): 166-167+ 24-25 (1994)
- [Rose99] **Rose J.H., Norman A., Ingram M., Aoki C., Solberg T. and Mesa A.**
First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx).
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **45** (5): 1127-1132 (1999)
- [Rosen69] **Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J.E. and Mamsour V.H.**
Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents.
Nature **222** (26): 385-386 (1969)
- [Rosen85] **Rosenberg B.**
Fundamental studies with cisplatin.
Cancer **55** (10): 2303-2316 (1985)
- [Rube86] **Rubenstein E., Hofstadter R., Zeman H.D., Thompson A.C., Otis J.N., Brown G., Giacomini J.C., Gordon H., Kernoff R.S., Harrison D.C. and Thomlinson W.C.**
Transvenous coronary angiography in humans using synchrotron radiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 9724-9728 (1986)
- [Sage94] **Sage M.R. and Wilson A.J.**
The blood-brain barrier: an important concept in neuro-imaging.
Am. J. Neuroradiol. **15**: 601-622 (1994)
- [Scal99] **Scalliet P., De Pooter C., Hellemans P.W.J., De Bruijn E.A. and Van Oosterom A.T.**
Interactions entre le carboplatine, le cisplatine et les rayonnements ionisants dans une lignée cellulaire humaine de cancer ovarien.
Cancer Radioth. **3** (1): 30-38 (1999)
- [Sche96] **Schellens J.H., Ma J., Planting A.S., van der Burg M.E., van Meerten E., de Boer Dennert M., Schmitz P.I., Stoter G. and Verweij J.**
Relationship between the exposure to cisplatin, DNA-adduct formation in leucocytes and tumour response in patients with solid tumours.
Br. J. Cancer **73** (12): 1569-75 (1996)
- [Schm91a] **Schmiedl U.P., Kenney J. and Maravilla K.R.**
MRI of blood-brain barrier permeability in astrocytic gliomas: application of small and large molecular weight contrast media.
Magn. Res. Med. **22**: 288-292 (1991)

- [Schm91b] **Schmiedl U.P., Kenney J. and Maravilla K.R.**
Kinetics of pathologic blood-brain barrier permeability in an astrocytic gliomas using contrast-enhanced MR.
Am. J. Neurol. Radiol. **13**: 5-14 (1991)
- [Schmi95] **Schmitz S.A., Wagner S., Schuhmann-Giamperi G. and Wolf K.J.**
Evaluation of gadobutrol in a rabbit model as a new lanthanide contrast agent for computed tomography.
Invest. Radiol. **30** (11): 644-649 (1995)
- [Scho93] **Schortt K.R.**
The temperature dependance of G(Fe³⁺) for the Fricke dosimeter.
Phys. Med. Biol. **34** (12): 1923-1926 (1993)
- [Schu90] **Schulz R.J., deGuzman A.F., Nguyen D.B. and Gore J.C.**
Dose-response curves for Fricke-infused agarose gels as obtained by nuclear magnetic resonance.
Phys. Med. Biol. **35** (12): 1611-1622 (1990)
- [Schwa84] **Schwartz D.C. and Cantor C.R.**
Separation of yeast chromosome -sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.
Cell **37**: 67-75 (1984)
- [Scof73] **Scofield J.H.**
Theoretical photoionization cross sections from 1 to 1500 keV.
Lawrence Livermore National Laboratory Publication. UCRL-51326 (1973)
- [Scul97] **Scully R., Chen J., Ochs R.L., Keegan K., Hoekstra M., Feunteun J. and Livingston D.M.**
Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage.
Cell **90**: 425-435 (1997)
- [Selt93] **Seltzer S.M.**
Calculation of photon mass energy-transfer and mass energy-absorption coefficients.
Radiat. Res. **136**: 147-170 (1993)
- [Sgou98] **Sgouros G., O'Donoghue J.A., Larson S.M., Macapinlac H., Larson J.J. and Kemeny N.**
Mathematical model of 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine treatment : continuous infusion regimens for hepatic metastases.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **41** (5): 1177-1183 (1998)
- [Shan00] **Shangary S., Brown K.D., Adamson A.W., Edmonson S., Ng B., Pandita T.K., Yalowich J., Taccioli G.E. and Baskaran R.**
Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated Abl kinase is an ATM-dependent process.
J. Biol. Chem. **275** (39): 30163-30168 (2000)
- [Shih92] **Shih J.L. and Brugger R.M.**
Gadolinium as a neutron capture therapy agent.
Med. Phys. **19** (3): 733-744 (1992)
- [Shin84] **Shinohara K., Ito A., Hieda K., Kobayashi K. and Okada S.**
An approach to the use of synchrotron radiation for investigating radiation effects on cultured mammalian cells in the range from 160 to 254 nm.
Radiat. Res. **97** (1): 211-215 (1984)
- [Slat92] **Slatkin D.N., Spanne P., Dilmanian F.A. and Sandborg M.**
Microbeam radiation therapy.
Med. Phys. **19** (6): 1395-1400 (1992)

- [Slat94] **Slatkin D.N., Dilmanian F.A. and Spanne P.O.**
Method for microbeam radiation therapy. United State Patent, 5 339 347 (1994)
- [Slat95] **Slatkin D.N., Dilmanian F.A., Nawrocky M.M., Spanne P., Gebbers J.O., Archer D.W. and Laissue J.A.**
Design of a multislit, variable width collimator for microplanar beam radiotherapy.
Rev. Sci. Instr. **66** (2): 1459-1460 (1995)
- [Smi66] **Smith E.M., Harris C.C. and Rohrer R.H.**
Calculation of local energy deposition due to electron capture and internal conversion.
J. Nucl. Med. **7**: 10-23 (1966)
- [Smit01] **Smit B.S., Slabbert J.P., Reinecke S.A. and Bohm L.**
Comparison of cell inactivation by Auger electrons using the two reagents 4-
[¹²³I]iodoantipyrine and [¹²³I]NaI.
Radiat. Environ. Biophys. **40** (1): 47-52 (2001)
- [Smith99] **Smith G.C.M. and Jackson S.P.**
The DNA-dependent protein kinase.
Genes. Dev. **13**: 916-934 (1999)
- [Snig98] **Snigirev A., Kohn V., Snigireva I., Souvorov A. and Lengeler B.**
Focusing high-energy x rays by compound refractive lenses.
Appl. Opt. **37** (4): 653-662 (1998)
- [Solb01] **Solberg T.D. and Norman A.**
Monoenergetic X-rays improve the therapeutic ratio in X-ray phototherapy of brain tumors.
Proceedings of *Workshop on medical Applications of synchrotron radiation*, Grenoble, France: Abstract p. 29-31 (2001)
- [Solb92a] **Solberg T.D., Iwamoto K.S. and Norman A.**
Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours.
Phys. Med. Biol. **37** (2): 439-443 (1992)
- [Solb92b] **Solberg T.D., Wallace R.E., Norman A. and Iwamoto K.S.**
Synchrotron radiation for dose enhancement therapy of brain tumors.
Proceedings of *40th ann. Meeting of the radiation research society*: 55 (1992)
- [Solb95] **Solberg T.D., DeMarco J.J., Cagnon C., Smathers J.B. and Norman A.**
Dosimetry and treatment planning for X-Ray phototherapy.
Med. Phys. **22**: 968 (1995)
- [Solo94] **Soloway A.H., Barth R.F., Rong F.G., Wyzlick I.M., Tjarks W., Anisuzzaman A.K.M., Lunato A.J. and Ives D.H.**
Design of boron compounds for neutron capture therapy.
In *Hadrontherapy in Oncology*; U. Amaldi and B. Larsson eds., Elsevier Science, p. 550-554 (1994)
- [Spad94] **Spadinger I., Marples B., Matthews J. and Skov K.**
Can colony size be used to detect low-dose effects ?
Radiat. Res. **138**: S21-S24 (1994)
- [Spev01] **Spevacek V., Novotny Jr J., Dvorak P., Novotny J., Vymazal J. and Cechak T.**
Temperature dependence of polymer gel dosimeter nuclear magnetic resonance response.
Med. Phys. **28** (11): 2370-2378 (2001)

- [Spin02] **Spinosa D.J., Kaufmann J.A. and Hatwell G.D.**
Gadolinium chelates in angiography and interventional radiology: a useful alternative to iodinated contrast media for angiography.
Radiology **223**: 319-325 (2002)
- [Stac01] **Stacul F.**
Contrast media: current iodinated contrast media.
European Radiol. **11** (4): 690-697 (2001)
- [Stee79] **Steel G.G.**
Terminology in the description of drug-radiation interactions.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **5** (8): 1145-1150 (1979)
- [Step00a] **Stepanek J.**
Methods to determine the fluorescence and Auger spectra due to decay of radionuclides or due to a single atomic-subshell ionization and comparisons with experiments.
Med. Phys. **27** (7): 1544-1554 (2000)
- [Step00b] **Stepanek J., Ilvonen S.A., Kuronen A.A., Lampinen J.S., Savolainen S.E. and Valimäki P.J.**
Radiation spectra of ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$ and $^{114\text{m}}\text{In}$.
Acta Oncol. **39** (6): 667-671 (2000)
- [Stew01] **Steward R.D.**
Virtual Cell (VC) Radiobiology Software Available at <http://www.pnl.gov/berc/kbem/vc/>, PNNL-13579 (2001)
- [Suor00] **Suortti P., Fiedler S., Bravin A., Brochard T., Charvet A.M., Elleaume H., Mattenet M., Renier M., Spanne P. and Thomlinson W.**
Fixed-exit monochromator for computed tomography with synchrotron radiation at energies 18 to 90 keV.
J. Synch. Radiat. **7**: 340-347 (2000)
- [Tera92] **Terada T., Nambu K., Hyotani G., Miyamoto K., Tsuura M., Nakamura Y., Nishiguchi T., Itakura T., Hayashi S. and Komai N.**
A method for quantitative measurement of cerebral vascular permeability using X-ray CT and iodinated contrast medium.
Neuroradiology **34** (4): 290-296. (1992)
- [Terr99] **Terrissol M., Vrigneaud J.M., Pomplun E. and Gaci M.**
Modelling of Auger-induced DNA damage following Mössbauer effect on bleomycin-Fe57 complex.
Proceedings of 4th international symposium on Biophysical aspects of Auger processes, Lund, Sweden: 40 (1999)
- [Th84] **Thompson A.C., Llacer J., Campbell Finman L., Hughes E.B., Otis J.N., Wilson S. and Zeman H.D.**
Computed tomography using synchrotron radiation.
Nucl. Instr. Method. **222**: 319-323 (1984)
- [Thom00] **Thomlinson W., Berkvens P., Berruyer G., Bertrand B., Blattman H., Brauer E., Brochard T., Charvet A.M., Corde S., DiMichiel M., Elleaume H., Estève F., Fiedler S., Laissue J.A., LeBas J.F., Le Duc G., Lyubimova N., Nemoz C., Renier M., Slatkin D.N., Spanne P. and Suortti P.**
Research at the European Synchrotron Radiation Facility Medical Beamline.
Cell. Mol. Biol. **46** (6): 1043-1053 (2000)
- [Thya96] **Thyagarajan B., MacCornick-Graham M., Romero D.P. and Campbell C.**
Characterization of homologous DNA recombination activity and immortal mammalian cells.
Nucleic Acid Res. **24**: 4084-4091 (1996)

- [Tisl73] **Tisljar-Lentulis G., Feinendegen L.E. and Bond V.P.**
Biological radiation effects of inclusion of moderately heavy nuclei into the tissue and use of soft roentgen rays.
Strahlentherapie **145** (6): 656-662 (1973)
- [Tisl77] **Tisljar-Lentulis G. and Feinendegen L.E.**
The bromine enhancement ratio in mammalian cells in vitro and experimental mouse tumors.
Curr. Top. Radiat. Res Q. **12**: 526-536 (1977)
- [Tomb01] **Tombach B., Bremer C., Reimer P., Kisters K., Schaefer R.M., Geens V. and Heindel W.**
Renal tolerance of a neutral gadolinium chelate (gadobutrol) in patients with chronic renal failure: results of a randomized study.
Radiology **218** (3): 651-657 (2001)
- [Toml98] **Tomlinson G.E., Chen T.T., Stastny V.A., Virmani A.K., Spillman M.A., Tonk V., Blum J.L., Schneider N.R., Wistuba I.I., Shay J.W., Minna J.D. and Gazdar A.F.**
Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier.
Cancer Res. **58** (15): 3237-3242 (1998)
- [Troc95] **Troccaz J., Laieb N., Vassal P., Menguy Y., Cinquin P., Bolla M. and Giraud J.Y.**
Patient setup optimization for external conformal radiotherapy.
J. Image Guid. Surg. **1** (2): 113-120 (1995)
- [Trog91] **Troger V., Francois E., Frenay M., Namer M. and Milano G.**
Analysis of tissue platinum distribution in patients with cancer of the oesophagus.
Eur. J. Cancer **27** (3): 256-259 (1991)
- [Tubi63] **Tubiana M., Dutreix J., Dutreix A. and Jockey J.**
Bases physiques de la radiothérapie et de la radiobiologie.
Masson et Cie. Paris. (1963)
- [Tubi86] **Tubiana M., Dutreix J. and Wambersie A.**
Radiobiologie.
Hermann. Paris. (1986)
- [Turc00] **Turchi J.J., Henkels K.M. and Zhou Y.**
Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK.
Nucleic Acids Res. **28** (23): 4634-4641 (2000)
- [Urta96] **Urtasun R.C., Kinsella T.J., Farnan N., DelRowe J.D., Lester S.G. and Fulton D.S.**
Survival improvement in anaplastic astrocytoma, combining external radiation with halogenated pyrimidines: final report of RTOG 86-12, Phase I-II study.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **36** (5): 1163-1167 (1996)
- [Usam91] **Usami N., Kobayashi K., Maezawa H., Hieda K. and Ishizaka S.**
Biological effects of Auger processes of bromine on yeast cells induced by monochromatic synchrotron X-rays.
Int. J. Radiat. Biol. **60** (5): 757-768 (1991)
- [vanD96] **van Dieren E.B., Plaizier M., van Lingen A., Roos J.C., Barendsen G.W. and Teule G.J.**
Absorbed dose distribution of the Auger emitters ^{67}Ga and ^{125}I and the beta-emitters ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{131}I and ^{186}Re as a function of tumor size, uptake and intracellular distribution.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **36** (1): 197-204 (1996)
- [Vassa98] **Vassal P.**
Fusion d'images multi-modales pour la radiothérapie conformationnelle: application au repositionnement du patient.
Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble I, 144 p. (1998)

- [Veke94] **Vekemans B., Janssens K., Vincze L., Adams F. and Van Espen P.**
Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): new developments.
X-Ray Spectrom. **23** (6): 278-285 (1994)
- [Verb01a] **Verbakel W.F.A.R. and Stecher-Rasmussen F.**
On-line reconstruction of low boron concentrations by *in vivo* γ -ray spectroscopy for BNCT.
Phys. Med. Biol. **46**: 687-701 (2001)
- [Verb01b] **Verbakel W.F.A.R.**
Validation of the scanning γ -ray telescope for *in vivo* dosimetry and boron measurements during BNCT.
Phys. Med. Biol. **46**: 3269-3285 (2001)
- [Verh00] **Verheij M. and Bartelink H.**
Radiation-induced apoptosis.
Cell. Tissue Res. **301** (1): 133-142 (2000)
- [Vial99] **Viala J., Vanel D., Meingan P., Lartigau E., Carde P. and Renschler M.**
Phases IB and II multidose trial of gadolinium texaphyrin, a radiation sensitizer detectable at MR imaging: preliminary results in brain metastases.
Radiology **212**: 755-759 (1999)
- [Vogl95] **Vogler H., Platzek J., Schuhmann Giampieri G., Frenzel T., Weinmann H.J., Raduchel B. and Press W.R.**
Pre-clinical evaluation of gadobutrol: a new, neutral, extracellular contrast agent for magnetic resonance imaging.
Eur. J. Radiol. **21** (1): 1-10 (1995)
- [Wang92] **Wang Y. and Iliakis G.**
Effects of 5'-iododeoxyuridine on the repair of radiation induced potentially lethal damage interfase chromatin breaks and DNA double strand breaks in Chinese hamster ovary cells.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **23**: 353-360 (1992)
- [Wang94] **Wang Y., Pantelias G.E. and Iliakis G.**
Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: the contribution of excised DNA and chromosome damage in BrdU radiosensitization may be minimal in plateau-phase cells.
Int. J. Radiat. Biol. **66** (2): 133-142 (1994)
- [Ward88] **Ward J.F.**
DNA damages produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability.
Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. **35**: 95-125 (1988)
- [Wart77] **Warters R.L., Hofer K.G., Harris C.R. and Smith J.M.**
Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: elucidation of the primary site of radiation damage.
Curr. Top. Radiat. Res. Q. **12**: 389-407 (1977)
- [Wei84] **Weinmann H.J., Laniado N. and Mützel W.**
Pharmacokinetics of Gd-DTPA/dimeglumine after intravenous injection into healthy volunteers.
Phys. Chem. Phys. Med. NMR **16**: 167-172 (1984)
- [Weic86] **Weichselbaum R.R., Dahlberg W.K., Beckett W.K., Karrison T., Miller D., Clark J. and Ervin T.J.**
Radiation-resistant and repair-proficient human tumor cells may be associated with radiotherapy failure in head- and neck- cancer patients.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 2684-2688 (1986)

- [West01] **Westermann A.M., Grosen E.A., Katschinski D.M., Jager D., Rietbroek R., Schink J.C., Tiggelaar C.L., Jager E., Zum Vorde sive Vording P., Neuman A., Knuth A., Van Dijk J.D., Wiedemann G.J. and Robins H.I.**
A pilot study of whole body hyperthermia and carboplatin in platinum-resistant ovarian cancer.
Eur. J. Cancer **37** (9): 1111-1117 (2001)
- [Whel82] **Wheldon T.E.**
The effect of irradiation on function in self-renewing normal tissues with differing proliferative organisation.
Br. J. Radiol. **55**: 759-766 (1982)
- [Whel94] **Wheldon T.E.**
Targeting radiation to tumours.
Int. J. Radiat. Biol. **65** (1): 109-115 (1994)
- [Yane97] **Yaneva J., Leuba S.H., van Holde K. and Zlatanova J.**
The major chromatin protein histone H1 binds preferentially to cis-platinum-damaged DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (25): 13448-13451 (1997)
- [Yang95a] **Yang L.X., Douple E.B., O'Hara J.A. and Wang H.J.**
Carboplatin enhances the production and persistence of radiation-induced DNA single-strand breaks.
Radiat. Res. **143** (3): 302-308 (1995)
- [Yang95b] **Yang L.X., Douple E.B. and Wang H.J.**
Irradiation enhances cellular uptake of carboplatin.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **33** (3): 641-646 (1995)
- [You96] **Young S.W., Qing F., Harriman A., Sessler J.L., Dow W.C., Mody T.D., Hemmi G.W., Hao Y. and Miller R.A.**
Gadolinium (III) texaphyrin: A tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI.
Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 6610-6615 (1996)
- [Youn99] **Young L.A., Phillips M.H. and Nelson J.A.**
Validation of K-edge ^{125}I brachytherapy enhancement with silver compounds.
Phys. Med. Biol. **44** (8): 1921-1935 (1999)
- [Zak71] **Zak M. and Drobnik J.**
Effects of cis-diamminedichloroplatinum (II) on the post irradiation lethality in mice after irradiation with x-rays.
Strahlentherapie **142**: 112-115 (1971)
- [Zhao97] **Zhao Y., Song R., Wang X. and Liu Y.**
A combination of gadolinium and boron compounds for use in Gd-BNCT.
In *Advances in neutron capture therapy (Chemistry and Biology)*; B. Larsson, J. Crawford and R. Weinreich eds., Elsevier Science, **II**: p. 451-455 (1997)

Liste des Publications

Articles révisés par un comité scientifique

« Lack of cell death enhancement after irradiation by monochromatic synchrotron X-ray at the K-edge of platinum incorporated in living SQ20B human cells as cis-diamminedichloroplatinum (II) » ;

Corde S., Biston MC., Elleaume H., Estève F., Charvet AM., Joubert A., Ducros V., Bohic S., Simionovici A., Brochard T., Nemoz C., Renier M., Troprès I., Fiedler S., Bravin A., Thomlinson W., Le Bas JF., Balosso J.

Radiation Research (2002) 158 : sous presse

« Performance of computed tomography for contrast agent concentration measurements with monochromatic x-ray beams: comparison of K-edge versus temporal subtraction »;

Elleaume H., Charvet AM., **Corde S.**, Estève F., Le Bas JF.

Physics in Medicine and Biology (2002) 47 (18) 3369-3385

« Feasibility of synchrotron radiation computed tomography on rats bearing glioma after iodine or gadolinium injection » ;

Le Duc G., **Corde S.**, Elleaume H., Estève F., Charvet AM., Brochard T., Fiedler S., Collomb A., Le Bas JF.

European Radiology (2000) 10 (9): 1487-1492

« Research at the European Synchrotron Radiation Facility Medical Beamline » ;

Thomlinson W., Berkvens P., Berruyer G., Bertrand B., Blattmann H., Brauer E., Brochard T., Charvet AM., **Corde S.**, DiMichiel M., Elleaume H., Estève F., Fiedler S., Laissue JA., Le Bas JF., Le Duc G., Lyubimova N., Nemoz C., Renier M., Slatkin DN., Spanne P., Suortti P.

Cellular and Molecular Biology (2000) 46 (6): 1053-1063

« In vivo K-edge imaging with synchrotron radiation » ;

Elleaume H., Charvet AM., Le Duc G., Estève F., Bertrand B., **Corde S.**, Farion R., Lefaix JL., Leplat JJ., Berkvens P., Berruyer G., Brochard T., Dabin Y., Draperi A., Fiedler S., Nemoz C., Perez M., Renier M., Suortti P., Thomlinson W., Le Bas JF.

Cellular and Molecular Biology (2000) 46 (6): 1065-1075

« Absolute cerebral blood volume and blood flow measurements based on synchrotron radiation quantitative computed tomography » ;

Adam JF., Elleaume H., Le Duc G., **Corde S.**, Charvet AM., Troprès I., Le Bas JF., Estève F. (en révision favorable, *Journal of cerebral blood flow metabolism*, Octobre 2002)

« Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra-number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways » ;

Corde S., Balosso J., Elleaume H., Renier M., Joubert A., Biston MC., Adam JF., Charvet AM., Brochard T., Le Bas JF., Estève F., Foray N.

(soumis à *Cancer Research*, Septembre 2002)

« An objective method to measure cell survival by computed-assisted image processing using numeric images of Petri dishes » ;

Biston MC., **Corde S.**, Camus E., Marti Battle R., Estève F., Balosso J.

(soumis à *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, Septembre 2002)

« In vivo measurements of Gd concentrations in a rat glioma model: comparaison between Magnevist® and Gadovist® » ;

Le Duc G., **Corde S.**, Charvet AM., Elleaume H., Farion R., Le Bas JF., Estève F.
(en préparation)

Notes de congrès

« Enhanced radio sensitivity with iodinated contrast agents using monochromatic synchrotron X-rays on human cancerous cells »;

Estève F., **Corde S.**, Elleaume H., Adam JF., Joubert A., Charvet AM., Balosso J., Le Bas JF.
(actes du congrès Contrast Media Research'01 – Capri, Italie, 14-18 Septembre 2001)
Academic Radiology (2002), vol 9 (suppl. 2), p. S540-S543

« Coronary angiography with synchrotron X-ray source on pigs after iodine or gadolinium intravenous injection » ;

Estève F., Elleaume H., Bertrand B., Charvet AM., Fiedler S., Le Duc G., **Corde S.**, Nemoz C., Renier M., Lefaix JL., Leplat JJ., Suortti P., Thomlinson W., Le Bas JF.

(actes du congrès Contrast Media Research'99 – Woodstock, Vermont USA, 12-17 Septembre 1999)

Academic Radiology (2002), vol 9 (suppl. 1), p. S92-S97

« Radiobiological evidence of the potential use of synchrotron radiation for anticancer radiotherapy : energy deposit enhancement by photoelectric effect on pharmacological agents »;

Corde S., Elleaume H., Foray N., Joubert A., Adam JF., Biston MC., Charvet AM., Estève F., Le Bas JF., Balosso J.

(actes des 41^{èmes} journées scientifiques de la Société Française de Physique Médicale – Grenoble, France, 11-14 Juin 2002)

Physica Medica (résumé, à paraître)

« Radiothérapie expérimentale par activation photonique à l'ESRF. Etude de la radiosensibilité de cellules humaines tumorales après excitation résonante d'un hétéroatome de l'ADN, le platine »;

Corde S., Elleaume H., Foray N., Biston MC., Joubert A., Estève F., Bolla M., Le Bas JF., Balosso J.

(actes du 12^{ème} congrès de la SFRO, société française de radiothérapie oncologique – Paris, France, 22-23 Novembre 2001)

Cancer Radiother. (2001), vol 5 (suppl 1), p. 212s (résumé)

« Cellular radiosensibility enhancement by incorporation and photo-stimulation of platinum »;

Biston MC., **Corde S.**, Elleaume H., Estève F., Le Bas JF., Thomlinson WC., Balosso J.

(actes des 39^{èmes} journées scientifiques de la Société Française de Physique Médicale – Lille, France, 13-16 Juin 2000)

Physica Medica (2000), vol 16 (4), p.195 (résumé)

« Synchrotron radiation: new techniques for medical imaging and therapeutic prospects »;

Corde S., Charvet AM., Le Duc G., Elleaume H., Estève F., Le Bas JF.

(actes du 38^{ème} congrès de la Société Française des Physiciens d'Hôpitaux – Tours, France, 19-21 Mai 1999)

Physica Medica (1999), vol 15 (2) p. 98 (résumé)

Table des Matières

Avant Propos	1

I.	INTRODUCTION	3
I.1.	LES OUTILS ACTUELS DU RADIODIAGNOSTIC ET DE LA RADIOTHÉRAPIE.....	4
I.2.	APPORTS POTENTIELS DU RAYONNEMENT SYNCHROTRON AU DOMAINE MÉDICAL	6
I.3.	GENÈSE D'UN DOMAINE DE RECHERCHE EN IMAGERIE ET EN THÉRAPIE.....	8
II.	MECANISMES D'ACTION DES RADIATIONS IONISANTES: DE L'ÉVÉNEMENT PHYSIQUE INITIAL AUX APPLICATIONS ET RECHERCHES CLINIQUES	11
II.1.	EFFETS PHYSIQUES INITIAUX DE L'IRRADIATION.....	12
II.1.1.	Les types d'interaction photon-matière et leurs probabilités relatives	12
II.1.1.1.	La diffusion cohérente: effet Rayleigh	13
II.1.1.2.	La diffusion incohérente : effet Compton	13
II.1.1.3.	L'effet photoélectrique	14
II.1.1.4.	La production de paire : effet de matérialisation	16
II.1.1.5.	Domaines de prédominance des différents effets	17
II.1.2.	Interactions des électrons secondaires avec la matière	18
II.1.2.1.	Diffusion élastique	18
II.1.2.2.	Perte d'énergie par voie collisionnelle	18
II.1.2.3.	Perte d'énergie par voie radiative.....	18
II.1.2.4.	Pouvoir d'arrêt, parcours, transfert d'énergie linéique (TEL).....	18
II.1.3.	Quantification de l'énergie déposée	19
II.1.3.1.	Caractérisation du champ de rayonnement.....	19
II.1.3.2.	Atténuation, transfert et absorption de l'énergie	20
II.1.3.3.	Grandeurs dosimétriques : Kerma et dose.....	25
II.2.	EFFETS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'IRRADIATION.....	26
II.2.1.	Influence de la radiolyse de l'eau	26
II.2.2.	L'ADN cible critique	27
II.2.3.	Dommages moléculaires.....	28
II.3.	EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IRRADIATION.....	29
II.3.1.	Fidélité et mécanismes de réparation des lésions de l'ADN.....	29
II.3.1.1.	Réparation des dégâts de bases	30
II.3.1.2.	Réparation des cassures de brins de l'ADN	31
II.3.2.	Les cassures double-brins : dommages critiques ?.....	32
II.3.3.	Létalité des lésions.....	33
II.3.4.	Survie cellulaire	34
II.3.4.1.	Types de mort cellulaire radio-induite et survie clonogénique	34
II.3.4.2.	Les courbes de survie cellulaire	35
II.3.4.3.	Facteurs influençant l'effet biologique des radiations ionisantes.....	37
II.3.4.3.1.	Radiosensibilité cellulaire intrinsèque.....	37
II.3.4.3.2.	Effet radiosensibilisant de l'oxygène	38
II.3.4.3.3.	Facteur temps : fractionnement, débit de dose, ensemencement différé, effet-W.....	39
II.3.4.3.4.	Cycle cellulaire et degré de compaction de l'ADN.....	40

	<i>II.3.4.3.5. Conditions de culture : température, composition du milieu.....</i>	<i>42</i>
	<i>II.3.4.3.6. Qualité du rayonnement.....</i>	<i>42</i>
II.4.	EFFETS DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES TISSUS : APPLICATIONS ET RECHERCHES CLINIQUES	43
II.4.1.	Effets sur les tissus sains	43
II.4.1.1.	Schéma d'organisation	44
II.4.1.2.	Réactions à une irradiation	44
II.4.2.	Effets sur les tumeurs.....	44
II.4.2.1.	Définition et caractéristiques d'une tumeur.....	45
II.4.2.2.	Cas particulier des tumeurs cérébrales gliales, angiogenèse, barrière hémato-encéphalique.....	45
II.4.3.	Méthodes d'obtention d'un effet différentiel entre les tissus sains et la tumeur.....	47
II.4.3.1.	Restriction anatomique.....	48
II.4.3.1.1.	<i>Vers une meilleure maîtrise du volume irradié</i>	<i>48</i>
II.4.3.1.2.	<i>Des rayonnements de balistiques différentes</i>	<i>49</i>
II.4.3.1.3.	<i>Thérapies par injection d'isotopes radioactifs.....</i>	<i>49</i>
II.4.3.2.	Fractionnement de la radiothérapie	52
II.4.3.3.	Modulation physico-chimique et pharmacomodulation de la radiosensibilité des cellules tumorales.....	53
II.4.3.4.	Exploitation de l'EBR	56
II.4.3.5.	Thérapies binaires.....	58
II.4.3.5.1.	<i>Thérapie par capture neutronique : NCT</i>	<i>58</i>
II.4.3.5.2.	<i>Effet Mössbauer</i>	<i>59</i>
II.4.3.5.3.	<i>Thérapie par renforcement de l'effet photoélectrique.....</i>	<i>60</i>
II.4.3.6.	Propositions pour la radiothérapie par rayonnement synchrotron.....	63
III.	PROBLEMATIQUE DE LA THESE : OPTIMISER L'INTERACTION PHOTOELECTRIQUE DES RAYONS X SYNCHROTRON AVEC UN ELEMENT LOURD.....	65
III.1.	RENFORCER SÉLECTIVEMENT L'EFFET PHOTOÉLECTRIQUE POUR AUGMENTER LE SIGNAL RADIOLOGIQUE	66
III.1.1.	Seuils d'absorption photoélectrique : première approche.....	66
III.1.2.	Caractérisation des discontinuités des éléments	68
III.1.2.1.	Comparaison pour des énergies voisines situées de part et d'autre de la discontinuité	68
III.1.2.2.	Comparaison avec l'atténuation de l'eau.....	70
III.1.3.	Pouvoir de pénétration dans les milieux biologiques	75
III.1.3.1.	Energies d'excitation des seuils.....	75
III.1.3.2.	Atténuation par les milieux biologiques.....	76
III.1.4.	Qualité et coût d'une image.....	77
III.1.4.1.	Signal en transmission et rapport signal/bruit	77
III.1.4.2.	Dose nécessaire à la surface de l'objet.....	81
III.1.5.	Comparaison de l'iode et du gadolinium comme agents de contraste.....	82
III.2.	DÉPOSER PLUS D'ÉNERGIE DANS DES TISSUS CHARGÉS EN AGENTS DE CONTRASTE	84
III.2.1.	Coefficient massique d'absorption d'énergie et discontinuités: première approche	84
III.2.2.	Recherche de l'énergie optimale d'irradiation des éléments lourds purs	86
III.2.3.	Capacité des mélanges à augmenter l'énergie déposée	88
III.2.4.	Vers une compréhension plus fine du dépôt d'énergie : parcours des photoélectrons	90
III.3.	CIBLER LE DÉPÔT D'ÉNERGIE SUR L'ADN GRÂCE AUX CASCADES D'ÉLECTRONS AUGER.....	91

III.3.1. Probabilité de création des lacunes dans les différentes couches et mode de dépôt de l'énergie	91
III.3.2. Probabilité de désexcitation non-radiative et énergies moyennes libérées après création d'une lacune	94
III.3.3. Spectres des électrons Auger et vacances électroniques : approche simplifiée.....	97
III.4. CONSÉQUENCES POUR LE CHOIX DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	100
IV. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES.....	101
IV.1. LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON	101
IV.1.1. Généralités	102
IV.1.1.1. Principe.....	102
IV.1.1.2. Production et modes de fonctionnement	103
IV.1.1.3. Organisation d'une ligne d'expérimentation	104
IV.1.1.4. Caractéristiques du faisceau blanc.....	105
IV.1.2. La ligne médicale ID17.....	106
IV.1.2.1. Projets relatifs aux applications médicales du rayonnement synchrotron	107
IV.1.2.1.1. Imagerie par rayonnement monochromatique.....	107
IV.1.2.1.2. Radiothérapie.....	109
IV.1.2.2. Caractéristiques du faisceau	110
IV.1.2.3. Instrumentation.....	110
IV.1.2.3.1. Monochromateurs	111
IV.1.2.3.2. Système de positionnement du patient.....	114
IV.1.2.3.3. Le système de détection.....	115
IV.2. LES AGENTS PHARMACOLOGIQUES ET COMPOSÉS CHIMIQUES.....	116
IV.2.1. Les agents de contraste	116
IV.2.1.1. Produits de contraste iodés	117
IV.2.1.2. Produit de contraste baryté	117
IV.2.1.3. Produits de contraste paramagnétiques	118
IV.2.2. Les vecteurs d'atomes étrangers dans l'ADN	119
IV.2.2.1. L'IUdR, un analogue de base de l'ADN	119
IV.2.2.2. Agents à comportement alkylant	120
IV.2.2.2.1. Le chloroterpyridineplatinum	120
IV.2.2.2.2. Le cis-diamminedichloroplatinum (II)	121
IV.2.3. Bilan	125
IV.3. TECHNIQUES DE DOSAGE DES ÉLÉMENTS LOURDS.....	126
IV.3.1. In vivo : Objectifs de la SRCT.....	126
IV.3.1.1. Principe général de la méthode.....	127
IV.3.1.1.1. Tomodensitométrie conventionnelle : rappels	127
IV.3.1.1.2. Avantages et inconvénients du rayonnement monochromatique en tomodensitométrie	128
IV.3.1.2. Description du matériel d'étude	129
IV.3.1.2.1. Fantômes.....	129
IV.3.1.2.2. Modèle de gliome C6 chez le rat femelle Wistar Wag.....	130
IV.3.1.3. Protocole d'imagerie SRCT	131
IV.3.1.4. Traitement des données	133
IV.3.2. A l'échelle de quelques millions de cellules: ICP-MS.....	134
IV.3.2.1. Description de la technique et dispositif expérimental.....	135
IV.3.2.2. Préparation des échantillons	136
IV.3.2.3. Étalonnage du spectromètre	136
IV.3.2.4. Analyse des résultats	137
IV.3.3. A l'échelle d'une cellule unique : SR-XRF.....	137

IV.3.3.1.	Dispositif expérimental	138
IV.3.3.2.	Préparation des échantillons	140
IV.3.3.3.	Choix de la cellule à cartographier	140
IV.3.3.4.	Acquisition d'une cartographie	141
IV.3.3.5.	Traitements des spectres de fluorescence	141
IV.4.	DOSIMÉTRIE	143
IV.4.1.	Calibration du faisceau synchrotron avec un détecteur de référence	143
IV.4.1.1.	Détecteur Germanium haute pureté	143
IV.4.1.2.	Chambre d'ionisation	145
IV.4.1.3.	Comparaison des réponses des détecteurs de référence	146
IV.4.2.	Calibration des détecteurs secondaires	146
IV.4.2.1.	Dosimètres thermoluminescents	147
IV.4.2.2.	Chambres d'ionisation à azote	147
IV.4.3.	Rendements en profondeur	147
IV.4.3.1.	Protocole d'acquisition	147
IV.4.3.2.	Résultats des mesures	149
IV.4.4.	Programmation d'une irradiation à visée thérapeutique	151
IV.4.4.1.	Irradiations longues	151
IV.4.4.2.	Irradiations courtes	151
IV.4.5.	Contrôle des doses effectivement délivrées aux échantillons	151
IV.4.5.1.	Dosimètres thermoluminescents	152
IV.4.5.2.	Prise en compte de la décroissance temporelle de l'intensité du rayonnement synchrotron	152
IV.4.5.3.	Doses enregistrées par les détecteurs secondaires	152
IV.4.6.	Le gel de Fricke	153
IV.4.6.1.	Principe	153
IV.4.6.2.	Préparation du dosimètre chimique dopé et rôle des constituants	154
IV.4.6.3.	Fantômes	156
IV.4.6.4.	Irradiation	156
IV.4.6.5.	Lecture de gels par résonance magnétique nucléaire	157
IV.5.	QUANTIFICATION <i>IN VITRO</i> DES EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RADIOTHÉRAPIE	159
IV.5.1.	Lignées cellulaires et conditions de croissance	160
IV.5.1.1.	SQ20B	160
IV.5.1.2.	IGROV1	162
IV.5.1.3.	HCC1937	163
IV.5.2.	Survie cellulaire	164
IV.5.2.1.	Protocole expérimental	164
IV.5.2.1.1.	Cultures cellulaires	164
IV.5.2.1.2.	Irradiation	165
IV.5.2.1.3.	Test de clonogénicité	167
IV.5.2.1.4.	Cytométrie en flux	168
IV.5.2.2.	Dénombrement du nombre de clones survivants	168
IV.5.2.2.1.	Méthode classique	169
IV.5.2.2.2.	Méthode semi-automatique assistée par ordinateur	169
IV.5.2.3.	Mise en forme des données, courbes de survie cellulaire	173
IV.5.2.4.	Ajustement des courbes selon le modèle linéaire-quadratique	174
IV.5.2.5.	Définition du SER ou <i>sensitization enhancement ratio</i>	174
IV.5.3.	Lésions moléculaires et cinétiques de réparation	175
IV.5.3.1.	Préparation des échantillons à irradier	175
IV.5.3.2.	Procédure d'irradiation	176
IV.5.3.3.	Protocole de préparation des blocs d'agarose (<i>plugs</i>)	176
IV.5.3.4.	Électrophorèse en champs pulsés	177
IV.5.4.	Voies de réparation	178
IV.5.4.1.	Extraits cellulaires	178

IV.5.4.1.1.	Préparation des échantillons à irradier.....	178
IV.5.4.1.2.	Irradiation.....	179
IV.5.4.1.3.	Extraits protéiques.....	179
IV.5.4.1.4.	Immunoprécipitations et immunoblots (Western Blot).....	179
IV.5.4.1.5.	Activité DNA-PK.....	180
IV.5.4.1.6.	Activité c-Abl.....	181
IV.5.4.2.	Microscopie avec immunofluorescence.....	181
IV.5.4.2.1.	Préparation des échantillons.....	181
IV.5.4.2.2.	Irradiation.....	181
IV.5.4.2.3.	Immunofluorescence.....	181
V.	RESULTATS ET DISCUSSION : QUE PEUT APPORTER LE RAYONNEMENT SYNCHROTRON A LA RADIOTHERAPIE ANTICANCEREUSE ?	183
V.1.	FAISABILITÉ DE LA TOMOGRAPHIE QUANTITATIVE PAR RAYONNEMENT SYNCHROTRON	183
V.1.1.	Évaluation des performances de la méthode sur fantômes.....	184
V.1.1.1.	Contexte.....	184
V.1.1.2.	Rappel des conditions expérimentales.....	186
V.1.1.3.	Résultats.....	187
V.1.1.3.1.	Petit fantôme.....	187
V.1.1.3.2.	Fantôme tête.....	190
V.1.1.4.	Implications pour la quantification <i>in vivo</i> des concentrations d'agents de contrastes présentes dans les tumeurs cérébrales.....	193
V.1.1.5.	Conclusion.....	195
V.1.1.6.	Synthèse des résultats.....	196
V.1.2.	Cartographies quantitatives de distribution d'agent de contraste <i>in vivo</i> chez le rat porteur de tumeur.....	197
V.1.2.1.	Obtention d'images tomodensitométriques résolues en concentration d'agents de contraste iodés et paramagnétiques.....	197
V.1.2.2.	Cinétiques de diffusion des agents de contraste hors du réseau de néovascularisation tumorale : comparaison du Magnevist® et du Gadovist®.....	201
V.1.2.3.	Implications pour le choix de l'agent de contraste.....	206
V.1.3.	SRCT et imagerie paramétrique tissulaire: première approche.....	207
V.1.4.	La SRCT : un puissant outil au service de la radiothérapie ?.....	209
V.2.	MESURE DE L'AUGMENTATION DE DÉPÔT D'ÉNERGIE LIÉ À LA PRÉSENCE D'UN AGENT DE CONTRASTE PENDANT UNE IRRADIATION PAR DES RAYONS X MONOCHROMATIQUES.....	211
V.2.1.	Dopage par des atomes lourds du dosimètre chimique Fricke gélifié.....	211
V.2.1.1.	Variation de la réponse des différents gels en fonction de l'énergie d'irradiation.....	212
V.2.1.1.1.	Sensibilité des gels en fonction de leur constitution et de l'énergie d'irradiation.....	212
V.2.1.1.2.	Comparaison aux valeurs théoriques.....	214
V.2.1.1.3.	Interprétation physico-chimique.....	216
V.2.1.2.	Simulation d'un traitement.....	217
V.2.1.2.1.	Résultats.....	217
V.2.1.2.2.	Conclusions.....	220
V.2.1.3.	Réflexion autour de la nécessaire équivalence d'un dosimètre par rapport au tissu irradié.....	220
V.2.2.	Dosimétrie biologique.....	222
V.2.2.1.	Relation entre la concentration d'agent de contraste iodé et la létalité des rayons X de 50 keV.....	222
V.2.2.2.	Optimisation de l'énergie des rayons X.....	225
V.2.2.3.	Influence du débit de dose sur le gain d'énergie déposée.....	227
V.2.2.4.	Interprétation du phénomène physique et de ses conséquences biologiques.....	228

V.2.3.	Vers une application thérapeutique ?	229
V.3.	EFFICACITÉ BIOLOGIQUE DE L'INDUCTION PHOTONIQUE EXTERNE DE CASCADES D'ÉLECTRONS AUGER SUR UN HÉTÉROATOME DE L'ADN	231
V.3.1.	Mesure de l'impact sur la survie cellulaire de l'ionisation d'atomes d'iode portés par un nucléoside se substituant à la Thymidine de l'ADN et comparaison avec la présence d'iode extracellulaire	231
V.3.1.1.	Influence de l'énergie d'excitation sur le gain de radiotoxicité	232
V.3.1.2.	Comparaison avec l'agent de contraste iodé	234
V.3.1.3.	La combinaison des deux traitements pharmacologiques conduit à une supra-additivité des radiosensibilisations	235
V.3.1.4.	Quel intérêt thérapeutique ?	236
V.3.2.	Effets biologiques de l'activation résonante d'atomes de platine incorporés dans l'ADN sous forme de Cisplatine	239
V.3.2.1.	Absence d'effet du platine sur la forme des courbes de survie cellulaire	239
V.3.2.1.1.	Relations dose-effet	240
V.3.2.1.2.	Cytométrie en flux	242
V.3.2.1.3.	Corrélation entre la chimiotoxicité du cisplatine, le contenu intracellulaire et la répartition subcellulaire du platine.....	244
V.3.2.1.4.	Proposition d'interprétation	246
V.3.2.2.	A la recherche des phénomènes biophysiques primaires : approche moléculaire	250
V.3.2.2.1.	Incidence et réparation des cassures de brins de l'ADN induites par l'activation résonante du platine	251
V.3.2.2.2.	Une activité DNA-PK inhibée	254
V.3.2.2.3.	Recombinaison homologue favorisée.....	256
V.3.2.2.4.	Discussion des phénomènes moléculaires.....	258
V.3.2.3.	Conclusions	260
V.3.2.4.	Propositions visant à rechercher un modèle de travail plus adapté	261
V.3.2.4.1.	Un agent pharmacologique platiné moins toxique pour la lignée SQ20B : le PtTC.....	261
V.3.2.4.2.	Utilisation d'une lignée cellulaire moins sensible au cisplatine : IGROV1	265
V.3.2.4.3.	Priver les lignées BRCA1 déficientes de tout mode de réparation des lésions :	266
V.3.3.	Vectorisation d'un atome lourd au sein de l'ADN : propriétés et contraintes fondamentales.....	268
V.4.	SYNTHÈSE DES RÉSULTATS : RÉFLEXION AUTOUR DE L'INTÉRÊT DE L'ÉVÉNEMENT TYPE K EN IMAGERIE ET EN RADIOTHÉRAPIE	269
VI.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	271
VII.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	277
	Liste des Publications.....	305
	Table des Matières	307
	Table des Figures	313
	Table des Tableaux:	320

Table des Figures

Chapitre II

Figure II-1: Échelle des temps en radiobiologie (d'après [Tubi63]).....	12
Figure II-2 : Effet Compton	14
Figure II-3 : Interaction d'un photon avec un atome par effet photoélectrique. Réarrangement du cortège électronique par fluorescence ou effet Auger	16
Figure II-4 : Zones de prédominance des différents types d'interaction photon matière en fonction de l'énergie du photon et du numéro atomique du matériau traversé. Les lignes d'isoprobabilités d'apparition des effets sont représentées (d'après [Eva85]).....	17
Figure II-5 : Coefficients massiques d'atténuation de l'eau liquide pour des photons d'énergies comprises entre 1 keV et 50 MeV. Contribution des différents types d'interactions physiques.....	22
Figure II-6 : Représentation schématisée du transfert d'énergie d'un photon au milieu traversé.....	23
Figure II-7 : Représentation schématisée des particules secondaires prises en compte au niveau des coefficients d'atténuation massique totale, de transfert et d'absorption d'énergie pour les différents types d'interaction photon-matière.....	24
Figure II-8 : Les lésions de l'ADN peuvent être produites soit directement soit indirectement par l'intermédiaire des produits de la radiolyse de l'eau cellulaire.....	27
Figure II-9 : Structure de l'ADN (d'après [Coop97]).....	28
Figure II-10 : Réparation par excision de base.....	30
Figure II-11 : Mécanismes de réparation d'une cassure double-brins. (a) par suture non-homologue, d'après [Feat99] et (b) par recombinaison homologe d'après [Khan01]	32
Figure II-12 : Exemple de courbe de survie ajustée avec le modèle linéaire-quadratique.....	37
Figure II-13 : En dose unique le débit de dose influence l'effet biologique des radiations ionisantes. Simulation pour des cellules humaines de tumeur prostatique d'après [Stew01]	40
Figure II-14 : Les différents degrés de compaction de l'ADN, d'après [Albe89]	41
Figure II-15 : Influence du TEL sur les courbes de survie cellulaire d'après [Bare68].....	43
Figure II-16 : L'angiogenèse d'après [Folk96].....	46
Figure II-17 : La restauration cellulaire permet d'obtenir un effet différentiel favorable entre tissus sains et cancéreux grâce au fractionnement de la dose d'irradiation.....	52
Figure II-18 : Terminologie d'évaluation de l'effet d'une association chimio-radiothérapie, d'après [Stee79].....	56

Chapitre III

Figure III-1 : Variation en fonction de l'énergie des photons incidents des coefficients d'atténuation totale du brome, du gadolinium, de l'iode et du platine. Comparaison avec l'eau liquide. Source : [Nowo98]	67
Figure III-2 : Amplitude des discontinuités K, L _I , L _{II} , L _{III} du coefficient massique d'atténuation totale des différents éléments entre Z = 11 et 92 d'après [Hubb97]	69
Figure III-3 : Gain du coefficient massique d'atténuation totale au passage des seuils K, L _I , L _{II} , L _{III} pour les différents éléments entre Z = 11 et 92 d'après [Hubb97]	70
Figure III-4 : Facteurs d'augmentation du coefficient massique d'atténuation totale de 6 éléments purs (Br, Ag, I, Gd, Yb, Pt) par rapport à l'eau, pour des photons d'énergie comprise entre 1 et 500 keV	72
Figure III-5 : Différence entre les coefficients massiques d'atténuation totale des différents éléments (Z = 11-92) et l'eau liquide, pour une énergie photonique située juste au-dessus des seuils K, L _I , L _{II} , L _{III} d'après [Hubb97].....	73

Figure III-6 : Gain du coefficient massique d'atténuation totale au-dessus des seuils K, L _I , L _{II} , L _{III} pour les différents éléments entre Z = 11 et 92 par rapport à l'eau liquide d'après [Hubb97].....	74
Figure III-7 : Énergie des seuils d'excitation K, L _I , L _{II} et L _{III} pour les éléments dont le numéro atomique Z est compris entre 11 et 92. Source : [Hubb97].....	75
Figure III-8 : Calcul de l'épaisseur d'eau atténuant de moitié un rayonnement primaire constitué de photons d'énergies comprises entre 1 et 500 keV.....	76
Figure III-9 : Illustration de la géométrie étudiée : un faisceau de rayons X traverse un objet constitué de plusieurs épaisseurs de milieux biologiques équivalents-eau, parmi lesquelles une correspond à un mélange homogène avec un élément lourd de numéro atomique Z.	78
Figure III-10 : Rapports signal/bruit calculés pour 10 ⁷ photons/pixel incidents traversant 20 cm d'eau dont 1 cm contenant 10 mg.cm ⁻³ d'un élément lourd de numéro atomique Z, compris entre 40 et 92. Comparaison d'une irradiation réalisée au-dessus puis en dessous du seuil K de l'élément considéré avec une irradiation uniquement au-dessus du seuil K, avec et sans l'élément lourd.	80
Figure III-11 : Pour différents éléments lourds (Z = 40 - 92), calcul de la dose nécessaire à l'entrée d'un objet pour obtenir un rapport signal/bruit de 3, pour des irradiations réalisées soit au-dessus puis en dessous du seuil K de l'élément considéré soit uniquement au-dessus du seuil, avec et sans l'élément lourd. Cet objet possède une épaisseur équivalente à 20 cm d'eau, et contient sur 1 cm d'épaisseur 10 mg.cm ⁻³ de l'élément lourd. Le détecteur est supposé parfait ($\epsilon=100\%$), avec une dimension de pixel de 0.035 cm ²	82
Figure III-12 : Comparaison des coefficients d'atténuation totale et d'absorption d'énergie pour l'iode (haut) et l'eau liquide (bas). Source : [Nowo98]	85
Figure III-13 : Facteurs d'augmentation de dépôt d'énergie de 6 éléments purs (Br, Ag, I, Gd, Yb, Pt) par rapport à l'eau, pour des photons d'énergie comprise entre 1 et 500 keV. Source : [Nowo98]	87
Figure III-14 : Facteurs d'augmentation de dépôt d'énergie dus à l'introduction de différentes proportions massiques d'iode dans de l'eau, pour des photons d'énergie comprise entre 1 et 500 keV. Source : [Nowo98]	88
Figure III-15 : Parcours moyen d'un électron dans l'eau en fonction de son énergie cinétique initiale d'après [Berg99]	90
Figure III-16 : Section efficace d'effet photoélectrique sur les différentes couches d'atomes de platine d'après [Cull89]	92
Figure III-17 : Pour les différents éléments de la classification périodique, variation de la probabilité de désexcitation non radiative après création d'une lacune dans les sous-couches K, L _I , L _{II} et L _{III} d'après [Krau79].....	95

Chapitre IV

Figure IV-1 : Vue aérienne de l'ESRF.....	102
Figure IV-2 : Représentation schématique du système de production du rayonnement synchrotron	102
Figure IV-3 L'anneau de stockage et ses composants	103
Figure IV-4: Schéma d'un aimant de courbure	103
Figure IV-5: Une ligne de lumière et ses différentes cabines	105
Figure IV-6 : Évolution de la brillance des sources de rayons X au cours du dernier siècle.....	106
Figure IV-7 : Vue générale de la ligne médicale de l'ESRF (ID17 / BL14) d'après [Elle99].....	107
Figure IV-8 : Résultat de la première angiographie coronarienne humaine réalisée à l'ESRF en janvier 2000, d'après [Elle00b].....	108
Figure IV-9 : Comparaison des spectres en énergie entre un tube à rayons X classique et le faisceau synchrotron disponible à la sortie du wiggler de ID17	110
Figure IV-10 : Configurations possibles de la ligne médicale	111
Figure IV-11 : Loi de Bragg, pour les géométries de Bragg et Laue	111

Figure IV-12 : Distribution spectrale d'un faisceau monochromatique réglé au-dessus du seuil K du platine (78.8 keV) avec le monochromateur de tomographie. La largeur totale à mi-hauteur de ce spectre est de 0.00249 pour un maximum situé à 1.438 degrés, soit 150 eV.	112
Figure IV-13 : Schéma de principe des monochromateurs d'angiographie et de tomographie	113
Figure IV-14 : Réglage de l'énergie du faisceau synchrotron au seuil d'absorption K du platine par enregistrement de l'intensité transmise au travers d'un échantillon de platine Goodfellow® de grande pureté lors du déplacement angulaire des monochromateurs de tomographie.....	114
Figure IV-15 : Système de positionnement du patient.....	115
Figure IV-16 : Vue schématique du détecteur germanium	116
Figure IV-17 : Profil horizontal d'un faisceau monochromatique de 78 keV enregistré avec le détecteur Germanium à gain 1 pour 1 ms de temps d'intégration.	116
Figure IV-18 : Structures de la thymidine (a) et de son analogue, l'iodo-désoxyuridine (b) d'après [Pomp94]	119
Figure IV-19 : Cibles cellulaires du cisplatine.....	123
Figure IV-20 : Types d'adduits possibles après exposition de l'ADN au cisplatine. Monofonctionnel (a) et Bifonctionnel : sur protéine (b), intrabrins (c) et interbrins (d)	123
Figure IV-21 : Principe d'acquisition d'une image tomographique	127
Figure IV-22 : Fantôme en Lucite de 10 cm de diamètre : 8 dilutions différentes d'agent de contraste peuvent être introduites dans 4 tubes de diamètre compris entre 3 et 20 mm.....	130
Figure IV-23 : Structures artérielles du cerveau de rat	131
Figure IV-24 : Structure neurologiques du cerveau de rat.....	131
Figure IV-25 : Tomographie quantitative par rayonnement synchrotron : illustration du dispositif expérimental pour une séquence d'imagerie bi-énergie de part et d'autre du seuil K d'un agent de contraste ..	132
Figure IV-26 : Éléments de la classification périodique dosés par ICP-MS.....	135
Figure IV-27 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse quadripolaire	136
Figure IV-28 : Exemple de gamme d'étalonnage du spectromètre de masse	137
Figure IV-29 : Montage expérimental du microscope par fluorescence induite par rayonnement synchrotron d'après [Bohi01b].	139
Figure IV-30 : Exemple de spectres de références : (sup.) Acquisition de 1000 secondes avec faisceau focalisé au centre d'un capillaire en quartz de 100 µm de diamètre contenant une solution de 195 ppm (1 mM) de platine ; (inf.) Acquisition de 1000 secondes avec faisceau focalisé sur une cellule SQ20B traitée avec 100 µm de CDDP pendant 6 heures	142
Figure IV-31 : Variation du facteur K en fonction de l'énergie d'irradiation.....	145
Figure IV-32 : Dispositif expérimental d'exploration automatique d'un fantôme d'eau irradié par un faisceau de rayons X de 500 µm de haut et 6 cm de large	148
Figure IV-33 : Distributions de doses mesurées dans un fantôme d'eau à 33, 50 et 80 keV.....	150
Figure IV-34 : Tubes d'étalonnage du gel de Fricke pur ou dopé à l'iode ou au baryum à 80 keV	158
Figure IV-35 : Fantômes têtes irradiés à 33.5 keV (a) image sagittale de repérage (b) image transverse T ₁	159
Figure IV-36 : Courbe de croissance de la lignée SQ20B. Le temps de doublement de la population a été expérimentalement vérifié à partir de la section droite de cette courbe correspondant à la phase de croissance exponentielle : 21 heures. Le comptage de cellules a été réalisé à l'aide d'un hématimètre de Malassez.....	161
Figure IV-37 : Courbe de survie des cellules SQ20B irradiées avec un appareil Philips RT-250, Tension = 75 kV, I = 20 mA ; filtration inhérente = 2 mm Al ; CDA=1.7 mm AL ; DSP = 50 cm ; Taille du champ = 10x10 cm ² à la DSP ; Débit de dose = 50 cGy/min. Les barres d'erreur symbolisent l'écart-type des valeurs trouvées pour 4 boîtes de Pétri.....	162

Figure IV-38 : Dispositifs expérimentaux d'irradiation cellulaire (a) par translation de flacons de culture de 25 ou 12.5 cm ² et (b) par rotation de cryotubes de 2 ml	166
Figure IV-39 : Exemple de boîte de Pétri ayant servi à l'étalonnage du logiciel Samba.....	171
Figure IV-40 : Les différentes étapes du comptage automatique des colonies fixées et colorées dans des boîtes de Pétri.....	172
Figure IV-41 : Comparaison des nombres de clones survivants (plus de 50 cellules) dénombrés manuellement et à l'aide du logiciel Samba par deux observateurs.....	173
Figure IV-42 : Principe du système de réfrigération des échantillons cellulaires pendant l'irradiation	176

Chapitre V

Figure V-1 : Images résolues en concentration (a) d'iode et (b) de gadolinium d'un fantôme de lucite de 10 cm de diamètre. La méthode de soustraction employée est la technique de K-edge et la dose totale reçue à la surface du fantôme est de 5 cGy.	188
Figure V-2 : Comparaison de l'exactitude des concentrations d'agent de contraste mesurées pour une dose surface de 5 cGy dans le fantôme de lucite de 10 cm de diamètre pour l'iode (sup.) et pour le gadolinium (inf.), avec les techniques de soustraction K-edge (Δ) et temporelle ($\square$).	189
Figure V-3 : Mesures du bruit associé à la mesure des concentrations d'iode et de gadolinium à partir d'images du fantôme en lucite de 10 cm de diamètre soustraites selon la méthode K-edge et temporelle. La dose à la surface des fantômes est de 5 cGy et le diamètre de la région d'intérêt de 3 mm.....	190
Figure V-4 : Images du fantôme tête (16.5 cm de diamètre + couronne en aluminium de 0.5 mm d'épaisseur) réalisées pour une dose surface de 60 cGy. (a) Méthode de soustraction K-edge, au-dessus et en dessous sur seuil K de l'iode (b) Méthode de soustraction temporelle à 50 keV pour quantifier l'iode (c) Méthode de soustraction K-edge au-dessus et en dessous du seuil K du gadolinium. Les concentrations d'agents de contraste étaient de 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 et 0.1 mg/ml	191
Figure V-5 : Comparaison de l'exactitude des mesures de concentrations d'agent de contraste dans le fantôme tête de lucite de 17.5 cm de diamètre pour l'iode (sup.) et pour le gadolinium (inf.), avec les techniques de soustraction K-edge (Δ) et temporelle à 33 keV ($\square$) et à 50 keV ($\blacksquare$). La hauteur du faisceau était de 1 mm et la dose en surface de 60 cGy.	192
Figure V-6 : Mesures du bruit associé à la mesure des concentrations d'iode et de gadolinium à partir d'images du fantôme tête (16.5 cm de diamètre + couronne en aluminium de 0.5 mm d'épaisseur) soustraites selon les méthodes K-edge et temporelle. La dose à la surface du fantôme est de 60 cGy, la hauteur du faisceau de 1 mm et le diamètre de la région d'intérêt de 3 mm.....	193
Figure V-7 : Images transverses de rat porteur de tumeur cérébrale, acquise 10 minutes après injection d'un agent de contraste par tomographie par rayonnement synchrotron, par soustraction d'images prises au-dessus et en dessous du seuil d'absorption K de l'iode ou du gadolinium (dose X : 5 cGy/coupe).	198
Figure V-8 : Corrélation de la SRCT à d'autres techniques d'imagerie. Des coupes transverses de cerveau de rat porteur de gliome C6 ont été réalisées (a) par IRM (séquence Spin Echo pondérée en T1, TR=500ms et TE=20ms) après injection intraveineuse de gadolinium ; (b) par SRCT en méthode de soustraction K-edge, après injection d'iode et (c) par histologie, avec une coloration HES.....	198
Figure V-9 : Images SRCT transverses obtenues 10 minutes après injection de 0.5 ml/ 100 g de Magnevist®. De gauche à droite et de haut en bas, les coupes jointives de 800 μ m échantillonnent la tumeur du rat depuis les oreilles vers le museau. La dose à la peau des rats était de 5 cGy/coupe et le mode de soustraction de type K-edge. En bas à droite : coupe histologique du cerveau colorée à l'HES.	202
Figure V-10 : Distribution temporelle de la répartition intracérébrale de gadolinium injecté sous forme de Magnevist® (0.5 ml/100g) à un rat porteur d'un gliome. Les coupes transverses présentées ici ont été obtenues par SRCT en mode K-edge, avec une dose à la peau de 5 cGy/coupe.	202
Figure V-11 : Images SRCT transverses obtenues 10 minutes après injection de 0.25 ml/ 100 g de Gadovist®. De gauche à droite et de haut en bas, les coupes jointives de 800 μ m échantillonnent la tumeur du rat depuis le museau vers les oreilles. La dose à la peau des rats était de 5 cGy/coupe et le mode de soustraction de type K-edge. En bas à droite : coupe histologique du cerveau colorée à l'HES.	203

Figure V-12 : Distribution temporelle de la répartition intracérébrale de gadolinium injecté sous forme de Gadovist® (0.25 ml/100g) à un rat porteur de gliome. Les coupes transverses présentées ici ont été obtenues par SRCT en mode K-edge, avec une dose à la peau de 5 cGy/coupe.	203
Figure V-13 : Évolution temporelle moyenne de la concentration de gadolinium mesurée in vivo chez 5 rats porteurs de gliomes cérébraux et injectés avec du Magnevist® (0.5 ml/100g) ou du Gadovist® (0.25 ml/100g). Les régions d'intérêts ont été placées soit dans la zone tumorale (périphérique centrale ou totale) soit dans la zone controlatérale, supposée saine. Les barres d'erreur représentent ici l'écart-type des mesures obtenues sur 5 rats pour le Magnevist® et 6 rats pour le Gadovist®	204
Figure V-14 : Visualisation du premier passage d'un bolus d'iode injecté 3 secondes après le début de l'acquisition – Images SRCT en mode de soustraction temporelle. La flèche rouge indique la position de la tumeur	208
Figure V-15 : Cartographies de volume sanguin cérébral obtenues chez le rat sain (coupes supérieures) et le rat tumeur (coupes inférieures) par SRCT	209
Figure V-16 : Linéarité de réponse des différents gels de Fricke en fonction de la dose d'irradiation, délivrée par un tube à rayons X classique 100 kVp, 2 mm Al inhérent, CDA = 1.6 mm Al, DSP = 50, champ de 15x15 cm ²	212
Figure V-17 : Variation de la sensibilité des gels de Fricke purs et dopés par 10 mg.cm ⁻³ d'iode (Telebrix®) ou de baryum (Micropaque®) en fonction de l'énergie d'irradiation.....	214
Figure V-18 : Pour une gamme d'énergie de photons comprise entre 10 et 100 keV, facteur d'augmentation de dépôt d'énergie liée à la présence de 10 mg.cm ⁻³ d'iode ou de baryum comme éléments constitutifs du gel de Fricke.....	215
Figure V-19 : Comparaison entre les gains de sensibilité mesurés sur la réponse des gels de Fricke dopés et les facteurs d'augmentation de dose calculés.....	216
Figure V-20 : Profils transverses réalisés dans un fantôme rempli de gel de Fricke de 8.2 cm de diamètre contenant une tumeur symbolisée par un tube de 1.5 cm de diamètre, contenant une solution de Fricke normale (symboles blancs) ou dopée (symboles noirs) avec 10 mg.cm ⁻³ d'iode (a) ou de baryum (b).....	219
Figure V-21 : Courbes de survie des cellules SQ20B irradiées à 50 keV en l'absence ou en présence d'Iomeron® dans le milieu de culture.....	223
Figure V-22 : Comparaison des gains de dépôt d'énergie théorique et estimé par le calcul du SER ^{10%} pour l'irradiation des cellules SQ20B à 50 keV en présence de 3, 10 ou 20 mg.cm ⁻³ d'iode (Iomeron®) pour l'isoeffet 10% de survie	224
Figure V-23 : Courbes de survie des cellules SQ20B irradiées en présence d'Iomeron® dans leur milieu de culture (concentration d'iode :10 mg.cm ⁻³) avec les RX d'énergie indiquée.....	225
Figure V-24 : Comparaison des gains de dépôts d'énergie théorique et estimé par le calcul du SER ^{10%} pour l'irradiation des cellules SQ20B à plusieurs énergies en présence de 10 mg/ml d'iode. (Iomeron®).....	226
Figure V-25 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à 10 µM d'IUdR pendant 48 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, aux énergies indiquées.	232
Figure V-26 : Variation du facteur de radiosensibilisation cellulaire en fonction du taux de survie de référence. Exemple pour la courbe de survie cellulaire des SQ20B pré-traitées avec 10 µM d'IUdR pendant 48 heures et irradiées à 50 keV, comme les contrôles.....	233
Figure V-27 : Comparaison de l'efficacité respective de l'effet sur la radiosensibilité cellulaire de 10 µM d'IUdR appliqué pendant 48 heures ou de 10 mg/cm ³ d'iode (Iomeron®) rajouté dans le milieu de culture. Le critère de comparaison a été le taux de survie de 10% de la population cellulaire.....	234
Figure V-28 : L'association du pré-traitement des cellules SQ20B par 10 µM d'IUdR pendant 48 heures et de leur irradiation dans un milieu de culture enrichi par 10 mg.cm ⁻³ d'iode (Iomeron®) conduit à une létalité cellulaire plus grande que l'association des effets pris indépendamment.....	235
Figure V-29 : Courbes de survie des cellules SQ20B non traitées au CDDP et irradiées au-dessus (●) ou en dessous (○) du seuil d'absorption K du platine (78.39 keV). Seuls les clones de plus de 50 cellules ont été pris en considération et chaque barre d'erreur représente l'écart type de la survie calculée avec 6 boîtes de Pétri. Les données ont été ajustées au modèle linéaire-quadratique : $S/S_0 = \exp(-0.172 D - 0.0384 D^2)$	241

Figure V-30 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à 0.1 μM de CDDP pendant 48 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, d'énergie située 400 eV au-dessus ($\blacktriangle$) ou en dessous ($\triangle$) du seuil d'absorption K du platine. Les contrôles ($\blacksquare$) ont été incubés sans CDDP.....	242
Figure V-31 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à 1 μM de CDDP pendant 12 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, d'énergie située 400 eV au-dessus ($\blacktriangledown$) ou en dessous ($\triangledown$) du seuil d'absorption K du platine. Les cellules de contrôle ($\bullet$) ont été incubées sans CDDP.....	242
Figure V-32 : Corrélation entre la toxicité de l'exposition des cellules SQ20B au cisplatine et le contenu intracellulaire de platine, mesuré par ICP-MS.....	245
Figure V-33 : Cartographies de l'intensité du rayonnement de fluorescence mesuré pour les éléments potassium, platine et zinc. Mesures réalisées par SR-XRF sur une unique cellule SQ20B traitée avec 100 μM de CDDP pendant 6 heures. La taille de la matrice d'acquisition est de 30 x 30 μm^2 et la taille du pixel de 1 μm (vertical) x 3 μm (horizontal). Le temps d'intégration par point est de 100 secondes.....	246
Figure V-34 : Cassures simple-brin induites par l'activation résonante de platine vectorisé dans les cellules SQ20B sous forme de CDDP. (a) incidence des CSB pour des cellules traitées au CDDP (contrôles : symbole rond, 3 μM pendant 6 heures : symbole triangle ; 30 μM pendant 6 heures : symbole carré) et irradiées 400 eV au-dessus (symboles blancs) ou en dessous (symboles noirs) du seuil K du platine. Chaque point représente la moyenne $\pm$ l'écart-type des valeurs obtenues après trois expériences indépendantes (b) Evolution temporelle normalisée de la réparation des CSB générées dans des cellules SQ20B pré-traitées par 30 μM de CDDP pendant 6 heures et irradiées par 16 Gy au-dessus (O) ou en dessous($\blacksquare$) du seuil K du platine	251
Figure V-35 : Cassures double-brins induites par l'activation résonante de platine vectorisé dans les cellules SQ20B sous forme de CDDP. (a) incidence de CDB pour des cellules traitées au CDDP (contrôles : symbole rond, 3 μM pendant 6 heures : symbole triangle ; 30 μM pendant 6 heures : symbole carré) et irradiées 400 eV au-dessus (symboles blancs) ou en dessous (symboles noirs) du seuil K du platine. Chaque point représente la moyenne $\pm$ l'écart-type des valeurs obtenues après trois expériences indépendantes (b) Évolution temporelle normalisée de la réparation des CDB générées dans des cellules SQ20B pré-traitées par 30 μM de CDDP pendant 6 heures et irradiées par 16 Gy au-dessus (O) ou en dessous($\blacksquare$) du seuil K du platine	253
Figure V-36 : Migration en champs pulsés à partir des blocs d'agarose contenant des cellules SQ20B exposées à différentes combinaisons d'un traitement de 30 μM de CDDP pendant 6 heures et de 16 Gy de rayons X d'énergie supérieure (A) ou inférieure (B) au seuil K du platine.....	254
Figure V-37 : Activité DNA-pK de cellules SQ20B exposées à 30 μM de CDDP pendant 6 heures et irradiées à 16 Gy au-dessus (A) ou en dessous (B) du seuil K du platine. Deux durées de réparation à 37°C ont été étudiées : 0 et 4 heures. Les données représentent la moyenne $\pm$ l'écart-type des valeurs trouvées lors de deux expériences indépendantes.	255
Figure V-38 : Localisation nucléaire de la protéine RAD51 dans des cellules SQ20B exposées à 30 μM de CDDP pendant 6 heures et irradiées à 10 Gy par des rayons X monochromatiques d'énergie supérieure (a) ou inférieure (b) au seuil K du platine. Les contrôles non traités et non irradiés sont représentés en (c). Les noyaux ont été colorés en bleu au DAPI et les foci rad51 apparaissent ici de couleur verte. La durée de réparation est de 1 heure.	257
Figure V-39 : Quantification des foci RAD51 dans les noyaux cellulaires de cellules SQ20B traitées ($\_P$) ou non ($\_0$) par 30 μM de CDDP pendant 6 heures et irradiées ou non ($0\_$) par 10 Gy de rayons X d'énergie légèrement supérieure ($A\_$) ou inférieure ($B\_$) au seuil K du platine. Deux critères ont été étudiés : le comptage sur au moins 300 cellules (a) du nombre de cellules avec un nombre significatif de foci RAD51 et (b) le nombre moyen de foci RAD51 par cellule	258
Figure V-40 : Courbes de survie des cellules SQ20B préalablement exposées à 350 μM de PtTC pendant 6 heures et irradiées avec un rayonnement X monochromatique, en dessous et au-dessus du seuil K du platine.....	263
Figure V-41 : Radiosensibilisation et radioprotection des dommages créés aux cellules SQ20B par l'association d'une irradiation en rayonnement monochromatique et une exposition de 6 heures à 350 μM de PtTC.	264
Figure V-42 : (a) Incidence et (b) pourcentage de non-réparation après 4 heures des cassures double-brins induites par une irradiation de 16 Gy au-dessus (A) ou en dessous (B) du seuil K du platine introduit (P)	

par une exposition de 30 μ M de CDDP pendant 6 heures pour les cellules SQ20B et 1 μ M pendant 6 heures pour les IGROV1..... 266

Figure V-43 : Activité de la tyrosine kinase c-Abl pour les cellules SQ20B et HCC1937 exposées à 30 μ M de CDDP et irradiées par 16 Gy de rayons X d'énergie légèrement supérieure (AP) ou inférieure (BP) au seuil K du platine. La période de réparation après irradiation est de 4 heures..... 267

Table des Tableaux

Chapitre III

Tableau III-1: Comparaison de l'expression analytique des signaux obtenus pour deux types de soustraction logarithmique.....	79
Tableau III-2: Comparaison des caractéristiques physiques de l'iode et du gadolinium, d'après [Hubb97] et [Nowo98].....	83
Tableau III-3: Coefficients massiques d'atténuation totale et d'absorption d'énergie de l'iode pour des énergies de photons situées de part et d'autre de ses seuils K, L _I , L _{II} , et L _{III} d'après [Boon96].....	85
Tableau III-4 : Proportions massiques d'iode et d'eau pour des mélanges contenant une certaine concentration d'iode. Calcul du DEF du mélange	89
Tableau III-5 : Répartition des modes de dépôt de l'énergie après interaction de photons sur des atomes d'iode, d'après [Cull89].....	93
Tableau III-6 : Répartition des modes de dépôt de l'énergie après interaction de photons sur des atomes de platine d'après [Cull89]	93
Tableau III-7 : Largeurs de raie du comblement par voie radiative et non-radiative d'une lacune en couche K, L _I , L _{II} ou L _{III} de l'iode et énergies moyennes totales libérée après réorganisation du cortège électronique, d'après [Perk91].....	96
Tableau III-8 : Largeurs de raie du comblement par voie radiative et non-radiative d'une lacune en couche K, L _I , L _{II} ou L _{III} du platine et énergies moyennes totales libérée après réorganisation du cortège électronique, d'après [Perk91].....	96
Tableau III-9 : Approche du spectre de photons de fluorescence et d'électrons initialement générés après création d'une lacune en couche K ou L _I sur des atomes d'iode. Distribution des vacances électroniques.....	99
Tableau III-10 : Approche du spectre de photons de fluorescence et d'électrons initialement générés après création d'une lacune en couche K ou L _I sur des atomes de platine. Distribution des vacances électroniques.	99

Chapitre IV

Tableau IV-1 : Présentation des agents de contraste iodés utilisés	117
Tableau IV-2 : Présentation de l'agent de contraste baryté utilisé.....	118
Tableau IV-3 : Présentation des agents de contraste paramagnétiques utilisés	119
Tableau IV-4 : Présentation de l'analogue de thymidine utilisé	120
Tableau IV-5: Présentation du chloroterpyridine platinum utilisé.....	121
Tableau IV-6 : Présentation du cisplatine utilisé	121
Tableau IV-7 : Pour plusieurs énergies, comparaison des débits de doses de référence mesurés par la chambre d'ionisation PTW 31002 ou le détecteur Germanium haute pureté.	146
Tableau IV-8 : Gamme d'étalonnage correspondante	171

Chapitre V

Tableau V-1 : Concentrations minimales détectables avec un RSB de 3 mesurées sur dans le fantôme tête pour une dose surface de 60 cGy et une hauteur de faisceau de 1 mm. Comparaison des techniques de soustractions K-edge et temporelle. La taille du détail considéré ici est de 3 mm.....	190
Tableau V-2 : Concentrations d'iode et de gadolinium attendues dans la circulation sanguine et les tissus sains cérébraux dans des modèles de recherche (rat) et en clinique (homme).....	195
Tableau V-3 : Concentrations moyennes d'iode et de gadolinium mesurées in vivo dans différentes régions du cerveau de rats porteurs de tumeurs cérébrales, 10 minutes après une injection manuelle.....	200

Tableau V-4 : Comparaison des paramètres d'augmentation de radiosensibilisation mesurés pour les cellules SQ20B en présence d'Iomeron® dans le milieu de culture, en fonction du débit de dose. L'énergie d'irradiation était de 50 et 52 keV, respectivement pour le monochromateur de tomographie et d'angiographie.	228
Tableau V-5 : Distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire à différents moments de leur irradiation en rayonnement synchrotron, pour les cellules traitées avec 0.1 µM de CDDP pendant 48 heures et les contrôles (0.1 µM CDDP pendant 48h)	243
Tableau V-6 : Distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire à différents moments de leur irradiation en rayonnement synchrotron, pour les cellules traitées avec 1 µM de CDDP pendant 12 heures et les contrôles.....	243
Tableau V-7 : Contenu intracellulaire de platine, mesuré par ICP-MS, en fonction de l'exposition des cellules SQ20B au cisplatine et de sa toxicité.....	244