



# Développement de la plateforme Radiograaff d'irradiation protons pour des études en radiobiologie.

Julie Constanzo

► **To cite this version:**

Julie Constanzo. Développement de la plateforme Radiograaff d'irradiation protons pour des études en radiobiologie.. Physique Nucléaire Expérimentale [nucl-ex]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. <tel-00977357>

**HAL Id: tel-00977357**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00977357>**

Submitted on 11 Apr 2014

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

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

## Thèse

présentée devant

l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale de Physique et d'Astrophysique

pour l'obtention du

**DIPLÔME de DOCTORAT**

Spécialité : Physique Nucléaire et Radiobiologie

(arrêté du 7 août 2006)

par

**Julie CONSTANZO**

### **Développement de la plateforme Radiograaff d'irradiation protons pour des études en radiobiologie**

Soutenue publiquement le 7 Novembre 2013  
devant la Commission d'Examen

Jury :

M.	J-M. Moreau	Président du jury
M.	G. Montarou	Rapporteur
M.	E. Balanzat	Rapporteur
M.	M. Beuve	Directeur de thèse
Mme	M. Fallavier	Examinatrice
Mme	C. Rodriguez-Lafrasse	Examinatrice
M.	F. Haddad	Examinateur
M.	P. Barberet	Examinateur



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Denis Dauvergne et Michael Beuve, mes deux directeurs de thèse. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et surtout de m'avoir proposé ce sujet de thèse qui m'a ouvert un univers nouveau et qui me correspond si bien.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mireille Fallavier pour tout le temps que tu m'as consacré, tous tes bons conseils, tous tes encouragements. Tu as su me transmettre ton savoir sur les lignes d'irradiation que j'espère à mon tour pouvoir partager un jour. Tu m'as appris la patience et la persévérance (l'obstination même !) qui sont deux qualités indispensables en expérimentation. Pour tout ça, merci.

Merci à Guy Chanfray, directeur de l'IPNL, de m'avoir accueilli dans le laboratoire.

Merci à Jean-Michel Moreau d'avoir présidé mon jury de thèse et d'avoir été présent pendant les GANIL et tous les soucis que ça peut engendrer. Marianne Tery, je ne t'oublie pas non plus : merci. Un grand merci à Gérard Montarou et Emmanuel Balanzat d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci pour vos conseils. Merci à Claire Rodriguez-Lafrasse tant pour avoir accepté d'être examinatrice de mon travail de thèse que pour vos conseils et votre soutien. Je remercie Philippe Barberet et Ferid Haddad d'avoir accepté d'être examinateurs et pour les discussions durant la soutenance.

Je tiens tout particulièrement à remercier toutes les personnes qui ont aidé à la mise en place de la plateforme d'irradiation et celle du laboratoire de biologie cellulaire : le service mécanique (Franck Mounier, Jean-Luc Montorio, Thierry Alliaume, Alain Benoit, Lionel Germani et Jean-Christophe Ianigro, mon binôme) , le service électronique Rodolphe Della Negra), le service de maintenance et logistique (Annick Blainville, Jean-Michel Solbes, Jean-Paul Narcisse) et bien sur, le service accélérateur (Clément Bernard, Yves Champolivier, Raphael Fillol et Christophe Peaucelle).

Je n'oublie pas non plus l'aide précieuse de Priscillia Battiston-Montagne et Gersende Alphonse pour tous les aspects touchant à la biologie. Je voudrai remercier également Yves Tourneur et Denis Ressenikoff pour toute votre aide, votre soutien et vos bons conseils. Je remercie l'ensemble des doctorants du laboratoire (Julien et Maxime, merci pour votre ouvrage « la femme parfaite est une connasse ») ainsi que Sylvie Flores pour sa gentillesse et l'aide logistique qu'elle m'a apportée pendant 3 ans. Je remercie Cédric Ray ; merci de m'avoir suivi depuis si longtemps et pour tous tes conseils avisés depuis ma Licence jusqu'à la fin de ma thèse. Daniel Guinet, mon parrain de thèse, tu as toujours été là quand il fallait, merci mille fois pour ton amitié.

Je remercie également toutes les sources de financement du projet : le PRRH ETOILE, le CNES et le GdRMi2B.

Marie-Hélène, Laurie, Loïc, Georges, Ion-ion, Sylvano, Billy, Coralie, mes compagnons de galère au GANIL, merci pour votre amitié et tous nos nombreux foux-rires (O-Zone, « T'as pas de papiers ? », les œufs durs, le coca, les chips, les zombies, REC,...).

Enfin je remercie les personnes qui m'ont supportées en dehors du laboratoire. Et quand je dis supporter...le mot est faible ! Evidemment, les premiers que je remercie sont mes parents, toujours à fond derrière moi, toujours de bons conseils. Merci de m'avoir offert de si belles études. Merci à ma mamie Fernande, la meilleure cuisinière du monde avec son fameux ragout ! Sans tes tupperwares j'aurai fini ma thèse avec des chips trempées dans de la moutarde ! Merci à ma sœur Sophie et mon beau-frère

Jacques pour les dimanches et tous les bons moments. Merci aux deux amours de ma vie : Pauline et Margot. Vous êtes le meilleur fan club du monde !

Pour finir je vais remercier la meilleure tribu au monde : ma framily. Ma Mymy & mon bro Dove, mon chonchon Pack (« hé oh faut vivre ! »), ma choutte Estelle (les nuits de Fourvière...le début d'une belle amitié ! « hiiii, une souris ! »), ma H (trop de choses à dire. Peut-être juste « c'est deux ou rien »), mon bro Vince (« toniiiiight, weeee are youuuung ! », le reste, pas possible d'en parler ici !), le Ben et toutes nos marches sur le campus, mon KB, Cléo et Loris (mes enfants). Et tous les autres électrons libres du volley (Lolo, Manue, Laurent, Lénaïc, Gabrielle...), de la fac, du lycée... Et pour finir un immense merci à mon Mathieu, c'est quand même toi qui t'es réveillé à côté du T-Rex les derniers jours avant la soutenance. Merci d'avoir été là et d'avoir été aussi doux et patient.





# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Contexte et objectifs scientifiques .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Interaction ions matière vivante .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Pic de Bragg : avantage physique des ions .....	15
a) Profil de dépôt de dose en profondeur .....	16
(i) Quelques définitions .....	16
Dépôt en énergie .....	16
La dose .....	19
La fluence .....	19
Pouvoir d'arrêt .....	20
Evolution du pouvoir d'arrêt en fonction de l'énergie cinétique du projectile .....	20
Evolution du pouvoir d'arrêt en fonction du parcours du projectile .....	21
(ii) Transfert d'énergie linéique .....	22
b) Elargissement latéral et longitudinal du faisceau .....	24
(i) Les causes principales de l'élargissement latéral et longitudinal d'un faisceau d'ions.....	24
(ii) Réactions nucléaires .....	26
1.1.2 Efficacité Biologique Relative : avantages biologiques des ions .....	27
a) Définition de l'EBR .....	27
b) Facteurs influençant l'EBR .....	28
c) Effet oxygène .....	30
<b>1.2 Contexte scientifique du projet et état de l'art .....</b>	<b>31</b>
1.2.1 Etudes des rayonnements présentant une EBR supérieure aux photons .....	33
a) Radioprotection .....	33
b) Aérospatiale .....	34
1.2.2 Différentes modalités d'irradiation en radiobiologie .....	35
a) Expérience segment de trace .....	36
(i) Faisceau monoénergétique .....	36
(ii) Expérience à TEL moyen .....	36
b) Expériences « pic de Bragg » in vitro .....	37
c) Microfaisceau .....	37
d) Macrofaisceau en France .....	38
(i) Les plateformes françaises pour la radiobiologie .....	38
(ii) Etat de l'installation au début du projet de thèse .....	40
1.2.3 Plateforme Radiograaff .....	40
a) Intérêts scientifiques du projet .....	40
b) Les objectifs du projet .....	42
(i) Objectifs fixés .....	42
(ii) Contraintes biologiques .....	43
(iii) Difficultés majeures .....	43
<b>2 Développements instrumentaux de la ligne Radiograaff : de la conception à la qualification .....</b>	<b>48</b>
<b>2.1 Conception et réalisation de la ligne d'irradiation .....</b>	<b>49</b>
2.1.1 Délivrance et extraction du faisceau .....	49
a) Les origines des lignes d'irradiation dédiées aux études en radiobiologie .....	49
b) Délivrance du faisceau .....	52
c) Extraction du faisceau .....	54
2.1.2 Dimensionnement théorique : utilisation des outils SRIM et GATE .....	55

a) SRIM .....	55
b) GATE : Geant4 Application for Tomographic Emission .....	56
c) Exemples de résultats des simulations de taux de réduction avec GATE v6.1. ....	57
2.1.3 Résumé des caractéristiques .....	59
2.1.4 Contrôle en ligne de l'irradiation .....	60
a) Quelques exemples de solutions possibles .....	60
b) Dimensionnement .....	61
c) Schéma de principe, caractéristiques et acquisition des données .....	62
2.1.5 Dispositif expérimental et interface utilisateur .....	64
2.1.6 Contrôle de la dosimétrie .....	66
a) Outils de mesure de la dose absorbée : principes, avantages et limitations ....	66
(i) Chambre d'ionisation .....	66
(ii) Couplage caméra CCD – cristal scintillant .....	67
(iii) Films radiochromiques .....	69
(iv) Les détecteurs solides de traces : CR39 .....	70
(v) Diode silicium .....	71
b) Contrôle de la dosimétrie de la ligne d'irradiation Radiograaff .....	73
(i) Le détecteur .....	73
(ii) L'électronique associée au détecteur .....	74
(iii) Contrôle qualitatif de la distribution spatiale des ions .....	75
<b>2.2 Evaluation et qualification de la plateforme .....</b>	<b>75</b>
2.2.1 Matériel et méthode .....	76
a) Protocole de calibration et tests .....	76
(i) Calibration .....	76
(ii) Tests supplémentaires .....	77
(iii) Résumé .....	78
b) Protocole de mesure en énergie .....	79
c) Protocole de mesure de la distribution spatiale des ions .....	79
d) GATE v6.1 : simulations .....	80
2.2.2 Résultats .....	80
a) Mesure en énergie .....	80
b) Qualification de la dosimétrie .....	81
(i) Mesure de l'hétérogénéité de la distribution spatiale de la Fluence ....	81
(ii) Estimation des incertitudes sur la dose.....	83
c) Résumé .....	83
<b>3 Développements techniques et expérimentaux pour la plateforme</b>	
<b>Radiograaff et premiers résultats de radiobiologie .....</b>	<b>89</b>
<b>3.1 Introduction .....</b>	<b>89</b>
<b>3.2 Développements spécifiques pour la radiobiologie cellulaire .....</b>	<b>90</b>
3.2.1 Mise au point de protocoles biologiques dédiés à la plateforme Radiograaff ...	90
3.2.2 Passeur d'échantillons automatisé .....	92
3.2.3 Enceinte thermostatée et atmosphère contrôlée .....	93
3.2.4 Laboratoire de biologie cellulaire .....	94
<b>3.3 Etudes d'irradiations cellulaires sur la plateforme Radiograaff .....</b>	<b>96</b>
3.3.1 Rappels sur les principaux mécanismes en radiobiologie .....	96
a) La structure de l'ADN .....	97
b) Le cycle cellulaire .....	97
c) Les lésions induites à l'ADN par les rayonnements .....	98
(i) Cassures simple-brin (CSB) .....	99
(ii) Cassures double-brin (CDB) .....	99
(iii) Modifications de bases .....	99
(iv) Modification des sucres .....	100

---

(v) Pontages .....	100
(vi) Dommages multiples localisés .....	100
d) La signalisation des dommages à l'ADN .....	101
e) La réparation des lésions de l'ADN .....	102
f) Le rôle de la chromatine dans la réparation de l'ADN .....	103
(i) Chromatine : structure et fonction .....	104
(ii) L'histone H2AX .....	105
g) Les différents types de mort cellulaire .....	105
3.3.2 Choix des observables biologiques .....	106
a) Survie cellulaire : définition .....	107
b) Immunodétection de dommages à l'ADN.....	108
3.3.3 Choix des lignées tumorales humaines .....	109
3.3.4 Matériel et méthode .....	109
3.3.5 Culture cellulaire et irradiation .....	109
3.3.6 Protocole de réalisation de courbe de survie .....	110
3.3.7 Immunodétection de dommages à l'ADN : analyse par microscopie .....	110
<b>3.4 Résultats des études de radiobiologie .....</b>	<b>111</b>
3.4.1 Détermination de la survie clonogénique .....	111
a) Résultats .....	111
b) Discussion .....	113
3.4.2 Cinétique du nombre de foci par noyau .....	114
a) Résultats .....	115
b) Discussion .....	116
<b>3.5 Poursuite des études sur les dommages à l'ADN : vers une automatisation de l'analyse .....</b>	<b>117</b>
3.5.1 Utilisation d'un microscope confocal .....	117
a) Acquisition des images .....	118
b) Résolution du microscope .....	118
3.5.2 Développement d'une macro d'analyse : cahier des charges .....	120
3.5.3 Développement d'une macro d'analyse : principe général .....	121
3.5.4 Exemple d'un protocole .....	123
3.5.5 Illustration d'un comptage par la macro .....	124
3.5.6 Résultat du comptage du nombre de foci par noyau par la macro 5.0 sur la lignée SQ20B après irradiation protons .....	125
<b>4 Conclusion .....</b>	<b>131</b>



# Introduction



## Introduction

La connaissance de l'impact des rayonnements ionisants sur la santé est primordiale dans de nombreux contextes, associés en général à la radioprotection et à la radiothérapie. L'étude épidémiologique la plus connue et la plus utilisée reste celle de la cohorte LSS (Life Span Study), qui concerne le suivi de l'augmentation des taux de leucémies et de tumeurs solides des 120 300 survivants aux attaques nucléaires de Hiroshima et Nagasaki. Il ressort de cette étude une corrélation entre le risque d'apparition d'un cancer et la dose (Beebe et al. 1977). Dans le domaine de la radioprotection (énergie nucléaire, militaire, aérospatiale, imagerie médicale, etc.) des facteurs de pondération ont été définis pour tenir compte des caractéristiques du rayonnement (énergie, particules) et des tissus concernés (CIPR 103, 2007). Dans le domaine de la radiothérapie, de la protonthérapie, de l'hadronthérapie par ions carbone et de la neutronthérapie, des quantités plus précises ont été définies à partir d'une meilleure compréhension des effets physiques et biologiques des interactions de chaque type de particule avec la matière vivante. Les innovations technologiques se sont succédées afin d'optimiser les traitements, i.e. identifier, cibler et irradier les tissus tumoraux tout en préservant au mieux les tissus sains. Ces innovations concernent aussi bien les techniques d'imagerie que les techniques d'irradiation en passant par les techniques de calcul et de planification de traitement. En outre, la probabilité de contrôle de la maladie dépend également des caractéristiques de la tumeur et de son environnement (volume tumoral, radiorésistance, hypoxie, voies de dissémination). Quoi qu'il en soit, la tendance globale en radiothérapie est que l'augmentation de la dose délivrée dans les tumeurs, conduit généralement à une hausse du taux de contrôle local, mais aussi à un risque de complications dans les tissus sains. L'enjeu majeur en radiothérapie consiste à optimiser le différentiel de dose entre la tumeur et les tissus sains.

Dans ce sens, l'hadronthérapie a permis la mise en place de modalités innovantes de radiothérapie du cancer, basée sur deux propriétés fondamentales : i) les propriétés physiques des ions, qui sont d'ordre balistique, permettent une distribution de la dose favorable comparée à celle d'un faisceau de photons (meilleur degré de conformation), ii) les propriétés biologiques des ions, que l'on pourrait définir comme l'efficacité à altérer des cellules tumorales (propriété cytotoxiques), qui sont supérieures à celles des photons.

La protonthérapie, qui est apparue dans les années 1950 pour une utilisation à des fins médicales, a déjà fait ses preuves dans le monde et en France (avec les installations d'Orsay (CPO Curie) et Nice (Antoine-Lacassagne)) avec plus de 83 000 patients traités à ce jour dans l'ensemble des centres dans le monde (PTCOG, 2012). Certaines indications sont maintenant solidement validées, c'est le cas des mélanomes oculaires, des chordomes ou des chondrosarcomes de la base du crâne. À partir des deux centres français de protonthérapie, ainsi que du développement en conditions cliniques de la thérapie par ions carbone au Japon et en Europe, deux projets d'installations de faisceaux d'ions carbone sont en préparation en France à la fois pour le traitement (ETOILE à Lyon) et la recherche technologique (ARCHADE à Caen). L'ensemble des centres français de thérapies par ions, existants ou en projet, sont organisés au sein du réseau France Hadron qui coordonne un programme de recherche national auquel le groupe CAS-Phabio de l'Institut de Physique Nucléaire de Lyon contribue. Le choix

d'orienter le traitement des cancers vers les irradiations par ions carbone pour certaines indications très ciblées (tumeurs radiorésistantes situées près d'organes à risque) est principalement lié à leur efficacité biologique relative par rapport à des photons, meilleure que celle des protons.

Quel que soit le type de particule chargée utilisée, la mise en œuvre et l'optimisation des traitements avec des faisceaux d'hadrons nécessitent des progrès dans le domaine de la radiobiologie, pour la conception d'un traitement efficace des patients atteints de cancer. En effet, en plus des aspects liés au transfert d'énergie à l'échelle microscopique (type de particules, énergie, vitesse), l'efficacité biologique relative peut varier selon la lignée cellulaire (degré de radiosensibilité) et la dose déposée. Comprendre cette complexité passe par des études de radiobiologie à l'échelle cellulaire. C'est dans ce cadre que les faisceaux d'ions, d'abord développés pour des études de physique, se sont avérés être des outils efficaces ayant un fort potentiel pour l'investigation des mécanismes biologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire (mort cellulaire, signalisation, endommagement et réparation, instabilité chromosomique). Les études de radiobiologie avec des ions peuvent être réalisées en France au GANIL à Caen (ions carbone de 13-95 MeV/A, ions argon 95 MeV/A), au CPO à Orsay (protons de 201 MeV qui peuvent être dégradés en protons de 73 MeV), au centre Antoine-Lacassagne à Nice (protons de 63 MeV), au CENBG à Bordeaux ou à Pierre Süe à Orsay (microfaisceaux de protons et d'hélium de moyenne énergie). Ces deux dernières installations permettent une irradiation ciblée des cellules (notamment du noyau), permettant par exemple des études par imagerie des événements précoces. Les centres GANIL, CPO et Antoine-Lacassagne, sont équipés de systèmes d'irradiation à champ large permettant d'irradier une grande quantité de cellules et donc de réaliser des études quantitatives. Entre autres, la survie des cellules constitue une donnée intéressante pour la thérapie car elle est corrélée au contrôle local de la tumeur.

Le facteur limitant des études expérimentales est la très faible disponibilité des plateformes d'irradiation. Les faisceaux disponibles sur les plateformes à champ large sont principalement dédiés à d'autres activités (physique nucléaire, clinique) et les expériences avec des microfaisceaux sont délicates, coûteuses en temps et très spécifiques, ne permettant pas un accès large à des groupes de recherche.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été réalisés dans le cadre du développement d'une plateforme d'irradiation à champ large dédiée aux études en radiobiologie (Radiograaff) à partir de l'accélérateur Van de Graaff 4 MV de l'Institut de Physique Nucléaire de Lyon. Ceci, grâce à une collaboration étroite et interdisciplinaire entre les physiciens et ingénieurs de l'Institut de Physique Nucléaire de Lyon (IPNL) et des biologistes du laboratoire de radiobiologie cellulaire et moléculaire (LRCM) du CHU de Lyon Sud. Afin de présenter le développement de la plateforme Radiograaff, ce manuscrit se découpera en trois chapitres.

Le premier chapitre présente les fondements de l'hadronthérapie et le contexte scientifique du projet. Nous traiterons, dans une première partie, de l'interaction ions-matière vivante afin de mieux cerner les concepts théoriques associés à l'hadronthérapie. Et nous présenterons, dans un second temps, les intérêts scientifiques et les objectifs du projet Radiograaff, qui seront introduits par une section sur les études des rayonnements présentant une efficacité biologique relative supérieure aux photons et par un état de l'art des différentes modalités d'irradiation en radiobiologie.

Le chapitre suivant concernera les développements instrumentaux de la ligne d'irradiation. Une première partie traitera de la conception et de la réalisation de la ligne d'irradiation. Ensuite, après avoir présenté le mode de délivrance et d'extraction du faisceau ainsi que les méthodes de simulation que nous avons employées pour le dimensionnement théorique la ligne d'irradiation, nous exposerons le système de contrôle de la dosimétrie. Enfin, la seconde partie présentera l'évaluation et la qualification de la plateforme avec le matériel et les méthodes de mesure employés ainsi que les résultats qui ont permis la qualification de la ligne d'irradiation.

Enfin, dans le troisième chapitre, après une brève présentation de quelques aspects de biologie et de radiobiologie, nous présenterons les premiers résultats obtenus concernant l'efficacité biologique relative des protons délivrés par la plateforme Radiograaff. Nous discuterons des protocoles, des conditions expérimentales ainsi que des méthodes d'analyse des résultats.



# 1

## Contexte et objectifs scientifiques

<b>1</b>	<b>Contexte et objectifs scientifiques.....</b>	<b>15</b>
1.1	<b>Interaction ions matière vivante .....</b>	<b>15</b>
1.1.1	Pic de Bragg : avantage physique des ions .....	15
1.1.2	Efficacité Biologique Relative : avantages biologiques des ions .....	27
1.2	<b>Contexte scientifique du projet et état de l'art.....</b>	<b>31</b>
1.2.1	Etudes des rayonnements présentant une EBR supérieure aux photons.....	33
1.2.2	Différentes modalités d'irradiation en radiobiologie .....	35
1.2.3	Plateforme Radiograaff.....	40



# 1 Contexte et objectifs scientifiques

Avec l'avènement des cyclotrons dans les années 1940, il est devenu possible d'accélérer suffisamment des ions légers pour atteindre des parcours de l'ordre de la dizaine de cm dans des tissus biologiques. Cette avancée a ouvert la voie aux traitements des tumeurs par ions légers, ce que l'on appelle l'hadronthérapie par ions.

Actuellement, l'hadronthérapie par ions utilise des faisceaux de protons et d'ions  $^{12}\text{C}$ . Ces faisceaux de particules chargées offrent des avantages significatifs pour le traitement des tumeurs profondes ou situées dans des organes à risques par rapport à un traitement conventionnel utilisant les rayons X (radiothérapie). La distribution du dépôt de dose physique est caractérisée par une faible dose en entrée, un maximum bien marqué (pic de Bragg) et une chute, correspondant à l'arrêt des particules.

Par ailleurs, les ions légers ( $2 < Z < 8$ ), en particulier les ions carbone, montrent une augmentation de l'efficacité biologique précisément dans la région du pic de Bragg. Ce phénomène est dû à une densité d'ionisation élevée le long de la trace des particules conduisant à la diminution de la capacité pour la cellule à se réparer.

Ce premier chapitre, découpé en deux parties, présente les deux problématiques principales qui justifient ce travail : pourquoi faire des études en radiobiologie et quels en sont les enjeux scientifiques ? La première partie traitera des interactions ions-matière vivante en s'intéressant aux propriétés physiques et biologiques des ions. La seconde partie présente le contexte scientifique du projet et l'état de l'art, avec pour but de montrer l'intérêt du développement d'une plateforme d'irradiation avec des protons de moyenne énergie dédiée à des études en radiobiologie.

## 1.1 Interaction ions matière vivante

### 1.1.1 Pic de Bragg : avantage physique des ions

La radiothérapie joue un rôle important dans le traitement des cancers. Après la chirurgie, c'est le traitement le plus fréquemment appliqué. Plus de 50% des patients présentant des tumeurs malignes localisées sont traités de cette manière. On peut utiliser des techniques permettant de conformer au mieux les traitements en photons : IMRT, Stéréotaxie, etc. mais une alternative est possible en utilisant des faisceaux de haute énergie de particules chargées (protons et ions légers), qui offrent des avantages significatifs pour le traitement des tumeurs localisées en profondeur, proche d'organes à risques, en comparaison aux traitements conventionnels en radiothérapie.

Tout d'abord, nous allons aborder le concept de dépôt d'énergie et de dose pour comprendre les différences majeures qu'il y a entre radiothérapie et hadronthérapie d'un point de vue physique. Ensuite, nous allons discuter de la distribution linéique des ionisations ; notion introduite pour rendre compte de la distribution linéique des ionisations. Enfin, nous présenterons les problèmes de déflexion latérale et longitudinale des faisceaux de protons par rapport aux faisceaux de carbone, qui peut être un inconvénient pour le traitement de tumeurs proches d'organes à risques.

a) Profil de dépôt de dose en profondeur

(i) *Quelques définitions*

- *Dépôt en énergie.*

La raison principale de l'utilisation de particules chargées pour le traitement de tumeurs localisées est leur profil de dépôt de dose favorable démontré par William Henri Bragg qui a étudié le ralentissement des particules  $\alpha$  dans l'air (Bragg & Kleeman 1905). C'est en 1946 que Robert R. Wilson a proposé l'utilisation des protons et des ions légers pour leur précision balistique en radiothérapie.

Les rayonnements X de haute énergie, communément utilisés en radiothérapie, montrent une diminution de la distribution de dose en fonction de la profondeur de pénétration dans le corps du patient. Hormis la zone de build-up, les photons délivrent une dose plus élevée à l'entrée (tissus sains) puis cette dose est atténuée dans le volume cible. Ce phénomène est une donnée de base à prendre en compte lors des traitements par radiothérapie externe, et est en partie contourné par l'utilisation de plusieurs incidences de faisceaux. D'un point de vue balistique, deux aspects sont à prendre en compte : le nombre de photons primaires qui évolue en fonction de la profondeur ainsi que la manière dont ils transfèrent leur énergie en fonction de la profondeur. Pour comprendre ce comportement, considérons la

Figure 1 qui présente une courbe de rendement en profondeur simulée avec GEANT4 pour un faisceau de photons de 3 MeV dans du PMMA (Polyméthacrylate de Méthyle).

La notion de rendement en profondeur permet de quantifier l'absorption d'énergie en fonction de l'épaisseur de matériau traversée.

Trois courbes sont présentées sur cette figure. La composante primaire correspond au dépôt de dose dû aux photons primaires. La composante secondaire représente la dose déposée par les photons secondaires c'est-à-dire, l'ensemble des photons primaires ayant subi une première interaction dans le milieu. La courbe « dose totale » est la somme de ces deux contributions. La forme particulière de la contribution des photons secondaires, et notamment le passage par un maximum à une profondeur donnée, est due à la compétition entre, d'une part, la « création » cumulée de photons secondaires et, d'autre part, la diminution du nombre de photons primaires disponibles et l'atténuation en énergie des photons secondaires. À haute énergie, l'augmentation de la dose que l'on peut observer dans les premiers centimètres, est aussi liée à une mise en équilibre électronique. En effet, l'interaction la plus probable des photons est due à l'effet Compton, qui a un libre parcours moyen élevé et qui met en mouvement des électrons rapides plutôt vers l'avant. Le dépôt de dose est dû aux électrons dont le flux augmente, par accumulation, sur quelques centimètres alors que le flux de photons diminue exponentiellement.

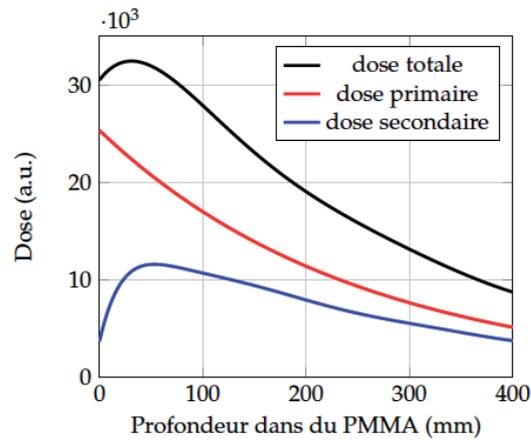


Figure 1 - Courbes de rendement en profondeur simulé avec GEANT4 pour un faisceau de photons de 3 MeV dans du PMMA. La dose totale est la résultante d'une contribution primaire (en rouge) et d'une contribution secondaire (en bleu), qui représente l'ensemble des photons primaires ayant subi une première interaction dans le milieu. [Lestand, 2012]

Ceci conduit à une valeur maximale de la dose, dont la position en profondeur varie avec l'énergie du faisceau de photons, comme le montre la

Figure 2. Il s'agit de deux courbes de rendement en profondeur mesurées sur un accélérateur linéaire clinique de tension allant de 6 à 18 MV. On observe que la différence entre la dose à l'entrée et la dose maximale est d'autant plus grande que l'énergie du faisceau est grande.

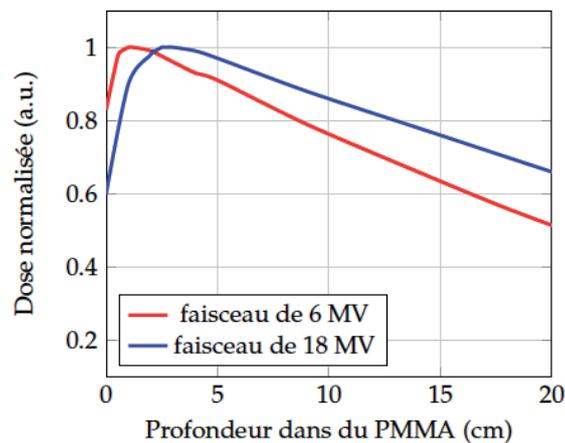


Figure 2 - Courbes de rendement en profondeur mesurées sur un accélérateur linéaire délivrant des faisceaux d'électrons 6 MV et de 18 MV. [Lestand, 2012]

D'un premier abord, on serait tenté de penser que, pour atteindre une profondeur donnée, il suffit de jouer sur l'énergie du faisceau de sorte que la profondeur du traitement coïncide avec la profondeur du maximum de dose. Cela pourrait être une solution envisageable, mais en pratique cela soulèverait au moins deux difficultés. La première, est d'ordre technique. Il faudrait des accélérateurs qui permettent d'atteindre des énergies nettement supérieures à 25 MV pour que la profondeur maximale soit de l'ordre de la dizaine de centimètres dans les tissus biologiques. La seconde difficulté rencontrée est d'ordre dosimétrique, en effet, plus l'énergie augmente et plus la section efficace d'interaction photo-nucléaire augmente. Il en résulte donc une production de neutrons secondaires très nocifs pour les tissus sains avoisinants. Pour remédier à ces deux difficultés, en pratique, on a recours à une multiplication des irradiations avec des incidences qui convergent vers le volume prévisionnel. En revanche, dans le cas de tumeurs superficielles, il est nécessaire de compenser cette épaisseur de mise à l'équilibre électronique à l'aide de *bolus* (épaisseur de matériau équivalent-tissu).

En comparaison, quand les particules chargées entrent dans un milieu absorbant, elles sont ralenties en perdant leur énergie cinétique principalement par phénomène d'ionisation. C'est ce que montrent les courbes en rouge (ions carbone de 270 MeV/A) et en vert (protons de 148 MeV) de la

Figure 3, présentant la distribution de dose relative en fonction de la profondeur de pénétration dans l'eau (en comparaison aux photons X produits par des électrons accélérés (LINAC)). Quand le faisceau de particules monoénergétiques entre dans le corps du patient, la distribution de dose en profondeur est caractérisée par une dose modérée dans la région d'entrée (plateau) puis par une élévation et une chute de la dose à la fin du parcours (pic de Bragg). La profondeur du parcours peut être ajustée par modulation de l'énergie cinétique des ions, ce qui rend possible le déplacement du pic de Bragg dans la tumeur. En revanche, on voit que les protons et les ions carbone ont un dépôt de dose différent. On voit nettement que pour une même dose à l'entrée, la dose maximale des ions carbone est 1,5 fois plus élevée que celle des protons au pic de Bragg. Ce qui montre bien le gain thérapeutique à l'utilisation des ions carbone. Par contre, les ions lourds présentent une queue de distribution après le pic de Bragg, causée par les fragments secondaires produits par réactions nucléaires (à des énergies de l'ordre de la centaine de MeV/A) (Schardt et al. 2010).

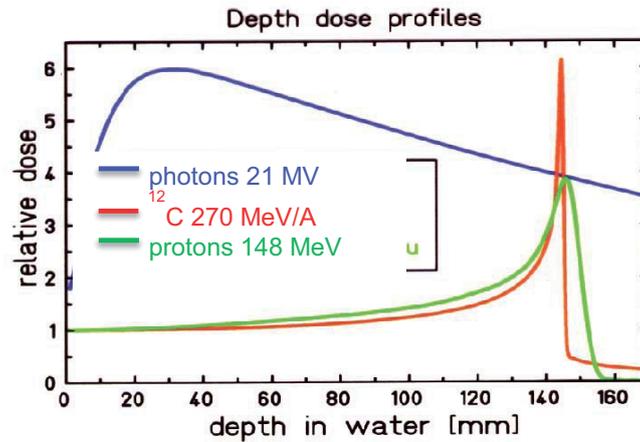


Figure 3 - Profils de dépôt de dose des photons produits par des électrons de 21 MeV issus d'un accélérateur linéaire et stoppés dans une cible de conversion (principe de rayonnement Bremsstrahlung), des ions carbone de 270 MeV/A et des protons de 148 MeV.

- *La dose*

La dose absorbée dans les tissus est la quantité physique de référence en radiothérapie. Elle est définie comme l'énergie moyenne  $dE$  déposée par un rayonnement ionisant dans un élément de masse  $dm$  (ICRU 1993).

$$D = dE/dm \quad [1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}],$$

Dans le domaine de la radiothérapie, on utilise en général de l'eau comme équivalent tissu pour effectuer la dosimétrie. Les mesures de la dose sont généralement effectuées à l'aide d'une chambre d'ionisation (cf. Chapitre 2, section 1.2.4a)) et doivent être converties en « dose absorbée dans l'eau » par des facteurs de correction. Pour un faisceau de fluence  $F$  (définie comme le nombre de particules par  $\text{cm}^2$ ), nous pouvons approcher la dose déposée dans une couche mince d'un milieu absorbant de densité  $\rho$ , de la manière suivante :

$$D[\text{Gy}] = 1,6 \cdot 10^{-9} \times TEL \left[ \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right] \times F [\text{cm}^{-2}] \times 1/\rho \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{g}} \right]$$

où,  $TEL$  est le transfert d'énergie linéique correspondant à l'énergie perdue par les particules par unité de longueur parcourue (cf. 1a)(ii)).

- *La fluence*

La fluence est une quantité beaucoup plus simple à obtenir que la dose. En effet, il suffit de placer un détecteur permettant le comptage absolu des particules (un détecteur silicium par exemple) et connaissant sa surface irradiée nous pouvons connaître le nombre de particules/ $\text{cm}^2$  délivrées par le faisceau incident. Cette quantité

est donc reliée à la dose ainsi qu'au flux de particules du faisceau (particules/cm<sup>2</sup>/s), comme nous l'avons vu ci-dessus

- *Pouvoir d'arrêt*

Le traitement de tumeurs situées à 30 cm, par exemple, nécessite l'utilisation de faisceau de protons de 220 MeV/A, d'ions carbone de 430 MeV/A ou d'ions Néon de 600 MeV pour que le pic de Bragg soit situé à cette profondeur. Les particules ont alors une vitesse  $\beta = v/c$  respectivement égale à 0,59, 0,73 et 0,79. À cette vitesse, le ralentissement d'un ion dans la matière peut être traité comme une succession de collisions inélastiques avec les électrons de la cible. Ce processus, qui est dominant à de telles énergies (appelé pouvoir d'arrêt électronique), a été décrit par la formule de Bethe-Bloch (Bethe 1937), de la manière suivante :

$$\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 Z_c Z_p^2}{m_e v^2} \left[ \ln \frac{2m_e v^2}{\langle I \rangle} - \ln(1 - \beta^2) - \beta^2 - \frac{C}{Z_c} - \frac{\delta}{2} \right],$$

où,  $\frac{C}{Z_c}$  est le terme correctif dû aux effets d'écrantage de charges et  $\frac{\delta}{2}$ , le terme correctif de densité de charge.  $Z_p$  et  $Z_c$  représentent la charge nucléaire du projectile et de la cible,  $m_e$  et  $e$  sont la masse et la charge de l'électron, et  $\langle I \rangle$  est l'énergie moyenne d'ionisation de l'atome ou de la molécule cible.

En d'autres termes la relation de Bethe et Bloch quantifie le pouvoir d'arrêt des ions par un milieu, et traduit la quantité d'énergie par unité de longueur cédée par un ion. Dans cette formulation, le pouvoir d'arrêt est proportionnel au carré de la charge du projectile et à l'inverse du carré de la vitesse.

Jusqu'à présent nous avons uniquement considéré des interactions avec les électrons. Or, on peut également envisager des interactions avec les noyaux par interaction coulombienne. Cependant à ces énergies, la perte d'énergie par interaction coulombienne avec les noyaux est négligeable.

- *Evolution du pouvoir d'arrêt en fonction de l'énergie cinétique du projectile*

Supposons un projectile possédant une grande énergie cinétique initiale (i.e. bien supérieure à 0,1 MeV ici). Chaque interaction conduit à un transfert d'énergie et l'ion perd de la vitesse. Comme le montre la

Figure 4, la manière dont le projectile « perçoit » le milieu d'interaction dépend fortement de son énergie cinétique. Le pouvoir d'arrêt augmente à mesure que sa vitesse diminue ( $dE/dx \propto 1/v^2$ ). Notons qu'en fin de parcours, la vitesse de l'ion devient comparable à celle des électrons et le projectile se « rhabille ». À basse vitesse, son pouvoir d'arrêt diminue alors ( $dE/dx \propto Z^2 e^4$ ).

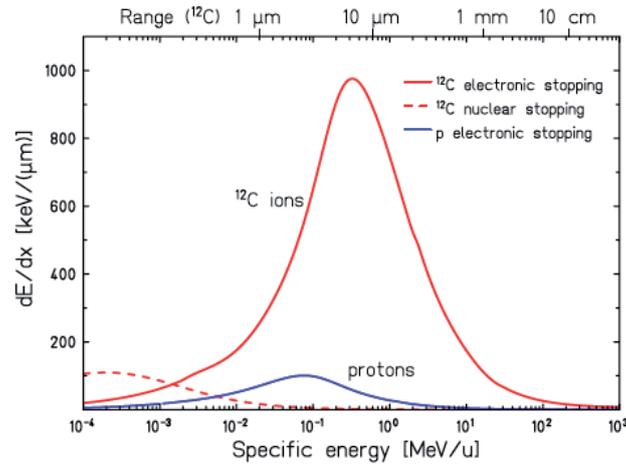


Figure 4 - Pouvoirs d'arrêt électronique (traits pleins) et nucléaire (pointillés) des protons (bleu) et des ions  $^{12}\text{C}$  (rouge) fonction de leur énergie cinétique dans l'eau. [Scharadt et al., 2010]

C'est ce qui explique le maximum (vers 0,5 MeV/A pour les ions carbone) visible sur la

Figure 4.

- *Evolution du pouvoir d'arrêt en fonction du parcours du projectile*

Parallèlement à la notion de pouvoir d'arrêt on peut introduire la notion de parcours. Le parcours total des ions dans un milieu absorbeur est donné par :

$$R(E) = \int_0^E \left( \frac{dE'}{dx} \right)^{-1} dE'$$

Le parcours de l'ion est la distance qui lui est nécessaire pour perdre toute son énergie dans le milieu. Comme  $dE/dx \propto Z^2$ , plus la charge de l'ion est grande, plus le pouvoir d'arrêt est important et donc plus le parcours de l'ion en est diminué.

C'est ce qu'illustre la

Figure 5 présentant le parcours dans l'eau de différentes particules chargées en fonction de leur énergie cinétique. Pour une même énergie, comme par exemple 250 MeV/A, les protons parcourent 37,5 cm (environ) contre 12,5 cm pour les ions carbone (chargés 6+).

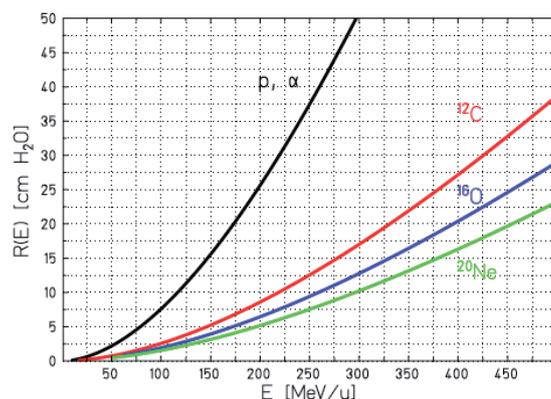


Figure 5 - Parcours moyen des protons, alpha, <sup>12</sup>C, <sup>16</sup>O et <sup>20</sup>Ne dans l'eau. [Schardt et al., 2010]

(ii) *Transfert d'énergie linéique*

La différence principale entre les photons et les ions concerne la distribution spatiale du dépôt d'énergie à l'échelle microscopique. Dans le cas des photons, l'énergie est transférée au milieu par effet photo-électrique ou par effet Compton selon leur énergie de pénétration (Alpen 1997). Comme la section efficace de ces processus est plutôt faible et que l'énergie des électrons éjectés est grande, le nombre d'événements d'ionisation par photon incident dans un volume est également faible. À cause de ce faible nombre d'événements, une quantité importante de photons est nécessaire pour déposer une dose appropriée. Enfin, comme les photons ont une distribution aléatoire, la densité d'ionisation est relativement homogène dans le volume du matériau traversé.

La notion de Transfert d'Énergie Linéique (TEL) a été introduite afin de rendre compte de la distribution spatiale des ionisations. Le TEL est défini comme étant égal à la quantité d'énergie cédée par un rayonnement par unité de longueur.

La différence entre le TEL et le pouvoir d'arrêt réside dans « l'interprétation » des phénomènes d'ionisation. Le pouvoir d'arrêt caractérise l'énergie perdue par les ions, et le TEL est davantage lié à la dose déposée. Plus précisément, le TEL permet de caractériser la quantité d'énergie transférée par l'ion incident aux milieux, par ionisation, excitation etc., en incluant les cascades d'électrons secondaires. Le TEL est égal au pouvoir d'arrêt si on omet l'énergie déposée par les particules secondaires (photons, électrons, fragments).

Le TEL est généralement exprimé en keV/μm, ou en keV/mg/cm<sup>2</sup> lorsqu'on veut avoir une expression quasi-indépendante de la densité du matériau. À titre d'exemple, le TEL des protons utilisés en clinique est de l'ordre de 5 à 15 keV/μm (Carabe et al. 2012) tandis que celui des ions carbone s'étend de 10 à 400 keV/μm (Furusawa et al. 2009). Contrairement au pouvoir d'arrêt, le TEL, défini de cette manière, n'est pas directement mesurable, on peut seulement y accéder par le calcul.

La densité linéique d'ionisation (DLI) exprime le nombre de paires électrons/ions par unité de longueur créée par une particule incidente. L'expression approchée de la DLI est la suivante :

$$DLI = \frac{dl}{dx} = \frac{TEL}{W},$$

où  $W$  est l'énergie moyenne nécessaire pour créer une paire électron/ion.

Ainsi, une particule de bas TEL sera à l'origine d'une faible densité locale d'ionisation tandis qu'une particule de haut TEL sera à l'origine d'une forte densité locale d'ionisation.

Sur la Figure 6 sont représentées les simulations de deux traces de particules chargées dans l'eau (exemples extrêmes) : à gauche, celle d'un ion carbone de 2 MeV/A et à droite celle d'un proton de 65 MeV/A (Coliaux 2009). Ces situations sont un peu extrêmes, car elles correspondent, pour l'une, pratiquement au TEL maximum en carbone-thérapie, et pour l'autre, à un TEL sur le plateau en proton-thérapie. Chaque point représente une ionisation ou une excitation. Si on fait un zoom sur le premier micromètre de la trace, on voit que la densité d'ionisation des ions carbone est très supérieure à celle des protons. Les protons ont un libre parcours moyen pour induire une ionisation qui est de l'ordre de la centaine de nanomètres. Par exemple il n'y a pas d'ionisation dans les premiers 0,5  $\mu\text{m}$  pour cet exemple « typique ».

Par contre une ionisation primaire est souvent accompagnée de grappes d'ionisations secondaires localisées à son voisinage. Or un double brin d'ADN mesure 10 à 20 nm de large. La différence de TEL entre ces deux projectiles fera que, si un brin d'ADN est traversé par un ion carbone, la probabilité d'endommagement est beaucoup plus grande que pour les protons.

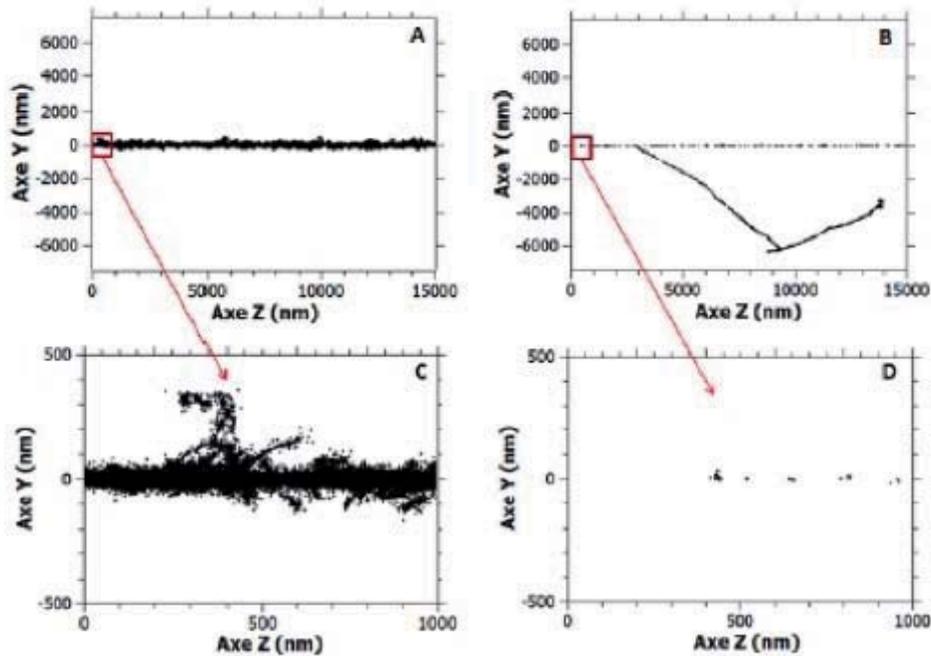


Figure 6 – Traces d'un ion carbone de 2 MeV/A (TEL  $\sim 492$  keV/ $\mu$ m) (A et grossissement en C) et d'un proton de 65 MeV (TEL  $\sim 0,95$  keV/ $\mu$ m) (B et grossissement en D) dans l'eau. Les points représentent les lieux d'ionisation [Coliaux, 2009].

b) Elargissement latéral et longitudinal du faisceau

(i) *Les causes principales de l'élargissement latéral et longitudinal d'un faisceau d'ions*

Les fluctuations statistiques de la perte d'énergie (pouvoir d'arrêt), dans le processus de ralentissement des ions à cause de multiples collisions dans la matière, résultent en une dispersion du parcours autour de sa valeur moyenne. Il y a un élargissement latéral du faisceau de particules chargées, dû aux collisions électroniques, et un élargissement longitudinal dû aux fluctuations en énergie du faisceau d'ions.

Plus particulièrement, la dispersion longitudinale est associée aux fluctuations sur le pouvoir d'arrêt des ions, donc aux fluctuations sur les transferts aux électrons. La

Figure 7 est un agrandissement du parcours des ions carbone (250 MeV/A) et des protons (131,46 MeV) dans la région du pic de Bragg. On peut voir que l'élargissement du faisceau d'ions carbone est plus faible d'un facteur 3,5 par rapport à celui des protons.

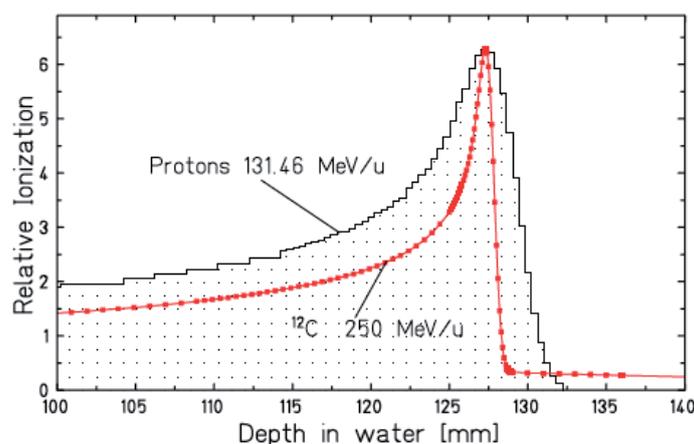


Figure 7 - Pic de Bragg mesuré pour des protons et des  $^{12}\text{C}$  ayant le même parcours dans l'eau ( $\approx 12,5$  cm) [Schardt et al., 2010]

Ceci s'explique par le rapport entre l'élargissement du pic de Bragg ( $\sigma_R$ ) et le parcours de l'ion ( $R$ ), représenté par :

$$\frac{\sigma_R}{R} \propto \frac{1}{\sqrt{M}}$$

où  $M$  est la masse de l'ion. Plus l'ion est léger, plus l'élargissement est important à cause de la dépendance en  $\frac{1}{\sqrt{M}}$ .

La diffusion multiple associée aux collisions élastiques sur les noyaux cibles, i.e. à petit paramètre d'impact, est responsable de l'élargissement latéral des faisceaux d'ions. Ces diffusions multiples sont des processus d'interaction stochastiques. En outre, plus l'ion est chargé et/ou massif et moins cette dispersion est importante, comme le montre la

Figure 8. En pratique, le phénomène de dispersion latérale dépend également de la distance parcourue entre le point d'entrée et le pic de Bragg. La

Figure 8 montre que les ions  $^{12}\text{C}$  ont une déflexion latérale bien moins importante par rapport aux protons en fonction de l'épaisseur de PMMA (tissus-équivalent) traversée (Lestand 2012).

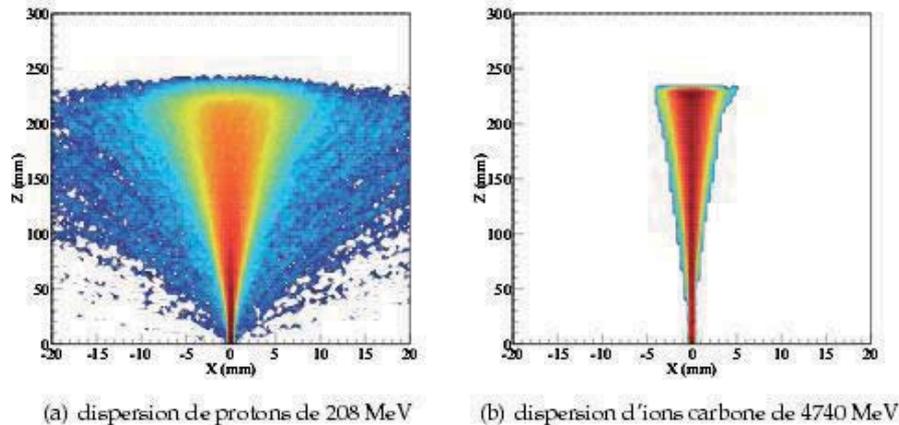


Figure 8 - Dispersion des ions en fonction de la profondeur dans du PMMA, simulé avec GEANT4: (a) protons de 208 MeV (b) ions carbone de 4740 MeV (même échelle de couleur) [Lestand, 2012]

Pour conclure, la faible déflexion latérale des faisceaux d'ions lourds dans les tissus présente un intérêt clinique pour le traitement des organes à risque (OAR) par rapport aux faisceaux de protons.

### (ii) Réactions nucléaires

Les énergies utilisées en hadronthérapie sont telles que les noyaux (projectiles et/ou cibles) se fragmentent. Les réactions nucléaires sont à l'origine d'une distribution de particules secondaires. On distingue parmi les particules secondaires, des protons, des neutrons, des  $\gamma$ , des particules de numéro atomique  $Z > 1$  et des radionucléides émetteurs de positon. Dans le cas des ions carbone, la vitesse de déplacement des fragments secondaires est comparable à celle des particules primaires, en revanche, leur distance parcourue sera plus grande. Il en résulte que le parcours plus long de ces fragments, moins chargés, est à l'origine d'une queue de dépôt de dose au-delà du pic de Bragg (cf. la courbe rouge de la

Figure 3).

Les réactions nucléaires ont également une contribution sur l'élargissement latéral et longitudinal des faisceaux d'ions. En effet, les réactions nucléaires

- causent une perte des particules primaires du faisceau (atténuation), et ce phénomène devient de plus en plus important avec la profondeur de pénétration. Typiquement, pour un parcours de 16 cm dans l'eau, 10 à 15% d'un faisceau primaire de protons (énergie incidente égale à 160 MeV) est perdu, et 52 % d'un faisceau de carbone (Schardt et al. 2010) ;
- dispersent la dose déposée latéralement et longitudinalement à cause des fragments et des particules secondaires qui ont des trajectoires et parcours différents (Golovkov et al. 1997). Les plans de traitement (TPS) tiennent compte de cet effet de façon plus ou moins empirique. De nombreuses mesures

radiobiologiques et dosimétriques (mesure in-vitro, etc.) doivent être effectuées afin de compléter les données (en entrée) des TPS.

### 1.1.2 Efficacité Biologique Relative : avantages biologiques des ions

En plus d'une très bonne balistique, comme nous l'avons montré dans la section précédente, les particules chargées présentent une efficacité biologique plus élevée que les photons X pour le traitement des tumeurs. Ceci est la conséquence de la distribution spatiale des ionisations qui est concentrée dans le cœur de la trace pour les particules chargées telles que les ions carbone, contrairement aux photons (cf. 1a)(ii)). En effet, le TEL (relatif au pouvoir d'arrêt), qui dépend quadratiquement de la charge du projectile ( $Z_p^2$ ), a une valeur élevée pour des ions lourds. Un dépôt d'énergie important au cœur de la trace des ions induit de sévères dommages à l'ADN et ce, par rapport aux irradiations avec des particules de TEL plus faible.

Connaissant les différentes distributions en énergie pour les photons et les ions et en supposant que l'ADN est la molécule cible la plus sensible, nous pouvons comprendre, de manière qualitative, que les ions produisent des dommages plus sévères que les photons surtout dans le cœur de trace. Comme la capacité des cellules à réparer des dommages à l'ADN est réduite pour des dommages complexes, la probabilité de créer des dommages létaux, à dose égale, est plus importante pour des ions que pour des photons.

Dans cette section nous allons discuter des avantages biologiques des ions et définirons le concept d'efficacité biologique relative, qui estime l'efficacité des ions par rapport aux rayons X ou aux photons gamma émis par une source de cobalt 60, ainsi que les différents paramètres dont il dépend.

Enfin, nous aborderons le problème de l'effet oxygène dans la thérapie par ions lourds.

#### a) Définition de l'EBR

L'efficacité biologique relative est un concept plus riche mais aussi plus complexe que les facteurs de pondération utilisés en radioprotection. En plus d'intégrer la qualité du rayonnement, il prend également en compte la dose, le type d'observable biologique et la réponse spécifique des tissus. L'EBR est le rapport entre une dose de référence (typiquement les photons X) et la dose du rayonnement en question (par exemple les ions) pour produire le même effet biologique (*iso-effet*),

$$EBR_{iso} = \frac{D_{ref}}{D_{ion}}$$

La

Figure 9 montre comment on détermine l'EBR à partir d'une courbe de survie en photons et ions lourds. Elle représente la probabilité de survie d'une lignée cellulaire en fonction de la dose déposée par une particule. Les valeurs de l'EBR sont indiquées pour deux effets : une survie des cellules à 10% et à 1%. Dans cet exemple, on voit qu'il faut une dose plus importante en photons qu'en ions pour atteindre le même taux de survie (10% ou 1%).

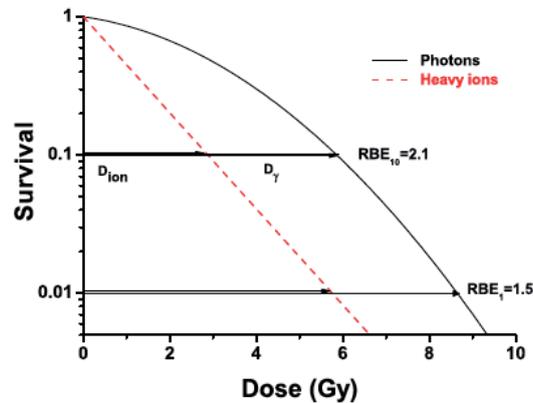


Figure 9 - Détermination de l'EBR pour une survie cellulaire à 10% et à 1% pour une irradiation par ions lourds [Schardt, et al. 2010]

b) Facteurs influençant l'EBR

Comme nous venons de le voir, l'EBR dépend de la dose (cf.

Figure 9). En général, l'EBR est élevée pour une faible dose et est faible pour une dose plus élevée, ce qui est dû à l'épaule présente dans les courbes de survie aux photons. Les effets à faible dose rendent plus subtile cette tendance.

La réponse du système cellulaire dépend de l'énergie ou du TEL de la particule incidente comme le montre la

Figure 10 (Belli et al. 1998; Furusawa et al. 2009). Comme la densité d'ionisation est plus élevée dans le cœur de la trace des particules de haut TEL, les dommages sont alors plus sévères ce qui conduit à un EBR plus élevé. Cependant pour une certaine valeur du TEL, le dépôt de dose est tellement important qu'une seule particule suffit à diminuer la probabilité de survie cellulaire. Dans ce cas, un dépôt de dose additionnel n'aura pas comme conséquence de diminuer davantage cette probabilité de survie. En effet, comme le montre la

Figure 10, il y a une valeur de TEL « limite » au-delà de laquelle l'EBR diminue puisque le nombre d'ions nécessaires pour déposer la même dose est plus faible pour les particules ayant un TEL élevé.

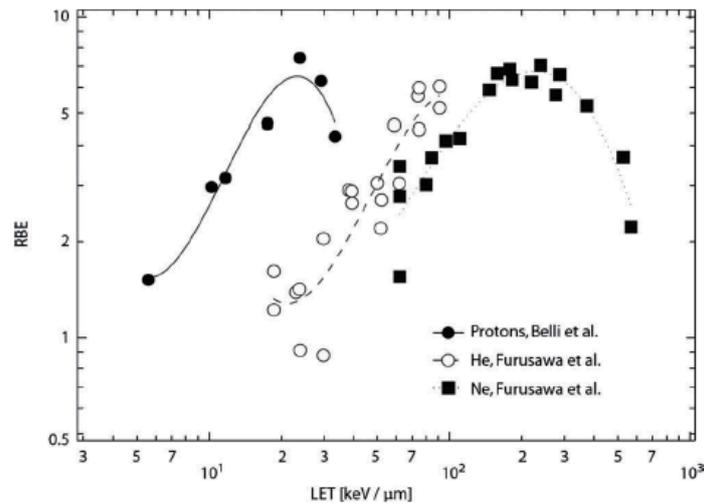


Figure 10 -  $RBE_{\alpha} = \alpha_{ion} / \alpha$  en fonction du LET et du type de particules, où  $\alpha$  et  $\alpha_{ion}$  sont les tangentes à l'origine des courbes de survies pour les photons et les ions. Les données sont issues des publications de Belli et Furusawa [Scholtz, 2003]

La

Figure 10 montre également que le type de particule influence la position du maximum de l'EBR. À titre d'exemple, pour un TEL correspondant au maximum de l'EBR pour les protons, les ions carbone vont avoir une EBR inférieure aux protons (moins de dommages). Ceci vient du fait que la trace produite par les ions carbone est moins concentrée dans le cœur à cette valeur de TEL.

Enfin, la radiosensibilité de la lignée cellulaire irradiée détermine aussi l'EBR (K. Weyrather 1999). La

Figure 11 présente une comparaison de trois lignées cellulaires de radiosensibilités différentes. On voit sur la figure de gauche que l'EBR des ions carbone est plus élevée pour la lignée V79 qui est la plus résistante aux rayonnements X (figure de droite). Les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) qui sont plus sensibles aux rayons X que les cellules V79, montrent une EBR « modérée » pour les ions carbone. Enfin, la lignée XRS (CHO-mutant), qui est très radiosensible en rayons X, a une EBR carbone quasi-négligeable.

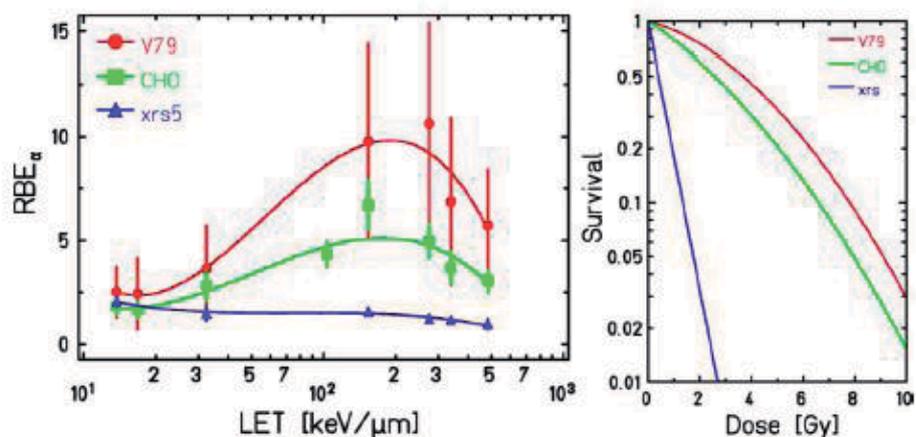


Figure 11 - EBR pour les ions carbone en fonction de la sensibilité aux rayonnements de trois lignées cellulaires. À gauche : dépendance de l'EBR<sub>α</sub> sur les lignées CHO, V79, et XRS après irradiation par ions carbone. À droite : Courbes de survie cellulaire de ces 3 mêmes lignées après irradiation par photons X [Weyrather et al., 1999]

Donc pour certaines lignées cellulaires, une irradiation par ions carbone ne sera pas plus efficace biologiquement qu'une irradiation par photons X.

### c) Effet oxygène

Le traitement des tumeurs hypoxiques est un challenge particulier. Lorsque les tumeurs grossissent, de nouveaux vaisseaux sanguins sont nécessaires pour permettre l'irrigation en oxygène des cellules situées au cœur de la tumeur. Parfois ces vaisseaux ne se génèrent pas assez vite ou ne sont pas en quantité suffisante. Notamment au centre de grosses tumeurs, où l'apparition de régions hypoxiques est fréquente. On constate que ces conditions conduisent à une augmentation de la radiorésistance. Cependant, actuellement il n'y a pas d'explication au sujet des mécanismes à l'origine de ces effets. Par définition, l'effet oxygène est le rapport entre la dose présentant un taux d'oxygène réduit (hypoxie) et la dose pour une oxygénation normale (aérobie), pour obtenir un même effet. L'effet oxygène est noté OER (Oxygen Enhancement Ratio) :

$$OER = \frac{D_{\text{hypoxique}}}{D_{\text{aérobie}}}$$

La

Figure 12 présente des courbes de survies cellulaires réalisées à Berkeley dans les années 70, dans le but de préparer le premier traitement par ions lourds (Blakely et al. 1979). Sur le graphe ci-dessous, on voit que l'écart entre les courbes de survie de cellules hypoxiques et de cellules aérobiques est diminué pour des ions de haut TEL

(courbes rouges). En outre, l'OER diminue quand l'énergie de la particule diminue. L'OER se rapproche de 1 à TEL élevé. Ce comportement correspond aux observations expérimentales. Les différences sur une lignée cellulaire spécifique diminuent après irradiation par ions lourds. En effet, il a été démontré que l'effet oxygène est plus faible pour les ions lourds comme les ions carbone ou néon que pour les ions légers tels que les protons ou hélium (Barendsen et al. 1966; Bewley 1968; Furusawa et al. 2009).

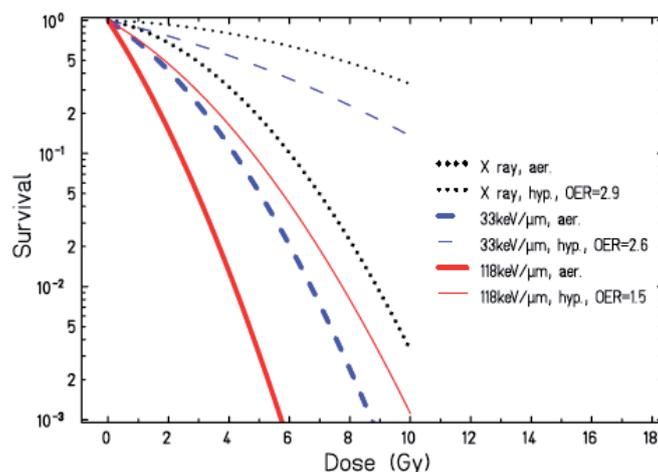


Figure 12 - Influence du niveau d'oxygène sur la survie cellulaire de cellules humaines de rein (T1) irradiées avec des ions carbone de LET différents [Blakely et al., 1979]

Dans cette partie, nous avons montré les différences fondamentales concernant les interactions sur la matière entre les rayonnements électromagnétiques et les faisceaux de particules chargées. Ces différences expliquent notamment la décroissance de la dose déposée par un faisceau de photons, et au contraire la présence d'un très fort dépôt d'énergie en fin de parcours que l'on observe pour les ions. Nous avons présenté le concept de transfert d'énergie linéique et nous avons montré qu'à lui seul il ne suffit pas à rendre compte de la topologie du dépôt d'énergie. Après avoir traité les avantages physiques des ions nous avons discuté de leurs avantages biologiques. Enfin, toutes ces informations montrent qu'il est plus avantageux d'un point de vue physique et biologique d'irradier des tumeurs avec des ions carbone qu'avec des particules chargées légères pour certains types de tumeurs. Voyons maintenant pourquoi il est intéressant de développer des plateformes d'irradiation pour les études en radiobiologie.

## 1.2 Contexte scientifique du projet et état de l'art

La protonthérapie est une technique avancée de radiothérapie permettant de délivrer une dose élevée à la tumeur tout en épargnant les tissus sains, comme nous l'avons vu dans la section précédente.

Les protons utilisés en clinique ont des énergies incidentes supérieures à 50 MeV. Les différentes mesures radiobiologiques, ainsi que les études microdosimétriques, montrent un léger accroissement de l'efficacité biologique relative vers la fin du pic de Bragg et notamment dans la chute distale, dû à l'augmentation du TEL vers la fin du parcours. L'EBR mesurée dans ces expériences varie entre 0,9–1 à l'entrée jusque vers 1,4–1,5 vers la chute distale du pic. Cependant, comme le dépôt de dose est la somme des dépôts à des énergies différentes (éventuellement dans le pic de Bragg mais aussi en dehors), une valeur unique d'EBR égale à 1,1 est utilisée en pratique dans tous les centres cliniques (ICRU, 1998). Ainsi radiobiologiquement, le proton est considéré comme très proche du photon ou de l'électron.

Les neutrons rapides utilisés en radiothérapie produisent des protons secondaires au MeV. Plus précisément, l'énergie des neutrons secondaires dépend fortement de l'énergie incidente. En général on obtient un pic élastique à l'énergie des neutrons incidents, avec un spectre relativement uniforme de plus basse intensité, descendants jusqu'aux neutrons thermiques.

Les neutrons se différencient des photons gamma ou X par leur possibilité de vaincre la radiorésistance tumorale grâce à une différence d'EBR entre les tissus sains et les tissus tumoraux, permettant d'augmenter la dose dans la tumeur (Noël et al. 2003). Les neutrons ont bénéficié d'un intérêt important dans les années 1975-1985, et de nombreux essais randomisés de phase III ont permis d'en poser les limites et les indications, que l'on peut considérer maintenant comme définitives. En 1996, il y avait 10 centres de neutronthérapie en fonctionnement dans le monde (énergie variant de 30 à 60 MeV). En France, le centre de neutronthérapie d'Orléans utilise, depuis le début des années 1980, des neutrons produits à partir d'un cyclotron. Comme les autres types de radiations à haut TEL, la neutronthérapie a été utilisée pour traiter les tumeurs des glandes salivaires, des sinus, de la tête et du cou, de la prostate, des os, du sein, les sarcomes des tissus mous, les sarcomes utérins et les mélanomes. Cependant l'action thérapeutique de la neutronthérapie n'a été bien observée que pour certaines tumeurs malignes. Elle dépend du siège de la tumeur, de son type histologique, de son caractère récurrent ou non après chirurgie ou radiothérapie, ainsi que de caractéristiques plus spécifiques, comme le degré de malignité et la probabilité de récurrence (Noël et al. 2003).

Les études en radiobiologie permettent également d'améliorer les connaissances des effets secondaires des rayonnements pour le domaine spatial (protons de haute énergie par exemple) et l'industrie nucléaire (radioprotection). Enfin, sur le plan fondamental en radiobiologie, utiliser des ions plutôt que des X est une autre manière de stimuler la cellule. C'est donc à partir d'un intérêt grandissant pour la connaissance des effets des rayonnements (faible dose, différentes énergies, différentes particules, etc.) dans les différents domaines cités précédemment, que nous avons décidé de développer une plateforme d'irradiation (Radiograaff) en champ large (à la différence des microfaisceaux), pour les études en radiobiologie.

Dans cette section, nous allons discuter des études des effets des rayonnements dont l'efficacité biologique relative est supérieure à 1, et des différentes modalités d'irradiation en radiobiologie. Bien que la neutronthérapie présente une EBR supérieure à 1, nous ne développerons pas cette technique de radiothérapie dans ce chapitre. Pour finir, nous présenterons la plateforme Radiograaff.

### 1.2.1 Etudes des rayonnements présentant une EBR supérieure aux photons

#### a) Radioprotection

Les effets nocifs de la radioactivité sur la santé et plus généralement de toute irradiation, même à faible dose, constituent la principale crainte suscitée par l'industrie nucléaire. Un effort de quantification de ces risques a été effectué au cours de ces dernières décennies, mais ces travaux mal interprétés ont eu parfois des effets contraires, d'amplifier les craintes. Il est donc nécessaire d'examiner les fondements médicaux et scientifiques de ces évaluations.

La réglementation en radioprotection est connue dans le cadre des industries du nucléaire (centrale nucléaire, etc.) mais est également en vigueur dans les établissements détenant une source de rayonnements ionisants. Par exemple, sont concernés : le personnel médical et non médical travaillant sous rayonnement ionisant, les cabinets dentaires, de radiologie, d'imagerie médicale, les vétérinaires, les cliniques et hôpitaux, les industries et toute société détenant ou manipulant des sources de rayonnement ionisant.

De ce fait, des grandeurs de radioprotection ont été introduites pour la surveillance environnementale et individuelle. La dose efficace n'est pas une grandeur physique mais une grandeur de radioprotection estimant l'impact sur les tissus biologiques d'une exposition à un rayonnement ionisant. Elle est définie comme la dose absorbée (énergie reçue par unité de masse) corrigée de facteurs de pondération des rayonnements (indice  $R$ ) et de facteurs de sensibilité des tissus (indice  $T$ ) :

$$D_E = \sum_T \sum_R \omega_R \omega_T D_{R,T},$$

avec,  $D_E$  la dose efficace en Sievert (Sv),  $\omega_T$  le facteur de pondération des tissus,  $\omega_R$  le facteur de pondération des rayonnements et  $D_{R,T}$  la dose absorbée.

Cette dose doit être interprétée comme une dose corps entier puisque la somme des facteurs  $\omega_T$  sur tout le corps est de 1. À titre d'exemple, le

Tableau 1 regroupe les recommandations de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) de 2007 pour le choix des valeurs du facteur de pondération des tissus.

Tissu	$\omega_T$
Gonades	0,08
Moelle osseuse	0,12
Côlon	0,12
Poumon	0,12
Estomac	0,12
Vessie	0,04

Sein	0,12
Foie	0,04
Œsophage	0,04
Thyroïde	0,04
Peau	0,01
Surface des os	0,01
Glandes salivaires	0,01
Cerveau	0,01

**Tableau 1 - Tableau des différents facteurs de pondération des tissus [CIRP, 2007]**

Le

Tableau 2 le regroupe les recommandations de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR), issus du rapport 92 de 2003, pour le choix des valeurs du facteur de pondération des  $\omega_R$  tissus.

Type de rayonnement	$\omega_R$
Rayons X et $\gamma$	1
Particules $\beta$ / électrons	1
Particules $\alpha$	20
Neutrons < 10 keV	2
Neutrons $\approx$ 1 MeV	$\approx$ 20
Neutrons 200 MeV	5
Protons et pions chargés	2

**Tableau 2 - Valeurs recommandées pour les facteurs de pondération pour les rayonnements [CIPR 103, 2007]**

En conclusion, des études en radiobiologie permettent de mieux cerner les dommages engendrés par les rayonnements ionisants sur les tissus, permettant de déterminer plus précisément les valeurs des facteurs de pondération dans les tissus conduisant donc à affiner les normes en radioprotection.

b) Aérospatiale

Les rayonnements cosmiques sont principalement composés de particules légères comme des électrons, des protons, des particules alpha, etc. En effet, les protons composent 85% des rayonnements cosmiques et 92% des rayonnements solaires et leur

énergie varie de  $10^{-3}$  à  $10^{11}$  MeV (Curtis 1974; Maalouf et al. 2011). Dans les années 1960 des dosimètres embarqués dans des satellites ont permis d'évaluer les doses et débits de doses présents dans l'espace, afin de mieux comprendre les risques qu'encourent les astronautes durant leurs missions spatiales. Cette période correspond également aux premières études menées sur la survie clonogénique aux rayonnements ionisants. Les premières observations ont montré que les ions induisent des dommages chromosomiques non-réparables qui conduisent à la formation de micronoyaux ou à l'apoptose (cf. chapitre 3, section 3.3.1g).

La recherche en rayonnement spatial a continué ce type de recherche en radiobiologie en développant des expériences sur les missions Biosatellite et Gemini. Cependant, ce genre d'expérience demande un nombre important d'espèces (animales ou végétales) différentes. En outre, la plupart des études ont pour but d'étudier la microgravitation plutôt que les effets des rayonnements. En 1973, la mission Skylab a été développée pour des études en dosimétrie et l'acquisition de données cytogénétiques en général.

Si on compare les rayonnements cosmiques à l'exposition médicale, on obtient 400  $\mu\text{Gy}/\text{jour}$  de mission spatiale ce qui est 5000 fois plus petit qu'une fraction en radiothérapie (en considérant une dose de 2 Gy/séance sur une durée équivalente. 1 séance = 1 jour) et 10 à 20 fois plus faible qu'une mammographie (2 x 2 mGy) ou qu'un scanner abdominal (8 mGy) par exemple (Maalouf et al. 2011). Notons cependant que l'irradiation par les rayonnements cosmiques est une irradiation corps entier et que l'environnement des cosmonautes (capsules) peut modifier le spectre en énergie et en éléments du flux irradiant.

L'exposition aux radiations cosmiques soulève donc un certain nombre de problématiques : y a-t'il un risque mutagène ou de cancer radio-induit à cause des faibles doses ? Voire un effet radiobiologique relié à des doses répétées ? Quelle est l'influence à la réponse adaptative sur le résultat final ?

En conclusion, la recherche sur les effets des rayonnements cosmiques est difficile à réaliser sur les missions spatiales. C'est pourquoi il est utile de développer des outils permettant de se rapprocher le plus possible de ces conditions d'irradiations, avec, par exemple, des sources de spallation avec un spectre large en énergie. En outre, ceci permet également d'étendre le champ de recherche vers les applications médicales directement liées, comme : les mammographies, les scanners à répétition (diagnostique), la radiothérapie fractionnée, la prévention des complications en radiothérapie, la protonthérapie et l'hadronthérapie.

### 1.2.2 Différentes modalités d'irradiation en radiobiologie

L'utilisation d'un faisceau d'ions lourds comme les ions carbone pour le traitement des cancers nécessite que certaines problématiques physiques et biologiques soient mieux appréhendées. Cela implique une meilleure compréhension des effets radiobiologiques du pic de Bragg étalé, utilisé pour irradier la totalité du volume d'une tumeur. En effet, cet élargissement produit une variation du transfert d'énergie linéique (TEL), qui induit une variation de l'EBR. C'est pourquoi ce phénomène doit être pris en compte lors de la modulation du pic de Bragg étalé pour des faisceaux de TEL élevé. Ceci

est d'autant plus difficile que les irradiations par le protocole de pic de Bragg étalé, requièrent une distribution de dose biologique uniforme dans tout le volume cible couvert par le faisceau. Dans ce contexte, il est nécessaire d'avoir des données EBR pour différents aspects biologiques ou physiques. Deux protocoles d'irradiation *in vitro* sont utilisés pour étudier l'efficacité d'un rayonnement : le protocole « segment de trace » qui consiste à irradier les cellules dans la zone du plateau de la courbe de Bragg et le protocole « pic de Bragg » (ou pic de Bragg étalé dans le cas d'irradiations *in-vivo*) qui consiste à irradier des cellules dans la zone de la courbe de Bragg où l'EBR est maximale.

a) Expériences segment de trace

(i) *Faisceau monoénergétique*

De nombreuses expériences d'irradiations cellulaires consistent à délivrer des particules à TEL et énergie fixés. C'est la méthodologie appliquée dans la plupart des études des effets des particules chargées sur l'inactivation de cellules (Bird et al. 1980; Blakely et al. 1979). En effet, pour travailler dans ce type de conditions, il faut maîtriser l'énergie des ions et donc tenir compte : de l'épaisseur de la fenêtre d'extraction des ions à l'air (perte d'énergie), de l'épaisseur d'air entre la fenêtre et les échantillons ainsi que de l'épaisseur des boîtes de Petri traversées. Connaissant l'énergie des ions à l'entrée des cellules (ainsi que l'épaisseur des cellules) il est possible d'en déduire le TEL et donc d'ajuster les paramètres pour se placer dans les conditions d'irradiation du protocole segment de traces. C'est le cas par exemple, des expériences en radiobiologie menées au GANIL (ion carbone 75 MeV/A) et au GSI (ions carbone 11,4 MeV/A et argon 95 MeV/A) sur deux lignées cellulaires tumorales humaines irradiées en cultures monocouches (M Beuve et al. 2008).

(ii) *Expérience à TEL moyen*

À la fin des années 90, Furusawa et al. ont étudié les effets des rayonnements (en particulier l'EBR) de  $^3\text{He}$ ,  $^{12}\text{C}$  et  $^{20}\text{Ne}$  (TEL dans l'eau variant de 20 à 600 keV/ $\mu\text{m}$  approximativement) sur des cellules de la glande salivaire (HSG), des cellules de hamster (V79) et des cellules humaines issues des reins (T1). Ces expériences ont été faites sous hypoxie et aérobie par la méthode du TEL moyen.

Les courbes de Bragg de chaque faisceau d'ions ont été mesurées par une chambre d'ionisation (pour chaque énergie). Le débit de dose a été normalisé à chaque position de la courbe de Bragg pour un pré-compte de contrôle de la fluence (monitorage) défini. Les TEL de chaque faisceau ont été déterminés par ajustement théorique de la courbe de Bragg, à partir de la mesure des débits de dose pour différentes épaisseurs d'eau équivalentes. La contribution (de dose) des particules secondaires issues de la fragmentation nucléaire a donc été prise en compte dans le calcul du TEL. La dose estimée par rapport au TEL moyen est ensuite délivrée aux cellules par un système automatisé (pilotage par ordinateur) après calibration du système de monitorage du faisceau.

Les courbes de survie cellulaire ainsi obtenues, ont été ajustées grâce aux équations issues du modèle quadratique moyen selon  $S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$  (cf. chapitre 3, section 3.3.2a) ainsi que celles issues du modèle « multi-cibles »<sup>1</sup> (également appelé modèle de  $n$  cibles à un coup), permettant d'avoir accès à différents paramètres de survie. L'EBR, l'OER (cf. 1.1.1c), le coefficient alpha et la dose  $D_0$  ont été analysés en fonction du TEL.

#### b) Expériences « pic de Bragg » in vitro

Une autre manière d'irradier des cellules (ou des petits animaux) est de se placer dans la zone du pic de Bragg, c'est à dire proche des conditions cliniques. En effet, il est également nécessaire de comprendre la réponse cellulaire pour ce maximum de dépôt d'énergie (proche des conditions d'irradiations cliniques en hadronthérapie). Un exemple pour illustrer cette expérience est l'étude de Svetlana Sorokina et al., qui a pour but d'évaluer les dommages à l'ADN induits par des protons de 200 MeV avec une dose allant de 1 à 200 cGy sur des lymphocytes issus de sang de cordon ombilical (en comparaison avec des irradiations gamma). La largeur du pic de Bragg est de 4 mm au niveau de la fenêtre d'extraction et de 10 mm au niveau des échantillons du faisceau (ces données ont été déterminées par simulation Monte-Carlo de la distribution du profil des protons en profondeur dans l'eau). C'est pourquoi les échantillons cellulaires ont été placés le plus précisément possible au centre du pic de Bragg (à 25,5-26 cm de la fenêtre d'extraction) (Sorokina et al. 2013).

#### c) Microfaisceau

La première utilisation de microfaisceaux pour la radiobiologie date des années 1950, lorsque Bloom et Zirkle développent et utilisent des microfaisceaux de basse énergie pour l'étude des effets des radiations sur le cycle cellulaire (Zirkle & Bloom 1953) (Hanot 2008). Oublié depuis, l'intérêt des biologistes pour les microfaisceaux renaît dans les années 1990 avec la découverte des effets non-ciblés à faible dose d'irradiation.

Ce type d'irradiation consiste à irradier les cellules avec une fluence de particules chargées (généralement des particules  $\alpha$ ) connue et maîtrisée. La précision des microfaisceaux permet de contrôler :

- la fraction de cellules traversées par les particules,
- le nombre de particules pour chaque cible,
- la localisation de la trace au niveau cellulaire ou sub-cellulaire.

Il est possible par exemple, d'étudier une distribution de dose non uniforme dans une population cellulaire (effets de voisinage, etc.). Les effets radio-induits peuvent alors être reliés à un nombre de particules par cellule ou à la dose correspondante.

La conception des microfaisceaux pour la radiobiologie a énormément évolué depuis le milieu des années 1990. On distingue différents types d'installations. Le premier type de microfaisceaux d'ions utilisés en radiobiologie est constitué de lignes

---

<sup>1</sup>  $S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$  ; avec  $n$  le nombre de cibles atteintes aléatoirement,  $D$  la dose reliée au taux de survie  $S$  et  $D_0$  la dose létale moyenne (valeur de la dose pour laquelle le taux de survie est environ égal à 37%).

horizontales. Elles correspondent à une adaptation d'équipements qui étaient d'abord utilisés pour l'analyse. On peut citer le GSI (Darmstadt, Allemagne), l'INFN-LNL (Legnaro, Italie), l'université de Lund (Suède), le SNAKE (université de Munich, Allemagne), l'université de Surrey (Surrey, Angleterre), le CENBG (Bordeaux) et la microsonde de Pierre Süe (Orsay, Paris). À l'exception de l'INFN-LNL qui est fondé sur la collimation du faisceau, les instruments précédemment cités sont fondés sur la focalisation du faisceau. Les microfaisceaux spécialement développés pour la radiobiologie, correspondant à un deuxième type d'installation, sont verticaux et fondés sur collimation : par exemple, les équipements du Gray Cancer Institute (GCI, Londres, Royaume Uni) et l'université de Columbia I (New York City, EU) sont montés de cette façon, avec un microfaisceau irradiant les échantillons par le dessous. Le JAERI (Takasaki, Japon) est un autre exemple de microfaisceau vertical fondé sur collimation mais irradiant par le dessus. Le choix de la collimation est en général dépendant de contraintes d'encombrement. Les équipements de Columbia II et PTB (Braunschweig, Allemagne) sont quant à eux des exemples de microfaisceaux verticaux fondés sur la focalisation et irradiant respectivement du dessus et du dessous, la focalisation permettant une précision de ciblage (sous vide) de l'ordre sub-micrométrique (Hanot 2008).

d) Macrofaisceau en France

(iii) *Les plateformes françaises pour la radiobiologie*

Des dispositifs d'irradiations sont en opération dans différents laboratoires en France. Ces dispositifs sont soit des sources de rayons X soit des plateformes délivrant des ions légers pour irradier des cellules, ou pour certaines, des petits animaux. Le

Tableau 3 (non exhaustif) regroupe les différentes plateformes et leurs caractéristiques.

Laboratoire	Particules	Accélérateur/ Irradiateur	Energie moyenne	Opérationnel	Type d'irradiation
LPC- Clermont Ferrand, PAVIRMA I	X	X RAD-320, PXI	80 keV	oui	cellulaire + souris/rats
LRCM-Lyon Sud, CERVO	X	X RAD-320, PXI	80 keV	oui	cellulaire + souris/rats
Institut Curie, RadeX p	X	X RAD-320, PXI	80 et 160 keV	oui	cellulaire + souris/rats
ICO-Nantes	X	X RAD-225Cx, PXI	85 keV	oui	cellulaire +

<b>Angers</b>					souris/rats
<b>CCH-Baclesse Caen</b>	X	X RAD-225Cx, Cegelec	85 keV	oui	-
<b>Pasteur</b>	X	RS 320, Xstrahl	-	-	-
<b>CENBG, AIFIRA</b>	p <sup>+</sup> , α	Accélérateur Singletron 3 MV, irradiation microfaisceau	3 MeV	oui	cellulaire ciblée + laboratoire de biologie cellulaire
<b>ICPO*</b>	p <sup>+</sup>	Cyclotron, irradiation champ large	76 et 201 MeV	oui	cellulaire + souris/rats
<b>LPC- Clermont Ferrand, PAVIRMA II</b>	neutrons	Tube neutrons Sodern	2,5 MeV	non	cellulaire + souris/rats
<b>ARRONAX - Nantes</b>	p <sup>+</sup> , d, α	Cyclotron, irradiation champ large	p <sup>+</sup> (68 MeV), d (35 MeV), α (68 MeV)	non	cellulaire + souris/rats
<b>IPHC- Strasbourg CYRCE</b>	p <sup>+</sup>	Cyclotron, irradiation champ large	< 24 MeV	non	cellulaire + souris/rats
<b>LARIA, GANIL</b>	C	Cyclotron, irradiation champ large	75 et 95 MeV/A	oui	cellulaire + laboratoire de biologie cellulaire
<b>ESRF, Grenoble</b>	X	Synchrotron, irradiation champ large	10 à 100 keV	oui	cellulaire + souris/rats
<b>Lignes DISCO, MARS, et SMIS Soleil CEA</b>	X	Synchrotron, irradiation champ large (taille faisceau : 100 à 300 μm)	DISCO : UV-Visible MARS : > 8 keV SMIS : IR	oui	cellulaire
<b>Centre Antoine- Lacassagne, Nice*</b>	p <sup>+</sup>	Cyclotron, irradiation champ large	63 MeV	oui	cellulaire + souris/rats

Tableau 3 - Tableau récapitulatif des différentes plateformes françaises dédiées aux études en radiobiologie. \* centres cliniques de protonthérapie.

(iv) *Etat de l'installation au début du projet de thèse*

Après une période de réflexion initiée en 2008 et quelques premiers tests réalisés en 2009, le groupe CAS-Phabio de l'IPNL a entrepris le développement d'une plateforme d'irradiation pour la radiobiologie en 2010 avec le soutien financier de la région Rhône-Alpes (PRRH, ETOILE), de l'IN2P3 via le GdR MI2B et du CNES. Ce projet a été l'objet de mon travail de thèse.

Fort des connaissances apportées par la littérature pour le développement de telles plateformes (cf. chapitre 2, section 1.2.1a) et de l'expérience et des compétences de l'équipe CAS-PHABIO en matière d'instrumentation et d'études expérimentales avec des faisceaux d'ions (et agrégats), notamment pour l'hadronthérapie et la radiobiologie, nous avons mis en place une ligne à partir de la voie 4<sup>2</sup>.

### 1.2.3 Plateforme Radiograaff

a) Intérêts scientifiques du projet

Comme nous l'avons abordé précédemment, l'intérêt d'irradier des cellules avec des protons de moyenne énergie (3,5 MeV), est multiple et couvre un domaine assez large. Une motivation est notamment de pouvoir mieux paramétrer, évaluer et améliorer les modèles de prédiction de survie cellulaire (plan de traitement, TPS) en enrichissant les bases de données. Ainsi nous avons souhaité poursuivre les études radiobiologiques menées au GANIL (ions carbone 75 MeV/A et des Argon 95 MeV/n), et compléter l'ensemble de données acquises sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines.

D'après la littérature, les protons de moyenne énergie ont une EBR élevée. Belli et al., ont mesuré une EBR<sub>a</sub><sup>3</sup> autour de 3 pour la lignée cellulaire V79 irradiée avec des protons de TEL de l'ordre de 12,1 keV/μm (environ 3 MeV), comme nous pouvons le constater sur la

Figure 13 (Belli et al. 1998). De même, Paganetti et al. ont montré pour cette même lignée cellulaire, que l'EBR d'inactivation à 10% de survie est de l'ordre de 1,5 pour des protons de 12,1 keV/μm (cf.

Figure 14) (Paganetti et al. 2002). En effet, des protons d'énergie inférieure à 4 MeV, produisent des électrons delta de courte portée. Il en résulte que le transfert d'énergie se fait en grande majorité dans le voisinage proche (environ une dizaine de nanomètre) de la trajectoire de l'ion (cœur de trace) créant des dommages plus sévères (concentration de l'énergie).

---

<sup>2</sup> Il y a 5 voies d'irradiation au total associées à l'accélérateur Van de Graaff 4MV de l'IPNL.

<sup>3</sup> Calculée à partir du rapport des tangentes des pentes des courbes de survie cellulaire.

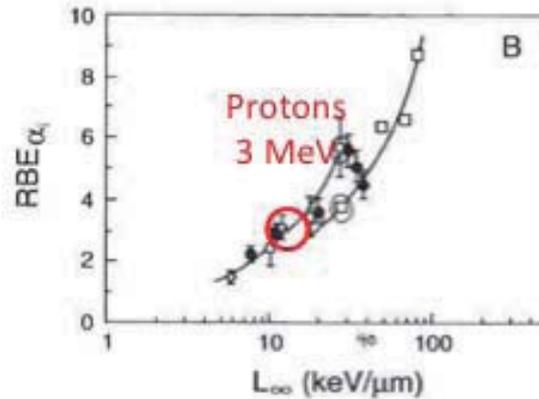


Figure 13 - Efficacité biologique relative alpha (tangente à l'origine des courbes de survie cellulaire) pour la lignée V79 irradiée avec des protons (en noir) et des ions alpha (en blanc) en fonction du TEL ( $\text{keV}/\mu\text{m}$ ) [Belli et al., 1998]

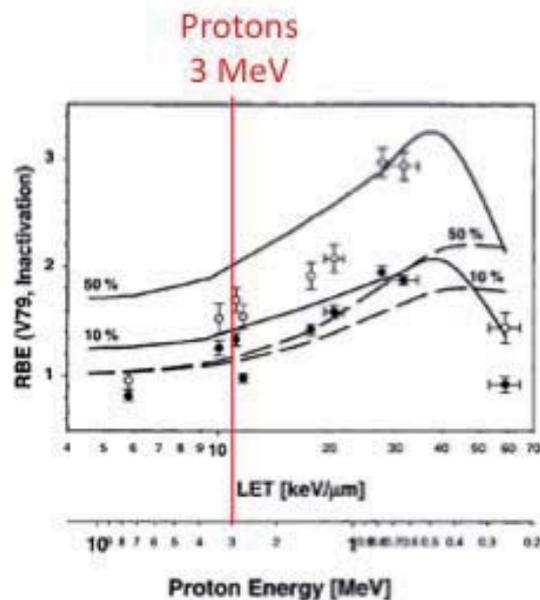


Figure 14 - Efficacité biologique relative d'inactivation (à 10% et 50% de survie) en fonction du TEL ( $\text{keV}/\mu\text{m}$ ) pour la lignée cellulaire V79 irradiée avec des protons [Paganetti et al., 2001]

En outre, lors des études menées au GANIL avec des ions carbone de  $33,6 \text{ keV}/\mu\text{m}$  ( $75 \text{ MeV}/A$ ), nous avons trouvé une EBR à 10% de survie égal à 1,5 et 2,1 pour des lignées radiosensibles et radiorésistantes respectivement (cellules tumorales de la tête et du cou) (M Beuve et al. 2008; Mira Maalouf et al. 2009). Il semblerait donc que

des protons de 3 MeV aient une efficacité biologique relative comparable à celle des ions carbone de 75 MeV/A.

L'accès aux faisceaux de l'IPNL est plus facile, moins coûteux et le temps disponible est plus important que sur les grands accélérateurs. Grâce à la mise en place d'une telle plateforme nous pouvons acquérir un plus grand nombre de données, dont les résultats peuvent être pertinents et envisagés sur d'autres plateformes. En plus d'être comparables aux ions carbone de 75 MeV/n en termes de dommages, les protons de moyenne énergie que délivre l'accélérateur Van de Graaff de l'IPNL pourront être utiles pour contribuer à l'étude des effets des neutrons rapides (neutronthérapie, radioprotection), qui, sur l'humain sont importants voir prépondérants dus aux protons secondaires.

b) Les objectifs du projet

Dans cette section, nous présentons le cahier des charges que nous avons défini pour ce projet : les objectifs fixés sur le protocole d'irradiation et la dosimétrie, les contraintes imposées par la biologie ainsi que les difficultés techniques et scientifiques majeures.

(i) Objectifs fixés

D'un point de vu des irradiations et de la dosimétrie nous nous sommes fixés quatre objectifs majeurs :

Les irradiations doivent avoir lieu selon le protocole segment de trace (1.2.2(i)) avec une variation du TEL entre l'entrée et la sortie des cellules (d'épaisseur de 20  $\mu\text{m}$  environ) maximale de  $\pm 10\%$ . Compte-tenu du faible parcours des protons de 3 MeV dans l'eau, comme l'illustre la

Figure 15, nous devons donc perdre un minimum d'énergie jusqu'à l'entrée des cellules à irradier.

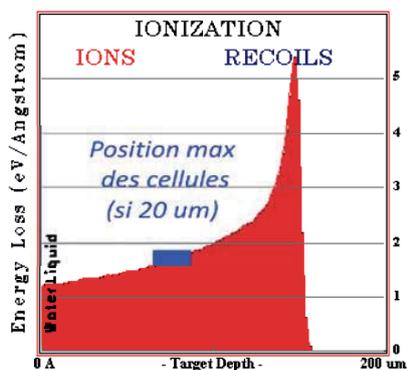


Figure 15 - Simulation SRIM du parcours des protons de 3,5 MeV dans l'eau. La zone bleue illustre la zone maximale pour laquelle l'énergie ne varie pas de plus de 10% entre l'entrée et la sortie de la cellule (20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au maximum).

Nous souhaitons travailler à débit de dose égal à 2 Gy/min pour se rapprocher, au plus, des conditions cliniques d'irradiation. En revanche, nous souhaitons garder la possibilité de travailler à plus haut ou plus bas débit (contrôle de la dosimétrie jusqu'à 10 Gy/min), ce qui orientera le choix du mode de délivrance du faisceau ainsi que le système de dosimétrie.

Nous voulons obtenir une distribution spatiale de la dose la plus homogène possible sur toute la surface des échantillons, ainsi qu'un contrôle de la fluence moyenne d'irradiation à mieux que  $\pm 5\%$

Pour se rapprocher au plus des conditions d'irradiation des expériences que nous avons effectué au GANIL (Beuve et al., 2008), ainsi que pour pouvoir faire des études de survies cellulaires, nous souhaitons obtenir un champ d'irradiation dont la largeur est supérieur à 2 cm.

(ii) *Contraintes biologiques*

D'un point de vu de la biologie, un certain nombre d'aspects ont été à prendre en compte avant la construction de la ligne d'irradiation. Voici les différents points qui ont contraint la réalisation de la plateforme Radiograaff :

- les cellules doivent être irradiées à l'air,
- une irradiation monocouche des cellules pour permettre l'application du protocole d'irradiation segment de trace,
- il doit y avoir la présence de milieu de culture afin d'irradier les cellules dans les meilleures conditions biologiques possibles,
- les boites de culture doivent permettre la pénétration des ions tout en restant fermées (avec du milieu de culture) pour éviter d'éventuelles contaminations biologiques,
- l'atmosphère dans lequel se trouvent les échantillons doit être contrôlé en température (généralement 37 °C) et en gaz (à l'air, CO<sub>2</sub>, azote, etc.),
- les irradiations nécessitent une fenêtre temporelle d'irradiation relativement courte pour éviter un stress aux cellules,
- nous devons développer un laboratoire de biologie cellulaire pour permettre aux biologistes de travailler dans des conditions optimales (maintien des cellules sous incubateur, traitements post-irradiation, etc.).

(iii) *Difficultés majeures*

Pour pouvoir réaliser le cahier des charges fixé, en tenant compte des contraintes imposées par la biologie cellulaire, nous avons rencontré un certain nombre de difficultés.

Il faut élargir le faisceau pour pouvoir irradier un grand nombre de cellules. Pour ce faire, plusieurs solutions sont possibles comme, le balayage électrostatique du faisceau, la diffusion Rutherford grâce à des feuilles d'or placées dans la trajectoire du faisceau, etc. En revanche, il faut peu d'éléments dans le faisceau pour éviter une perte d'énergie importante, et, que ces matériaux soient homogènes. Enfin, il faut un contrôle de la fluence adapté à nos futures expériences. En effet, il faut un système permettant de mesurer des débits de dose allant du cGy/min jusqu'au moins 10 Gy/min.

En résumé, nous avons discuté à travers ce chapitre des avantages physiques des ions avec en particulier la notion de TEL ainsi que des avantages biologiques des ions. Grâce à une rapide présentation du contexte scientifique du projet, nous pouvons comprendre pourquoi il est primordial de faire des études des rayonnements présentant une EBR supérieure aux photons. Ce qui introduit l'intérêt du développement d'une plateforme d'irradiation protons de 3 MeV au regard des différentes plateformes françaises. C'est à partir de ces différentes options de conceptions que nous avons démarré la construction de la ligne d'irradiation Radiograaff. Après avoir choisi le mode de délivrance du faisceau, nous avons effectué des simulations pour, évaluer les différentes pertes d'énergie, trouver une méthode pour réduire le courant faisceau efficacement afin de travailler dans la gamme de débit de dose souhaitée, etc. Ensuite, nous avons construit la plateforme et ajouté un dispositif de contrôle en ligne des irradiations. Après une phase de tests, nous avons pu extraire toutes les données nécessaires à la qualification de la plateforme.

Tout ceci sera présenté et discuté dans le chapitre suivant.



# 2

## Développements instrumentaux de la ligne Radiograaff : de la conception à la qualification

<b>2 Développements instrumentaux de la ligne Radiograaff : de la conception à la qualification .....</b>	<b>48</b>
<b>2.1 Conception et réalisation de la ligne d'irradiation.....</b>	<b>49</b>
2.1.1 Délivrance et extraction du faisceau .....	49
2.1.2 Schéma de principe .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1.3 Dimensionnement théorique : utilisation des outils SRIM et GATE .....	55
2.1.4 Résumé des caractéristiques .....	59
2.1.5 Contrôle en ligne de l'irradiation .....	60
2.1.6 Dispositif expérimental et interface utilisateur.....	64
2.1.7 Contrôle de la dosimétrie.....	66
<b>2.2 Evaluation et qualification de la plateforme.....</b>	<b>75</b>
2.2.1 Matériel et méthode.....	76
2.2.2 Résultats .....	80



## 2 Développements instrumentaux de la ligne Radiograaff : de la conception à la qualification

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser, dans un premier temps, aux différents aspects de la construction de la plateforme Radiograaff.

Comme nous l'avons mentionné dans le Chapitre 1, de telles expériences en radiobiologie ont un cahier des charges relativement contraint par, d'une part des paramètres physiques, imposés par l'énergie délivrée par l'accélérateur, l'intensité du faisceau, le pouvoir d'arrêt des ions, etc., et d'autre part des paramètres biologiques, liés aux conditions d'irradiation, à l'environnement et aux cultures cellulaires. Ces paramètres biologiques seront développés en détails dans le chapitre suivant. Premièrement, nous devons nous adapter aux conditions d'utilisation de l'accélérateur Van de Graaff 4 MV de l'IPNL. Il délivre des protons accélérés jusqu'à 3,5 MeV, correspondant à un parcours d'une centaine de microns dans l'eau. Il est donc important que les ions perdent un minimum d'énergie dans la ligne de transport avant d'atteindre les échantillons cellulaires (cf. chapitre 1, section 1.2.3(i)). Compte tenu également des débits de dose appliqués en radiobiologie, et du courant minimum délivré pour que l'accélérateur reste stable, il est indispensable de trouver des solutions pour réduire le flux incident. Nous présenterons donc les étapes de conception de la ligne d'irradiation avec les différentes possibilités de délivrance du faisceau, en s'appuyant sur la littérature ainsi que sur l'utilisation des outils de simulation SRIM 2012 et GATE v6.1, pour choisir celles qui paraissent les plus adaptées à nos besoins. L'ensemble des solutions envisagées ainsi que les calculs théoriques seront présentés dans une première section.

Dans un deuxième temps, nous présenterons les développements instrumentaux ainsi que les développements techniques apportés à la plateforme Radiograaff. Pour parvenir à appliquer le protocole d'irradiation *segment de traces*, nous devons irradier nos échantillons avec des protons dont l'énergie est suffisante pour qu'il y ait une variation maximale du TEL de  $\pm 10\%$  entre l'entrée et la sortie des cellules (20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). Par ailleurs, nous détaillerons le choix et le principe du système de contrôle en ligne de l'irradiation ainsi que les développements instrumentaux associés. En effet, nous devons être capables de contrôler, de façon « non destructive » et en temps réel, la fluence délivrée aux cellules. Enfin, après qualification de ce dispositif développé sur la ligne d'irradiation, nous sommes capables de faire une cartographie de la fluence mesurée que l'on convertit ensuite en cartographie de dose à partir d'un TEL théorique (calculé par SRIM).

Enfin, l'automatisation de la délivrance du flux de particules aux cellules et le système d'acquisition des données seront présentés dans la section 1.2.5. Les différentes possibilités de contrôle de la dosimétrie seront abordées et nous présenterons les systèmes retenus pour la plateforme Radiograaff.

Dans une dernière partie, nous présenterons l'évaluation de la plateforme. Nous aborderons le matériel et la méthode employés pour ce faire. Ensuite, nous discuterons des différents protocoles de mesures employés pour évaluer les performances de la ligne d'irradiation (énergie, calibration du système de monitoring, etc.). Pour finir, les résultats relatifs à la qualification de la ligne d'irradiation seront présentés et discutés.

## 1.2 Conception et réalisation de la ligne d'irradiation

### 1.2.1 Délivrance et extraction du faisceau

#### a) Les origines des lignes d'irradiation dédiées aux études en radiobiologie

Dans les années 1960, progressivement ces études ont porté sur la compréhension des effets des particules chargées dans le domaine de la biologie cellulaire. Par exemple, en 1967, Munson et al. ont mesuré les doses d'inactivation sur des bactéries (*Escherichia coli*) en les irradiant avec des protons et des particules alpha à différents TEL mais également avec des rayonnements gamma. Ils ont mis en évidence qu'il y a deux types de dommages létaux issus des irradiations dans le génome bactérien. Ceux de type 1 qui conduisent à une cassure d'un brin de l'ADN se réparant partiellement in vivo. Et les dommages de type 2 qui induisent la cassure de deux brins rapprochés de l'ADN (non réparables), ralentissant ainsi la progression de la réplication de l'ADN et conduisant donc à son inactivation (Munson, 1967). Progressivement, ces études se sont orientées dans le domaine de la santé à travers les effets des rayonnements ionisants sur des cellules de mammifères. Skarsgard et al. ont étudié les effets des ions lourds sur des cellules de mammifères (CH2B<sub>2</sub> – hamster). Pour ce faire, ils ont construit des courbes de survie cellulaire (cf. chapitre 3, section 3.3.2a) après irradiation de la lignée CH2B<sub>2</sub> par des rayonnements X, des ions hélium de 40 MeV, des ions lithium de 30 MeV et 58 MeV, des ions bore de 102 MeV, des ions carbone de 106 MeV, des ions oxygène de 131 MeV, des ions néon de 153 MeV et des ions argon de 230 MeV. À partir de ces courbes, Skarsgard et al. ont mis en évidence l'efficacité biologique relative (EBR) (en fonction du TEL) de chaque particule chargée sur cette lignée cellulaire. Ensuite, ils se sont intéressés aux dommages induits par les ions sur les chromosomes de la cellule (échanges de chromatine). En conclusion, cette étude a montré que les courbes de survie présentent un épaulement prononcé pour les ions carbone indiquant la présence d'une accumulation de dommages sublétaux (densité d'ionisation élevée). Ces données ont également montré qu'à partir d'une certaine valeur de TEL (443 MeV.cm<sup>2</sup>/g correspondant ici aux ions lithium) la plupart de ces dommages sont irréversibles (Skarsgard et al. 1967).

En 1979, une équipe de Berkeley s'est intéressée à l'efficacité biologique des ions carbone (400 MeV/u), des ions néon (425 MeV/u) et des ions argon (570 MeV/u) pour étudier précisément la relation dose à effet sur une lignée cellulaire humaine issue des reins (T-1 cells). La survie cellulaire a été mesurée après exposition aux faisceaux de particules chargées sous condition d'aérobie ou d'hypoxie sur une gamme de TEL allant

de 10 à 600 keV/ $\mu$ m. Cette étude a permis de montrer que la dose et le TEL moyen ne sont pas des « quantités » suffisantes pour caractériser la réponse des cellules. Il faut également la fluence, la vitesse de la particule et la charge de la particule. Par exemple, pour les ions carbone, les chiffres montrent une  $EBR_{aérobie}$  (mesuré à 10% de survie) variant de  $1,1 \pm 0,2$  à  $2,6 \pm 0,4$  (selon le TEL des ions carbone : 11-18 keV/ $\mu$ m dans le plateau à l'entrée et jusqu'à 178 keV/ $\mu$ m dans le pic de Bragg). Les valeurs de l'EBR pour les cellules en hypoxie sont plus élevées que celles en aérobie (pour tous les faisceaux), en particulier pour des faibles doses (environ 1 à 4 Gy – survie meilleure que 10%). En revanche, il y a très peu de différences entre les survies cellulaires sous condition d'aérobie ou d'hypoxie dans la zone du pic de Bragg (pas d'effet oxygène). Ce qui n'est pas le cas dans le plateau de la courbe de Bragg. Par exemple, des ions carbone de 11 keV/ $\mu$ m présentent un OER (cf. chapitre 1, section 1.1.1c) de 3 (environ) (Blakely et al. 1979). Ces résultats ont été complétés par l'étude de Roots et al. sur les dommages à l'ADN (cellules T-1) non réparés après des irradiations par ions lourds (mêmes faisceaux de particules chargées que précédemment). Ils ont montré que la capacité de la cellule à ne pas réparer son ADN devient maximale pour des valeurs de TEL allant de 100 à 200 keV/ $\mu$ m (où 25% des cassures ne sont pas réparées) (Roots et al. 1979). Ces différentes études ont permis d'obtenir des données dans le cadre de la thérapie par ions lourds.

Principalement par manque d'accès à des faisceaux de protons ou d'ions lourds pour la recherche en radiobiologie (utilisation des centres cliniques d'hadronthérapie) et par besoin de données sur la relation dose à effet pour différentes lignées cellulaires, certains laboratoires, dotés d'accélérateurs Van de Graaff ou Tandem, ont développé des lignes d'irradiation dédiées à la radiobiologie avec des faisceaux de moyenne énergie. Les irradiations cellulaires effectuées sur les plateformes qui vont suivre sont du même type que celles précédemment citées : survie cellulaire (principalement sur la lignée V79 - hamster) et détermination de l'EBR pour différentes valeurs de TEL. C'est pourquoi, dans la suite de cette section, nous allons essentiellement traiter des aspects techniques associés au développement de ce type de plateforme d'irradiation.

À la fin des années 80, une ligne d'irradiation dédiée à la radiobiologie basée sur un accélérateur Van de Graaff 7MV a été construite au Laboratoire de Physique Nucléaire de Legnaro (LNL-INFN) (à Padoue). Elle a été spécialement conçue pour délivrer un faisceau de particules monoénergétiques, de faible énergie avec des intensités adaptées à l'irradiation cellulaire, et équipée d'un système de dosimétrie basé sur la technologie des détecteurs employés en physique nucléaire (Belli et al. 1987). Cette ligne d'irradiation a permis des études systématiques sur les effets causés par les protons sur la lignée V79 (fibroblastes de hamster) au niveau de la cellule et de l'ADN. Les données obtenues ont montré que les protons sont plus efficaces pour induire une inactivation ou des mutations que d'autres particules plus lourdes mais de TEL comparables. De plus, ces premières expériences ont mis en évidence que la relation EBR-TEL pour des ions légers (sur des cellules) dépend du type de particule (Belli et al. 1989).

Entre 1989 et 2008, de nombreuses expériences ont été développées en Europe sur le même modèle, avec certaines particularités (généralement dépendantes de

l'énergie des faisceaux disponibles) pour extraire et/ou délivrer le faisceau jusqu'aux cellules.

À Naples, le faisceau de particules est produit par un accélérateur Tandem 3MV (HVC TTT-3). Il est directement collimaté (1 mm de diamètre) à la sortie de l'aimant d'analyse (le faisceau n'est pas focalisé par des quadrupôles) puis injecté dans la ligne horizontale et diffusé par une feuille d'or de 0,2  $\mu\text{m}$  pour que l'échantillon cellulaire (1 cm de large) soit irradié de façon homogène sur toute la surface. Le faisceau est extrait à l'air, 2 m après le diffuseur, à travers une fenêtre (circulaire) de Mylar aluminisé dont l'épaisseur est de 2  $\mu\text{m}$  et le diamètre de 1,3 cm. Une grille en tungstène a été placée devant le Mylar pour permettre son maintien à la pression due à l'interface vide-air (Scampoli et al. 2001).

Au Gray Laboratory Cancer Research de Northwood (Angleterre), l'accélérateur Van de Graaff 4 MV produit des protons de 4 MeV avec un courant de 0,5-2,0  $\mu\text{A}$  dans des conditions typiques d'utilisation. Dans le but d'obtenir une distribution de dose homogène en bout de ligne, le choix de l'arrangement s'est orienté sur la défocalisation et le balayage du faisceau. Les protons sont extraits à l'air par une fenêtre circulaire de 2,5 cm de diamètre à travers 50  $\mu\text{m}$  de Kapton (polyimide). Par ailleurs, une feuille d'or est placée 4 mm avant la fenêtre pour permettre la diffusion des protons. Sur cette plateforme, il s'agit d'irradier des échantillons sur une surface de 1,33  $\text{cm}^2$ . Les propriétés de diffusion et de perte d'énergie des protons dans l'air sont également mises à profit en ne minimisant pas l'espace d'air entre les échantillons et la fenêtre. Le but de ce dispositif est de travailler à différentes énergies : élevée, correspondant à 40 mm entre la fenêtre d'extraction et l'échantillon (17,5° d'inclinaison) ; moyenne, correspondant à 80 mm entre la fenêtre d'extraction et l'échantillon (17° d'inclinaison), et faible en intercalant une fine feuille de polypropylène (15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) entre la fenêtre et l'échantillon (Folkard et al. 1989). En 1996, certaines modifications ont été apportées à cette ligne. La fenêtre d'extraction est une fente rectangulaire (verticale) de 3x26 mm constituée d'un film de Kapton de 13  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ; et l'épaisseur d'air entre la fenêtre et les échantillons n'est plus que de 2 mm (Folkard 1996).

À Munich, à l'université d'Erlangen, un accélérateur Tandem 14 MV délivre des particules légères chargées via une ligne d'irradiation verticale dédiée à la radiobiologie. L'énergie des particules est plus élevée que pour les expériences citées précédemment : des protons de 28 MeV, des alphas de 42 MeV, des ions carbone de 98 MeV et des ions oxygène de 126 MeV. Le faisceau délivré horizontalement depuis la cuve accélératrice est collimaté, puis diffusé par une feuille d'or d'épaisseur variable selon l'énergie des particules accélérées. Ensuite le faisceau est courbé par un aimant à 90° (vers le haut), et est balayé dynamiquement par une paire de bobines de déflexion. En associant ces deux méthodes, il est possible d'obtenir une homogénéité meilleure que  $\pm 5\%$  (enveloppe totale) sur les 50 mm de diamètre d'une boîte de pétri standard. Enfin, le faisceau est extrait à travers une feuille circulaire de Kapton, de 60 mm de diamètre et de 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Besserer et al. 1999). En 2002, l'expérience a été légèrement modifiée. Le diffuseur d'or a été remplacé par un diffuseur en aluminium (15  $\mu\text{m}$  ou 45  $\mu\text{m}$  d'épaisseur selon l'énergie des particules) et déplacé après l'aimant d'analyse. Les autres éléments de délivrance et d'extraction du faisceau n'ont pas été modifiés. Enfin, les études se sont concentrées vers l'irradiation cellulaire avec des protons de 3 à 12 MeV (études des effets des protons de différents TEL sur les cellules) (Mörtel et al. 2002).

À Namur (Belgique), au Laboratoire d'Analyses par Réactions Nucléaires (LARN), une ligne de faisceau de protons diffusés a été conçue à partir d'un accélérateur Tandem 2 MV (Wéra et al. 2008). Grâce à deux sources différentes, il est capable d'accélérer différentes particules (du proton à l'uranium). Le faisceau est directement injecté dans la ligne d'irradiation après passage dans un collimateur carré de  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  sans élément optique additionnel. Les particules monoénergétiques (protons de 1 MeV) sont délivrées aux cellules à travers une fenêtre d'extraction en Kapton ( $8 \text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur) de diamètre 1,8 cm. La distribution spatiale des ions est meilleure que  $\pm 5\%$  (enveloppe totale) sur une surface de  $8 \times 8 \text{ mm}^2$ .

C'est à partir de ces différents dispositifs expérimentaux que nous avons imaginé notre propre ligne d'irradiation avec plusieurs possibilités pour réduire le courant machine, extraire le faisceau à l'air et obtenir une distribution de dose homogène sur la surface irradiée.

#### b) Délivrance du faisceau

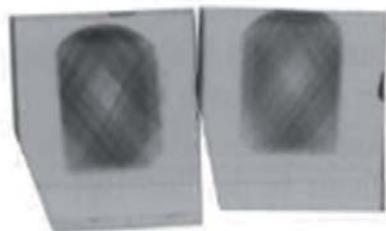
L'accélérateur Van de Graaff 4 MV de l'IPNL délivre un faisceau de protons monoénergétique (avec une incertitude de 1% environ), d'énergie effective maximale 3,5 MeV et de courant minimal de l'ordre de la dizaine de picoampère. Le système de transport comprend : un aimant d'analyse à  $90^\circ$ , des fentes de définition du faisceau, deux lentilles électromagnétiques et un obturateur de faisceau rapide (écran de tantale). Pour des questions de stabilité du faisceau, il est préférable de travailler avec un courant supérieur à 1 nA.

Dans un premier temps, nous avons testé un système de balayage électrostatique sur une ligne d'irradiation existante dédiée à l'étude du vieillissement des matériaux sous irradiation (radiolyse des matériaux, etc.). Le principe est le suivant :

Après passage dans l'aimant d'analyse, les particules sont injectées dans la ligne d'irradiation horizontale. Le faisceau est focalisé grâce à deux lentilles électromagnétiques (quadrupôles), puis diffusé à l'aide de plaques électrostatiques (horizontales et verticales). Enfin, il est extrait à l'air via une grille micro-perforée (taux de transmission de 30% environ) de  $500 \text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur, placée au contact d'une feuille de Havar ( $9 \text{ }\mu\text{m}$  avec un dépôt d'or de 130 nm) permettant d'éviter une éventuelle rupture du matériau faisant l'interface vide-air. Ce système est idéal pour des irradiations à doses et débits de dose élevés. En revanche, pour des études à faible débit ( $0,1 \text{ Gy/min}$  -  $10 \text{ Gy/min}$ ), comme celles menées en radiobiologie, il est difficile d'avoir une irradiation homogène par cette méthode. En effet, un tel dispositif est très long et délicat à régler compte-tenu du courant nominal délivré par la machine. La structure temporelle du courant combinée au balayage peut induire des zones sur-irradiées ou sous-irradiées.

Nous avons évalué l'homogénéité du balayage électrostatique pour un débit de dose proche des conditions de radiobiologie, à l'aide d'un film radiochromique HD-810. Ce film dosimétrique réagit chimiquement selon la dose de rayonnement déposée (en fonction de l'exposition, le film noircit plus ou moins). Nous verrons plus en détail les

caractéristiques de ces films dans la suite de ce chapitre (cf. 1.2.6a)1.2.6a)(iii)). Comme le montrent les images scannées des films après irradiation sur la Figure 16, la forme du balayage est visible (Lissajous). Des inhomogénéités sont donc présentes pour de tels débits de dose.



**Figure 16 - Films Gafchromic HD-810 irradiés avec des protons extraits à l'air (d'énergie nominale de 3,5 MeV) et balayés par un système de plaques électrostatiques. Le débit de dose est proche de 2Gy/min.**

Nous avons testé cette technique en jouant sur tous les paramètres expérimentaux à notre disposition (fréquence de balayage et paramètres machine), mais l'essai n'a pas été concluant. Il aurait fallu, pour respecter le cahier des charges fixé (cf. chapitre 1, section 1.1.1b)), modifier cette ligne d'irradiation en ajoutant, par exemple, un diffuseur en amont du système de balayage électrostatique. Mais cette solution ne nous a pas semblé envisageable pour les utilisateurs actuels de cette voie, surtout aux vues des contraintes en termes de débit de dose des deux thématiques expérimentales. En outre, la solution d'un balayage électrostatique présente l'inconvénient de donner à l'irradiation un caractère pulsé, ce qui n'est ni souhaitable pour les détecteurs ni pour le matériel biologique. C'est pourquoi, devant la difficulté d'obtenir un balayage homogène par cette technique, nous avons conçu une ligne d'irradiation uniquement dédiée aux études de radiobiologie en nous inspirant de celle construite en 1985 par Mauro Belli (cf. 2.1.1 a)).

Le faisceau est focalisé par deux paires de lentilles électromagnétiques (quadrupôles). Nous nous servons de deux points de focalisation : 1) en bout de ligne, pour faciliter les réglages de la focalisation et l'alignement au centre du tube à l'aide d'une fenêtre en quartz et 2) dans la voie (quartz et KBr de visualisation) pour avoir un second point de contrôle. Ensuite, le faisceau est collimaté par un premier collimateur (escamotable) de diamètre variable permettant le centrage (plus précis) du faisceau dans le tube de la voie et une légère réduction du courant selon la taille du faisceau à la sortie des quadrupôles. Un premier diffuseur d'or suivi d'un deuxième collimateur permet de réduire le courant. Puis un deuxième diffuseur d'or permet « d'éclater » le faisceau afin d'obtenir des particules dont la distribution spatiale est la plus homogène possible en bout de voie. Ceci réduit encore le flux de particules.

La

Figure 17 présente, de façon simplifiée, le principe de délivrance du faisceau depuis l'entrée des protons dans la voie jusqu'à leur extraction à l'air. Il permet de se représenter la géométrie de la voie. Plus de détails seront présentés par la suite.

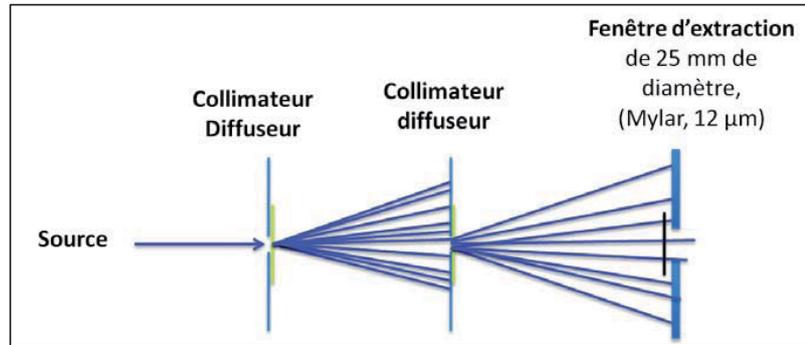


Figure 17 - Schéma de principe de la méthode choisie pour délivrer et extraire le faisceau à l'air.

c) Extraction du faisceau

Pour permettre l'irradiation d'échantillons biologiques, il faut extraire le faisceau de protons à l'air, comme nous l'avons vu dans la section 1.2.3(ii) du chapitre 1. Nous avons choisi une fenêtre circulaire dont le diamètre et l'épaisseur ont été contraints notamment par les propriétés mécaniques de tenue du vide du matériau utilisé pour faire l'interface vide-air. En outre, de manière à minimiser l'énergie perdue par les ions à travers le matériau, nous avons dû trouver le meilleur compromis entre l'épaisseur et le diamètre d'ouverture de la fenêtre. En effet, plus le diamètre est grand, plus il faut choisir un matériau épais (contraintes mécaniques), et donc, plus l'énergie perdue sera importante. Par ailleurs, le diamètre minimum est également « imposé » par la biologie. À titre d'exemple, les expériences de survie cellulaire nécessitent d'ensemencer un million de cellules par « puits » pour obtenir une bonne statistique, ce qui contraint à un minimum de surface d'irradiation.

À partir de toutes ces données, nous avons donc choisi une ouverture d'un diamètre de 2,5 cm.

Pour extraire le faisceau à l'air, il faut également choisir un matériau suffisamment résistant aux différences de pression tout en minimisant les pertes d'énergie. Pour ce faire, nous avons retenu le Mylar aluminisé ( $d=1,397 \text{ g/cm}^3$ ), dans lequel les protons de 3,5 MeV ont un pouvoir d'arrêt de 13,79 keV/ $\mu\text{m}$  et qui permet d'écouler les charges accumulées lors des irradiations.

À partir du calcul de la résistance d'une feuille circulaire d'épaisseur  $e$  et de rayon  $r$ , pour une pression maximale  $p_{max}$  donnée, nous avons pu déterminer l'épaisseur idéale de Mylar pour une bonne tenue de la fenêtre :

$$p_{max} = \frac{e}{r} \sqrt{\frac{\sigma_R^3}{E \times 0,0353}}$$

où  $\sigma_r$  est la résistance à la déformation, et  $E$  le module d'élasticité.

Les données Goodfellow pour le Mylar sont :  $E = 2\text{-}4$  GPa,  $\sigma_R = 190\text{-}260$  MPa [www.goodfellow.com/fr/].

Donc, pour une pression  $p = 1$  bar, et un rayon  $r = 1,25$  cm, on obtient :

$$e = 2,5 - 5,67 \text{ }\mu\text{m}.$$

Par souci de sécurité et pour réduire les déformations nous avons doublé l'épaisseur trouvée par le calcul théorique, et nous travaillons donc avec une feuille de Mylar aluminisé de  $12\mu\text{m}$  d'épaisseur.

En résumé, après focalisation par les quadrupôles, le faisceau de protons est centré dans la ligne d'irradiation par un premier collimateur. Un « doublet » diffuseur-collimateur permet de réduire le courant et le deuxième diffuseur permet d'homogénéiser le faisceau en bout de voie. Enfin, la fenêtre de  $12 \mu\text{m}$  de Mylar permet d'extraire les protons à l'air sur une surface de  $4,9 \text{ cm}^2$ .

### 1.2.2 Dimensionnement théorique : utilisation des outils SRIM et GATE

Des outils de simulations permettent de calculer le transport des particules. Dans cette partie, nous présentons les deux outils, GATE v6.1 et SRIM 2010, qui nous ont permis de dimensionner la plateforme, de la délivrance à l'extraction du faisceau. En effet, les objectifs du travail de simulation, ici, sont : le choix et l'optimisation de la conception de la ligne d'irradiation (par exemple l'estimation du taux de réduction du courant machine par des feuilles d'or et des collimateurs, c'est à dire le nombre d'ions transmis après la réduction du faisceau par les différents éléments constituant la ligne d'irradiation) et l'estimation de l'homogénéité de la distribution des protons sur les échantillons (en bout de ligne) en fonction des épaisseurs des diffuseurs d'or. Ce deuxième point sera présenté par la suite (cf. 1.3.1d)).

Afin d'illustrer le fonctionnement de GATE, nous présentons le résultat du taux de réduction du courant simulé en fonction de la taille du deuxième collimateur (placé 60 cm après le premier diffuseur). Cette modélisation a été faite en se rapprochant le plus possible des conditions réelles. Des calculs théoriques ont été effectués en parallèle afin d'évaluer la pertinence de ces simulations.

#### a) SRIM

Le logiciel SRIM 2010 (Ziegler et al. 2010) est un programme de simulation Monte-Carlo qui calcule les interactions électroniques et des interactions atomiques (interactions de nature électromagnétique), les pertes d'énergie d'un ion de masse et d'énergie données au sein d'un matériau, éventuellement constitué de plusieurs couches de compositions différentes. Il permet ainsi d'obtenir rapidement des tables de pouvoirs d'arrêt électronique et nucléaire, et les distances de recul maximales.

Cet outil est donc utile pour évaluer rapidement la perte d'énergie des protons de  $3,5 \text{ MeV}$  dans les différents matériaux interceptant le faisceau (diffuseurs d'or, Mylar,

air, etc.) et donc calculer les épaisseurs maximales des diffuseurs tolérables. En outre, il est utile pour calculer le diamètre du cône de diffusion des protons après interaction avec les feuilles d'or, ce qui permet d'obtenir un compromis entre l'épaisseur minimale des feuilles et la longueur de la ligne d'irradiation (encombrement) pour lesquels la distribution spatiale des protons extraits est homogène à  $\pm 5\%$  sur toute la surface irradiée.

b) GATE : Geant4 Application for Tomographic Emission

Alors que l'utilisation des techniques Monte Carlo pour la dosimétrie en physique médicale devient essentielle, GEANT4 (Geometry And Tracking) est un code initialement prévu pour la physique des hautes énergies, en constante évolution, pour étendre son champ d'application en particulier à la physique médicale. La complexité d'un tel code a permis la création de plateformes de simulations Monte Carlo pour des applications spécifiques et basées sur les bibliothèques GEANT4 : c'est le cas, par exemple, de GATE (GEANT4 Application for Tomographic Emission).

Initialement dédiée à la simulation d'exams de médecine nucléaire, comme la scintigraphie, la tomographie par émission de simples photons (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP), la plateforme GATE a été développée pour répondre à trois objectifs principaux : donner accès au potentiel du code GEANT4 sans aucune connaissance du langage C++, proposer des concepts suffisamment généraux réutilisables quel que soit le type d'examen simulé, être un code flexible pouvant s'adapter aux besoins croissants de la physique médicale.

La structure du code est la suivante : GATE encapsule les bibliothèques de GEANT4 dans un ensemble de couches écrites en C++. La couche la plus près du noyau de GEANT4 implémente les classes de base de GATE définissant la géométrie, les sources, les processus et modèles physiques, le suivi des trajectoires des particules (*tracking*) et la gestion du temps. Le deuxième niveau est une couche qui implémente les objets issus des besoins spécifiques pour l'imagerie (détecteurs...etc.). La couche utilisateur est la partie du code qui fournit accès à GATE par des mécanismes simples de scripts de commandes. C'est à partir de cette couche que nous avons pu décrire, initialiser et exécuter une simulation simplement, et analyser les données en développant une macro ROOT.

Une mise à jour conséquente (Jan et al. 2011) a été proposée dans la distribution de GATE 6.0.0 (compatible avec GEANT4 9.1 et GEANT4 9.2). Cette évolution majeure de GATE est principalement due à l'intégration d'outils spécifiques à la radiothérapie, permettant des simulations complètes de traitement et d'imagerie. En outre, cette version de GATE apporte des outils pour la modélisation de scanner CT, par exemple : description de sources, inclusion de modules prédéfinis pour la géométrie des détecteurs, etc. Enfin, l'intérêt majeur pour nous était l'intégration des ions dans la plateforme, ce qui n'était pas le cas jusqu'alors.

GATE offre un avantage considérable pour le dimensionnement de la plateforme Radiograaff, puisqu'en plus des informations qui peuvent nous être données par SRIM, nous avons accès aux données simulées et enregistrées par un détecteur virtuel de GATE : profil 2D, coupe, distribution...etc. Ce qui nous permettra, comme nous le

verrons dans la suite de ce chapitre, d'obtenir des simulations que nous pourrions comparer aux résultats expérimentaux.

c) Exemples de résultats des simulations de taux de réduction avec GATE v6.1

Dans un premier temps nous avons estimé, par simulation GATE du dispositif expérimental, la réduction théorique du courant machine produite par des diffuseurs d'or de  $1\mu\text{m}$  d'épaisseur et différents diamètres de collimateurs qui interceptent la trajectoire du faisceau. Les résultats sont présentés dans le

Tableau 4. Pour ce faire, nous avons simulé la géométrie de la ligne d'irradiation la plus proche possible de la réalité. La simulation tient compte des distances : 60 cm entre les deux diffuseurs, 115 cm entre le deuxième diffuseur et la fenêtre d'extraction en Mylar (diamètre 2,5 cm ; épaisseur 12  $\mu\text{m}$ ). Le faisceau de protons est ponctuel et mono-énergétique (3,5 MeV d'énergie nominale).

Dispositif de la simulation	Flux de particules (absolu) réduit par rapport au faisceau initial ponctuel GATE v6.1
2 diffuseurs (1 $\mu\text{m}$ Au) + collimateur 2 mm diamètre Statistique : $5 \times 10^6$ protons (3,5 MeV)	$3,2 \cdot 10^{-4}$
2 diffuseurs (1 $\mu\text{m}$ Au) + collimateur 1 mm diamètre Statistique : $5 \times 10^6$ protons (3,5 MeV)	$8,1 \cdot 10^{-5}$
2 diffuseurs (1 $\mu\text{m}$ Au) + collimateur 500 $\mu\text{m}$ diamètre Statistique : $5 \times 10^6$ protons (3,5 MeV)	$2,3 \cdot 10^{-5}$
2 diffuseurs (1 $\mu\text{m}$ Au), statistique : $5 \times 10^6$ protons (3,5 MeV). Pas de collimateur	$3,5 \cdot 10^{-2}$

Tableau 4 - Flux réduit calculé par simulation GATE v6.1 à partir d'un faisceau de protons (ponctuel et mono-énergétique) pour différentes configurations.

Ensuite, nous avons estimé par le calcul quels seraient les diamètres des collimateurs optimum en fonction du courant machine.

Rappelons que la dose s'exprime de la manière suivante :

$$D = TEL \times Fluence,$$

Pour une dose de 2 Gy et un TEL de 10 keV/ $\mu\text{m}$  (simulation SRIM pour des protons de 3,5 MeV), on peut déduire la fluence correspondante :

$$Fluence_{2Gy} = 1,25 \cdot 10^8 \text{ cm}^{-2},$$

et donc déduire le flux souhaité pour un débit de dose de 2 Gy/min :

$$\varphi_{souhaité} = 2,1 \cdot 10^6 \text{ ions/cm}^2/\text{s}.$$

On sait, d'après les calculs répertoriés dans le

Tableau 4, que le taux de réduction pour un collimateur de 1 mm (positionné entre les deux diffuseurs) est :

$$\left(\frac{\partial P}{\partial S}\right)_{1mm} = 8,1 \cdot 10^{-5} \text{ ions/cm}^2,$$

correspondant à la densité de probabilité d'impact par  $\text{cm}^2$  avec un collimateur de 1 mm de diamètre (le détecteur virtuel est placé en bout de ligne d'irradiation).

Or,

$$\varphi_{\text{souhaité}} = i \times \left(\frac{\partial P}{\partial S}\right)_{1mm} \times \left(\frac{D_{\text{nouv.}}}{D_{1mm}}\right)^2,$$

avec  $i$  le courant machine ( $\text{s}^{-1}$ ),  $\left(\frac{\partial P}{\partial S}\right)_{1mm}$  le taux de réduction pour un collimateur de 1 mm,  $D_{1mm}$  le diamètre du collimateur actuel et,  $D_{\text{nouv.}}$  le nouveau diamètre du collimateur pour avoir le flux souhaité ( $\varphi_{\text{souhaité}}$ ) sur les échantillons à irradier.

On obtient donc,

$$D_{\text{nouv.}} = D_{1mm} \times \sqrt{\frac{\varphi_{\text{souhaité}}}{i \times \left(\frac{\partial P}{\partial S}\right)_{1mm}}} \text{ (mm)},$$

Pour un courant compris entre 5 nA et 60 nA, voici les différents diamètres optimaux de collimateurs, pour obtenir un débit de dose de 2 Gy/min (Tableau 5):

<b>i (nA)</b>	<b>i (ions.s<sup>-1</sup>)</b>	<b>D<sub>nouv.</sub> (mm)</b>
1	1.10 <sup>9</sup>	5,1
5	5.10 <sup>9</sup>	2,3
10	10.10 <sup>9</sup>	1,6
15	15.10 <sup>9</sup>	1,3
20	20.10 <sup>9</sup>	1,1
25	25.10 <sup>9</sup>	1,0
30	30.10 <sup>9</sup>	0,9
40	40.10 <sup>9</sup>	0,8
60	60.10 <sup>9</sup>	0,7

**Tableau 5 - Diamètre optimal (mm) du deuxième collimateur pour obtenir un débit de dose de 2 Gy/min sur les échantillons en fonction du courant nominal délivré par l'accélérateur (nA).**  
 $\varphi_{\text{souhaité}}=21000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $\left(\frac{\partial P}{\partial S}\right)_{1mm} = 8,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-2}$ .

En conclusion, un collimateur de 2 mm de diamètre sera adapté pour travailler dans des gammes de courant assez faible (5-10 nA). Nous voyons par ce résultat qu'avec un collimateur de 1 mm il faut que l'accélérateur délivre 25-30 nA. Au-delà de cette valeur de courant, un collimateur de 0,5 mm de diamètre peut être également adapté. En

conclusion, le choix de trois tailles de collimateur permet de nous affranchir des problèmes de stabilité de l'accélérateur. Si nous devons travailler avec un courant faible ou fort, nous pouvons nous adapter et délivrer, peu importe les conditions expérimentales, un faisceau diffusé avec un débit de dose de 2 Gy/min.

### 1.2.3 Résumé des caractéristiques

Le

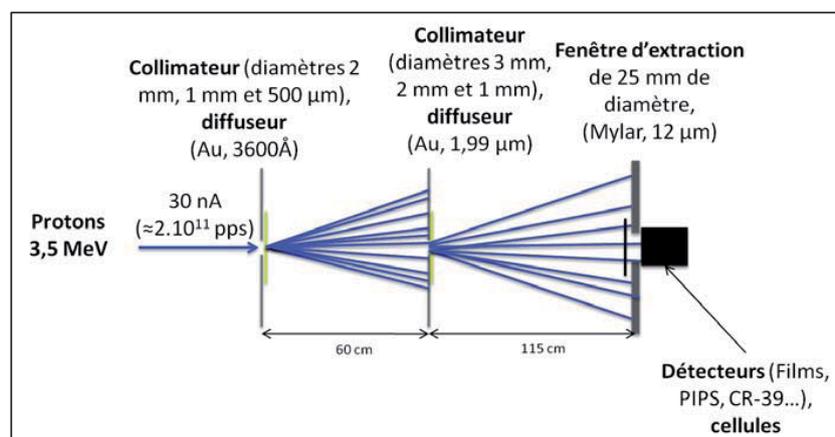
Tableau 6 répertorie les différentes caractéristiques des éléments, présents actuellement sur la ligne d'irradiation, permettant de former et d'extraire un faisceau homogène en bout de voie.

Elément	Abréviation	Position	Caractéristiques
Collimateur 1	C1	« origine »	Diamètres : 2mm, 1mm, 500 $\mu$ m
Diffuseur 1	D1	0,5 cm devant C1	Matériau : Or Epaisseur : 3600 $\text{Å}$
Collimateur 2	C2	60 cm devant C1	Diamètres : 3mm, 2mm, 1mm
Diffuseur 2	D2	0,5 cm devant C2	Matériau : Or Epaisseur : 1,99 $\mu$ m
Fenêtre d'extraction	Mylar	Bout de ligne = 115 cm	Matériau : Mylar aluminisé Epaisseur : 12 $\mu$ m Diamètre : 2,5 cm

Tableau 6 - Caractéristiques des éléments permettant la délivrance et l'extraction du faisceau d'ions.

En résumé, la

Figure 18, permet de visualiser tous les éléments interceptant le faisceau les uns par rapport aux autres.



**Figure 18 - Schéma de principe de la délivrance et de l'extraction du faisceau avec la disposition géométrique et les caractéristiques techniques des diffuseurs et collimateurs.**

#### 1.2.4 Contrôle en ligne de l'irradiation

##### a) Quelques exemples de solutions possibles

Dans cette section, nous présentons quelques exemples de contrôle de la fluence qui ont été développés pour des lignes d'irradiation avec des protons de basse énergie, dont nous nous sommes inspirés pour élaborer notre propre système.

Pour des faisceaux de haute énergie, comme c'est le cas en protonthérapie avec des faisceaux de protons balayés (Pencil Beam Scanning), un des contrôles de l'irradiation peut se faire en bout de ligne à l'aide de chambres d'ionisation par transmission. Il s'agit d'un moniteur permettant de contrôler que la fluence particulaire reste conforme à celle planifiée (Courtois 2011). Dans le cas d'un faisceau de basse énergie, cette solution est compromise du point de vue des contraintes imposées par la physique, comme nous l'avons mentionné précédemment.

C'est pourquoi, pour les plateformes citées dans la section 1.2.1a) pour lesquelles le faisceau est balayé pour délivrer une dose homogène en bout de ligne, un système de détecteur placé sur les bords de la fenêtre d'extraction a été mis en place pour contrôler l'irradiation. Dans ces expériences, le balayage est plus large que le diamètre de la fenêtre d'extraction, qu'il s'agisse d'un balayage électrostatique ou d'un faisceau diffusé par des feuilles minces d'or (distribution gaussienne). Il est donc simple de calibrer les détecteurs de façon à corréliser le nombre d'ions présents dans les bords du faisceau à celui délivré aux échantillons placés dans l'axe.

Pour ce faire, il est possible d'utiliser des chambres d'ionisation de petits diamètres. Par exemple, deux chambres plates peuvent être placées en haut et en bas de la fenêtre, puis reliées à un compteur qui donne un signal proportionnel au courant intégré par chaque chambre (Folkard et al. 1989). À l'aide d'une troisième chambre d'ionisation positionnée à la place des échantillons, il est possible de calibrer le système de monitoring. Une telle méthode présente plusieurs inconvénients : la calibration des chambres avec une source de rayonnement  $\gamma$ , le changement de gaz de la cavité qui doit être fait régulièrement, une paroi suffisamment fine pour ne pas perturber la fluence du faisceau, et le taux de comptage qui ne doit pas être trop élevé pour ne pas saturer le dispositif.

Dans le cas de la détection de photons, on parle de débit de dose maximal. À titre d'exemple, une chambre PTW 0,3 cm<sup>3</sup> Semiflex (Type 31013), est capable de mesurer un débit de dose (photons) de 28 Gy/s (à 99.0% de la saturation) dans le cas d'un flux constant. Notons qu'avant saturation, il y a des phénomènes de recombinaison conduisant à une mauvaise collection des charges (cf. 1.2.6a)). Pour un flux pulsé, la dose maximale est de 1.5 mGy à 99.0% de la saturation. Pour donner un ordre de grandeur, les générateurs X délivrent généralement un débit de dose de 3 Gy/min, ce qui représente  $2.10^{11}$  photons qui traversent la chambre chaque minute (chiffre issu de simulations Geant4).

De la même manière, des détecteurs silicium à barrière de surface ou des PIPS (Passivated Implanted Planar Silicon) peuvent être placés sur les bords du faisceau, donnant un comptage absolu du nombre de particules diffusées (Belli et al. 1989; Besserer et al. 1999). L'inconvénient majeur des détecteurs silicium est leur faible durée de vie à l'exposition aux rayonnements (implantation des ions dans le cristal de silicium). De plus, au-delà de 60 000 particules/s ce type de détecteur empile les signaux, ce qui fausse le taux de comptage et donc sous-estime la dose réellement délivrée.

Mörtel et al. ont développé un système de quatre fibres scintillantes placées sur les bords du faisceau juste en amont de la fenêtre d'extraction, et connectées à des photomultiplicateurs via une fibre optique. C'est à partir de ce système de monitoring que nous avons conçu le notre. Leur arrangement est en forme de « croix » afin d'obtenir le taux de comptage sur quatre parties du faisceau diffusé, et donc de pouvoir également vérifier la stabilité latérale (X, Y) du faisceau (Mörtel et al. 2002).

Ces fibres scintillantes ont été choisies de façon à avoir une réponse élevée. En effet, le nombre de photons de scintillation produits dans le matériau dépend de la nature du matériau de scintillation, de l'énergie déposée, de la géométrie et de la longueur traversée par les rayonnements ionisants. De plus, la fraction de lumière capturée augmente avec la différence d'indice de réfraction entre le cœur et la gaine de la fibre. Nous avons donc choisi une fibre dont l'indice du cœur est le plus élevé possible.

Voyons dans un premier temps le dimensionnement des fibres scintillantes ainsi que leurs caractéristiques techniques. Nous verrons par la suite la chaîne d'acquisition associée au dispositif et son mode de fonctionnement.

## b) Dimensionnement

D'un point de vue expérimental, il est indispensable de faire des études préliminaires, afin de dimensionner un système de détection avant sa mise en place. Dans ce cas précis, nous avons évalué théoriquement les limites techniques du système de contrôle en ligne de l'irradiation que nous avons envisagé. L'objectif principal est de déterminer la taille maximale de fibre scintillante afin de collecter un maximum de protons sans saturer les photomultiplicateurs (PM) associés ; c'est à dire, avoir un comptage proportionnel au nombre de particules entrantes dans les fibres.

Il faut donc tenir compte du temps de réponse des PM associés aux fibres optiques. Un PM délivre un courant proportionnel au nombre de photons entrants. Chaque impact de proton dans la zone scintillante génère des photons. Ces photons génèrent à leur tour des électrons par impact sur la photocathode. La chaîne de dynodes permet ensuite une multiplication du nombre d'électrons, et donc de délivrer une impulsion de charge. Lorsque le nombre d'impulsions par seconde est trop important, il y a saturation du PM et donc la dégradation du signal (ce qui biaise la valeur des signaux sortants). Nous avons émis l'hypothèse que ces PMaturent pour un taux de comptage de l'ordre de  $10^6$  impulsions/s (d'après la conception de nos PM et de la documentation technique). Nous avons donc déterminé la surface des fibres scintillantes pour laquelle le nombre de particules collectées par seconde par le PM est très inférieur à  $10^6$  impulsions/s.

À titre d'exemple, si on a  $10^7$  protons/cm<sup>2</sup>/s (correspondant à un débit de dose de 10 Gy/min), une fibre de 5 mm de long et de 1mm de section détectera  $5.10^5$  impulsions/s, ce qui est acceptable. Pour être certain de pouvoir travailler sur une large gamme de

débit de dose, nous avons utilisé quatre fibres identiques mais de surface différentes. Dans la suite de ce document nous parlerons de manière simplifiée de « longueurs » de fibres scintillantes : 2 mm, 1 mm, 500  $\mu\text{m}$  et 300  $\mu\text{m}$ . Notons toutefois, qu'il s'agit de dimensions théoriques, les tailles effectives seront présentées dans la section 1.3.1a).

c) Schéma de principe, caractéristiques et acquisition des données

En général, une fibre scintillante (simple revêtement) est constituée d'un polymère, de type polystyrène ou polyvinyltoluène (PVT), absorbant l'énergie d'ionisation des particules incidentes ; il faut approximativement 4,8 eV d'énergie moyenne pour créer une excitation (exciter les molécules du polymère) (Ruchti 1996). Ici, nous avons choisi une fibre scintillante BCF-10 (Saint-Gobain), dont les caractéristiques sont les suivantes :

- le cœur scintillant (polystyrène) d'indice de réfraction 1,60 est entouré d'un revêtement (guide d'onde) en PMMA (densité 1,2  $\text{g}/\text{cm}^3$ ) et d'indice de réfraction de 1,49,
- la partie guide d'onde ou « cladding » est de 40 $\mu\text{m}$  d'épaisseur pour une fibre de 1mm de largeur ce qui permet aux protons de 3 MeV de pénétrer dans le cœur et donc d'obtenir un signal,
- rendement de fluorescence : 8000 photons par MeV (déposé),
- le temps caractéristique de décroissance lumineuse (caractérisant la rapidité du scintillateur) est de 2,7 ns,
- la fibre émet dans le bleu avec une longueur d'onde de 432 nm.

Un schéma simplifié de la fibre scintillante est présenté par la Figure 19.

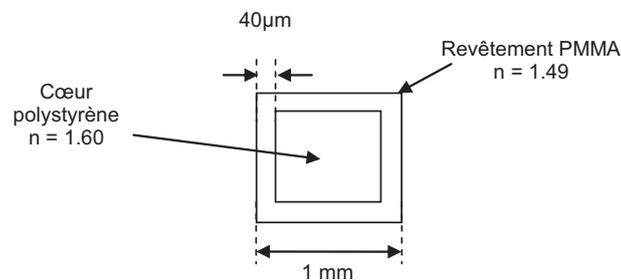


Figure 19 - Schéma de la fibre scintillante BCF-10.

Le spectre d'émission d'un scintillateur constitue une donnée essentielle dans le choix du photodétecteur. On peut ainsi choisir une sensibilité spectrale qui optimise l'efficacité de détection de l'ensemble scintillateur-photodétecteur. L'intensité lumineuse sortant de la fibre optique est détectée à l'aide d'un photomultiplicateur Hamamatsu type H6520. La photocathode choisie possède une sensibilité spectrale qui couvre toute la plage de longueurs d'onde étudiée (400-550 nm) correspondant au spectre d'émission de la fibre scintillante.

La

Figure 20 présente le schéma de principe du dispositif de contrôle en ligne de la fluence. La partie de gauche représente le faisceau diffusé en bout de ligne avec les différents éléments autour de la fenêtre d'extraction. La partie de droite représente une vue de face des fibres scintillantes placées juste avant la fenêtre en Mylar de 2,5 cm de diamètre. Elles sont placées sous vide à 1,35 cm du centre du faisceau. Chaque fibre scintillante est reliée à une fibre optique par un mastic en élastomère de silicone (Dow Corning® RTV3145) dont l'indice optique est de 1,49, et possédant une longueur d'absorption de [1-3cm] dans une gamme de longueur d'onde de [400-700nm] (Montecchi & Ingram 2001). La fibre optique assure le transport entre la région sous vide et l'air (ouvertures dans la bride) et est reliée à un PM, à l'aide d'un support adapté. Pour éviter la pollution lumineuse environnante, on a ajouté de la silicone noire à la base des fibres, à l'extérieur de la bride. Pour les mêmes raisons, les PM sont placés dans une boîte opaque à la lumière.

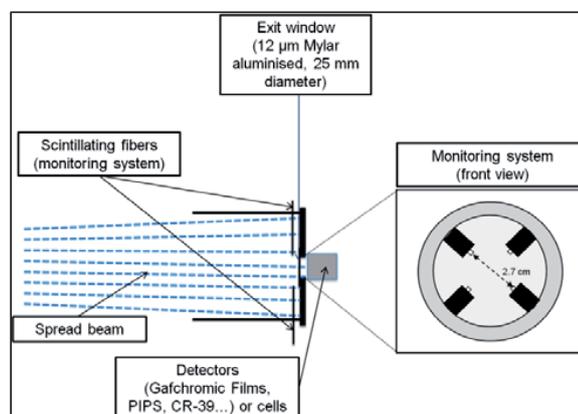


Figure 20 – Schéma de principe du système de monitoring en ligne.

Chaque PM est relié à une alimentation HT (-1kV) (CAEN-N472, 4 voies). Le signal de sortie du PM (charges collectées) est une impulsion analogique. Ces impulsions servent à générer, par un discriminateur à seuil (CAEN-N840), un signal logique qui est envoyé à un compteur : soit en passant par un module Gate&Delay pour ajuster la mise en forme (longueur d'impulsion) puis aux échelles de comptage (indicateur de niveau), soit par un convertisseur NIM-TTL (adaptation des signaux) pour être envoyé à la carte d'acquisition du PC via un module NI BNC-2121.

L'indicateur de niveau est un module issu du service électronique de l'IPNL. Il permet d'avoir un contrôle rapide du comptage d'un détecteur. Le comptage est possible si la largeur des signaux est supérieure à 70 ns, d'où l'utilité d'un module Gate&Delay. Cette voie n'est pas indispensable, mais est très pratique, dans le but d'éviter des « acquisitions informatiques » à répétition lorsque l'on fait des réglages avant irradiation.

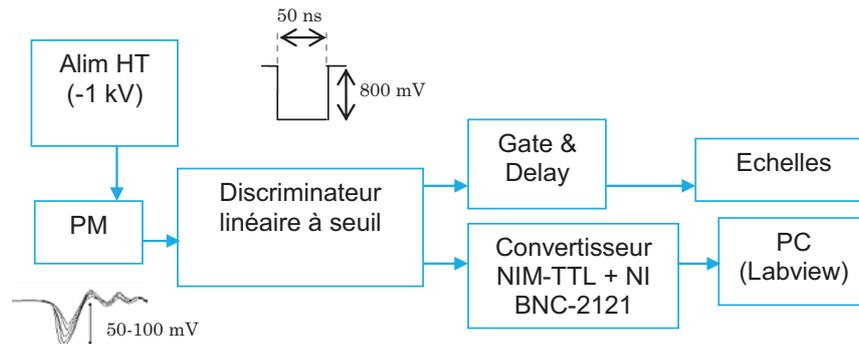


Figure 21 – Schéma du dispositif d'acquisition électronique des fibres scintillantes.

Le bloc de connexion NI BNC-2121 permet de connecter facilement les signaux d'E/S à un dispositif de compteur. Les signaux de sortie de ce dernier module sont ensuite traités par un logiciel Labview (version 8.6), spécialement développé pour cette expérience (cf. section 1.2.5), via une carte d'acquisition NI PCI-6602.

La Figure 21 schématise le dispositif d'acquisition électronique. Le seuil des discriminateurs a été choisi à 20 mV pour avoir 15 à 40 coups/s de bruit de fond selon la taille des fibres scintillantes. Le choix du seuil sera présenté en détails dans la section 1.3.1a).

### 1.2.5 Dispositif expérimental et interface utilisateur

**Dispositif expérimental.** Pendant l'irradiation, les cellules adhèrent à une paroi dans une boîte adaptée au type d'étude (plus de détails seront présentés dans le chapitre 3, section 3.2.1) qui est située sur le passeur d'échantillons développé à cet effet. Les boîtes sont alors déplacées face au faisceau en utilisant des tables de translation (X,Y) motorisées (PI-micos, Translation Stage VT-80). La course est de 300 mm avec une vitesse de déplacement de 20 mm/s ; la précision sur le positionnement est submillimétrique. Le passeur d'échantillon est contrôlé à distance par un logiciel Labview. Enfin, pendant l'irradiation, les échantillons sont protégés par une enceinte thermostatée dans laquelle l'atmosphère peut être contrôlée (ajout de CO<sub>2</sub>, azote...etc.) et qui entoure la fenêtre d'extraction (aucune interférence avec le faisceau).

**Lecture et visualisation des données.** L'interface développée sous Labview (v.8.6), dont une capture d'écran est présentée dans la Figure 22, est simple à utiliser et

se compose de différents onglets qui permettent l'accès à l'ensemble des paramètres d'acquisition.

Chaque détecteur est relié à un compteur (bloc NI BNC-2121). Le « Count0 » est le pré-compte, c'est-à-dire celui qui pilote l'expérience. Il est commandé par une fibre scintillante (à débit de dose de 2 Gy/min, nous utilisons la fibre de 500  $\mu\text{m}$  de long) (cf. section 2.1.5 c)). Les « Count1-2-3 » donnent les valeurs des comptages des trois autres fibres. Enfin le « Count4 » donne le comptage du détecteur silicium, permettant la calibration du système de monitoring ainsi qu'un contrôle de la dosimétrie, que nous décrirons dans la section 1.2.6b). Nous rentrons le nombre de particules que l'on veut délivrer à l'échantillon dans le Count0 (relié à la fluence et donc à la dose). Quand cette valeur est atteinte, alors l'écran de tantale (vanne ultra-rapide  $\sim 30\text{ms}$ ) se ferme, et tous les compteurs sont stoppés. Notons qu'il n'y a pas de valeur de renormalisation inclus dans le logiciel. Count0 est une valeur relative associée au comptage de la fibre scintillante. Le passeur d'échantillons (capacité maximale de 16 boîtes) est également piloté par ce programme.



Figure 22 – Exemple d'un onglet du programme d'acquisition Labview. « Choix positions/Precount » consiste en la définition du précompte pour chaque échantillon à irradier.

La communication entre le PC et l'électronique se fait via la carte NI PCI-6602. Le taux d'acquisition maximum de la carte NI PCI-6602 est de 80 Mhz (spécification constructeur). Les valeurs affichées de chaque compteur sont actualisées toutes les 10 ms et les données sont stockées à la fin de chaque acquisition (fermeture de l'écran de tantale). Grâce à ce programme, nous sommes en mesure de contrôler le flux du faisceau (visualisation en ligne) et de faire une analyse hors ligne des données stockées.

## 1.2.6 Contrôle de la dosimétrie

### a) Outils de mesure de la dose absorbée : principes, avantages et limitations

Cette section présente les principes et les performances des outils les plus couramment utilisés pour contrôler la dose délivrée à des échantillons irradiés. Quelles sont les différentes possibilités de contrôle de la dosimétrie ? Quelles sont leurs caractéristiques ? Quels sont leurs avantages et inconvénients ?

D'un point de vue strictement métrologique, il est important de maîtriser l'ensemble des paramètres de l'expérience pour quantifier les erreurs afin de statuer sur la validité des résultats. Nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage de D. Blanc (Blanc et al. 1997) pour plus de détails sur les mécanismes de détection ainsi que sur les techniques non présentées ici.

#### (i) *Chambre d'ionisation*

Il existe différents types de chambre d'ionisation comme la chambre à paroi d'air (utilisée uniquement dans les laboratoires standards), la chambre cylindrique (utilisée pour l'assurance qualité des faisceaux de photons en radiothérapie) ou les chambres plates utilisées pour la dosimétrie des électrons (énergie inférieure à 10 MeV) ainsi que des photons de basse énergie (tension d'accélération inférieure à 100 kV). Le principe de fonctionnement repose sur la création de paires électron / ion dans le volume sensible. Notons qu'il y a différents modes de fonctionnement des détecteurs à gaz. Pour une différence de potentiel inférieure à 100 V, les ions se recombinent totalement ou partiellement avant d'atteindre l'électrode et l'amplitude de l'impulsion est nulle ou faible. Entre 300 et 1000 V, les ions créés par le rayonnement ionisant sont suffisamment accélérés par le champ électrique pour provoquer des ionisations secondaires s'ajoutant à l'ionisation primaire. On est alors en régime de proportionnalité. À partir de 1100V, chaque ionisation primaire entraîne une avalanche d'ions secondaires et le nombre d'ions collectés devient indépendant du nombre d'ions primaires. Les détecteurs qui fonctionnent dans cette région sont les compteurs Geiger-Müller. Pour travailler « en régime » chambre d'ionisation, il faut appliquer une tension d'environ 300 V aux électrodes de la chambre, pour optimiser la collection des porteurs créés, sans induire d'autres paires par mécanisme d'avalanche. La charge collectée est intégrée dans un électromètre et peut, par la suite, être convertie en valeur de dose absorbée, après application d'un ensemble de facteurs de correction (cf. protocole de dosimétrie (IAEA 2000)). Par exemple, un électromètre dont la plage de mesure est comprise entre 6 mGy/min et 30 Gy/min (UNIDOSE, plage de mesure « medium »), a une résolution de 1pC.

Un des avantages de la chambre d'ionisation (par rapport à d'autres détecteurs communément utilisés en dosimétrie : films, détecteurs silicium, etc.) est que le signal résultant est peu dépendant de l'énergie du rayonnement incident (Blanc et al. 1997). En d'autres termes l'énergie nécessaire pour générer une paire ion-électron dans l'air dépend peu de l'énergie de la particule incidente.

Grâce à leur haute stabilité à long terme, leur haute précision, de l'ordre de 0,1% pour une chambre d'ionisation de bonne qualité (utilisée en clinique) (Jalade 2005) leur lecture en temps réel et leur relative facilité d'utilisation, les chambres d'ionisation sont devenues l'instrument standard pour les mesures de dosimétrie clinique.

Le passage entre la réponse de la chambre d'ionisation à cavité d'air et la dose absorbée n'est pas si simple, cela suppose que :

- toutes les charges créées sont effectivement collectées (c'est à dire qu'il n'y a pas de recombinaison entre les charges positives et négatives) ;
- la masse de l'air dans la chambre est invariable et parfaitement connue, ce qui dépend, bien entendu, de la température, de la pression et de l'humidité de l'air ambiant ;
- la cavité est suffisamment petite de sorte que, placée dans le milieu, elle ne perturbe pas la fluence des particules chargées existant dans ce milieu (théorie de Bragg-Gray) (Spencer & Attix 1955). En effet, la paroi de la chambre ne doit pas modifier la fluence des particules chargées dans le milieu.

(ii) *Couplage caméra CCD – cristal scintillant*

Dans cette section, nous allons présenter deux exemples d'application de contrôle de la dosimétrie par caméra CCD.

Afin d'offrir au patient une thérapie d'une grande précision, il est important de confirmer les propriétés du faisceau (énergie, largeur, etc.) chaque jour. Par exemple, au Centre Hospitalier National de Cancérologie de Chiba (NCC, Japon), les caractéristiques du faisceau, en particulier la profondeur à laquelle ce dernier est arrêté dans un matériau donné, sont mesurées par une chambre d'ionisation après avoir irradié un fantôme d'eau. Cependant cet outil est encombrant, lourd et long à mettre en place. C'est pourquoi l'équipe de recherche de Yasuhiro Fukushima a développé un système simple de mesure du faisceau de protons (Fukushima et al. 2006). Cet outils consiste en un bloc de scintillateur plastique (BICRON, BC-400), de dimension (50×50×400) mm<sup>3</sup> et d'une densité de 1,032 g.cm<sup>-2</sup> couplé à une caméra à capteur CMOS (SONY, HDR-HC1) (couramment appelée caméra CCD) de résolution spatiale de 1920×1080 pixels avec une numérisation de 8-bits.

La

Figure 23 présente le principe schématique de ce dispositif. Un faisceau de protons de 235 MeV (issu d'un cyclotron) irradie le scintillateur plastique (le champ d'irradiation est de 30mm×30mm) et le flux lumineux résultant est enregistré par la caméra CCD.

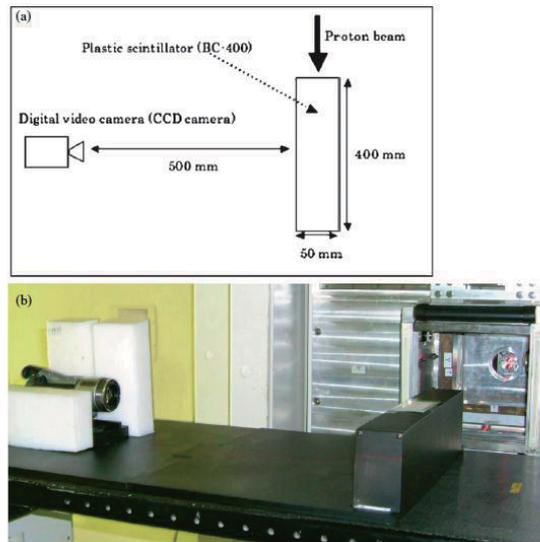


Figure 23 - (a) Principe schématique. Faisceau de proton de 235 MeV (cyclotron AVF) irradiant un scintillateur plastique. (b) Photo du dispositif expérimental.

Ceci permet d'obtenir une image de la profondeur à laquelle les ions sont arrêtés dans le matériau (pic de Bragg), comme le montre la

Figure 24. Cela permet d'obtenir une image du faisceau et voir s'il y a des diffusions latérales, des problèmes au niveau de l'énergie des ions, etc.

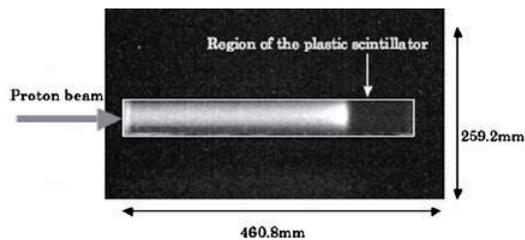


Figure 24 - Image enregistrée par caméra CCD. Le rectangle blanc représente la surface du scintillateur plastique [Fukushima et al., 2006].

Cette technique de contrôle est également utilisée en Brachythérapie (Hanada et al. 2007), en radiographie neutron (Pleinert et al. 1997) et permet le développement de recherches sur l'optimisation de ces systèmes de détection ainsi que sur l'optique instrumentale pour la dosimétrie en radiobiologie.

Un dispositif similaire est couramment utilisé sur l'accélérateur Tandem de Munich. Il consiste en l'association d'un écran scintillant (Kodak Biomax) et d'une

caméra vidéo munie de capteurs CCD (les caractéristiques des capteurs ne sont pas données dans l'article). Le champ d'irradiation est homogène à  $\pm 5\%$ , et les ions sont extraits à l'air à travers une fenêtre de 60 mm de diamètre pour pouvoir irradier des cellules (installation présentée précédemment dans la section 1.2.1). La Figure 25 a) ci-dessous montre la distribution de l'intensité dans les directions (x,y) d'un faisceau de protons de 28 MeV (Besserer et al. 1999). La Figure 25 b) représente les deux profils transverses 2D (x,y), ici le nombre de coups en fonction de la position.

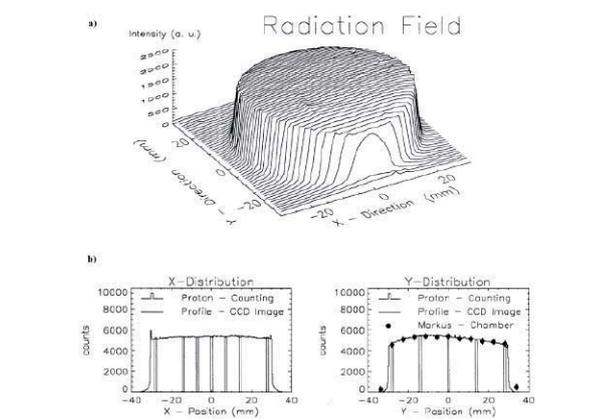


Figure 25 - (a) Intensité du champ d'irradiation (2D) à la sortie de la fenêtre d'extraction, (b) profils en x et y comparés au résultat d'un compteur de particules et à une chambre d'ionisation [Besserer et al., 1999].

On voit que le profil mesuré par la caméra CCD correspond au profil mesuré dans les mêmes conditions par la chambre d'ionisation (Markus Chamber). Cette méthode de dosimétrie par caméra CCD est donc validée par la mesure de la chambre d'ionisation (dosimètre standard en radiobiologie), même dans des conditions proches des nôtres, i.e. avec des protons de moyenne énergie.

Ces différentes études mettent en exergue, en plus des caractéristiques physiques adaptées à un tel contrôle, la facilité et la rapidité de la mesure de dosimétrie à effectuer avant chaque irradiation (en thérapie et dans le domaine expérimental).

### (iii) Films radiochromiques

Un film radiochromique réagit chimiquement par rapport à la dose de rayonnement déposée. Selon l'exposition, le film noircit plus ou moins. La réaction est due à un transfert d'énergie par ionisation d'un photon ou d'une particule chargée vers les molécules du site photomonomère (site récepteur) qui va induire ensuite la polymérisation. Les variations de couleur (variation de l'absorbance dans la région du spectre visible) sont liées à un processus de polymérisation dont chaque événement produit des changements sur plusieurs molécules. À l'aide d'instruments qui mesurent la densité optique ou le taux d'absorption des films irradiés, nous pouvons construire une courbe de calibration (le degré de couleur sombre en fonction de la dose). De même, à

partir d'un simple scan, nous pouvons mesurer la dose et la distribution spatiale d'un film gafchromique irradié. Comme les matériaux utilisés pour fabriquer ces films sont de masse atomique faible, ils sont très similaires à la composition de l'eau et donc peuvent être assimilés à des tissus humains (simulation de tissus humains dans certaines expériences) (Trojaa et al. 2000).

Le film HD-810 est constitué d'une couche sensible de 6  $\mu\text{m}$  (4  $\mu\text{m}$  équivalent eau) sur une base de 100  $\mu\text{m}$  de polyester avec une uniformité de 7%. Ce film est peu sensible pour de faibles doses (< 3 Gy), mais très utilisé dans les domaines de dose élevée (50-2500 Gy) et fréquemment utilisé dans la recherche sur la dosimétrie clinique (Blackwell et al. 1998), notamment pour des contrôles de la dosimétrie sur des faisceaux de protons (Mercado-Uribe et al. 2009).

Le film EBT-2 a deux couches actives : un substrat actif de 175  $\mu\text{m}$  et une seconde couche active de 30  $\mu\text{m}$  (avec une couche protectrice de 5  $\mu\text{m}$ ). Ces films sont sensibles sur une grande gamme de dose allant de 0,2 Gy à 100 Gy. Un autre avantage qu'offrent les films Gafchromic par rapport à d'autres détecteurs est leur faible dépendance en énergie. En effet, ces films ont une densité optique fonction de la dose qui ne varie pas au-delà de 0,3% pour des photons de 25 MeV comme pour des sources d'Iridium-192 (émetteur  $\beta^+$ , 384 keV) utilisées en brachythérapie (Sarfehnia et al. 2010). Pour des protons de 50-160 MeV, on obtient une variation de la réponse inférieure à 10% (Zhao & Das 2010). En revanche, quand l'énergie effective des protons est inférieure à 40 MeV, les films EBT commencent à montrer une réponse sous-évaluée de la dose avec des variations de la sensibilité de l'ordre de 20% dans la zone du pic de Bragg (Piermattei et al. 2000; Vatnitsky 1997; Daftari et al. 1999; Zhao & Das 2010). Enfin, de nombreux facteurs doivent être pris en compte pour effectuer une dosimétrie précise avec ces films : exposition UV, température, orientation du film lors de l'analyse (scan) ainsi que l'uniformité et la variation optique avec le temps (Daftari et al. 1996; Butson et al. 2003).

(iv) *Les détecteurs solides de traces : CR39*

Le CR39 est un plastique, de formule  $(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_7)_n$ , couramment utilisé en physique nucléaire pour détecter, identifier et compter des particules. Il se présente sous la forme de petites plaques de quelques cm de côté et de quelques dixièmes de mm à quelques mm d'épaisseur. Il s'agit d'une détection a posteriori que l'on classe dans les dosimètres passifs (au même titre que les films radiographiques par exemple).

Lors du passage des particules chargées dans le CR39 celles-ci déposent de l'énergie dans le plastique et cassent des liaisons polymères. Le long de leur parcours ces particules modifient les propriétés du CR39. Les régions endommagées deviennent alors chimiquement sensibles. Pour rendre ces traces visibles par microscopie, nous devons effectuer un traitement chimique des CR39. En général, on utilise du NaOH ou du KOH fortement concentré. Les conditions de développement, comme la concentration et la température de la solution, ainsi que la durée de trempage, sont propres à chaque expérience. Par exemple, au GANIL, des CR-39 sont utilisés pour effectuer la dosimétrie avant irradiation d'échantillons cellulaires à l'aide d'ions carbone de 75 MeV/u. Le protocole de révélation est de laisser tremper les plaques irradiées dans une solution de

NaOH concentrée à 12N à 80°C pendant 10 min. Ensuite les plaques sont rincées, puis séchées avant d'être analysées par microscopie optique classique. La

Figure 26 montre les impacts des ions argon de 95 MeV/u pour deux fluences différentes.

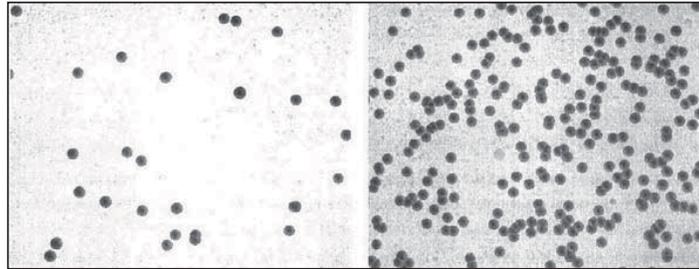


Figure 26 – Impacts d'ions argon 95 MeV/u sur des plaques CR39 à différentes fluences.  $3,5 \cdot 10^4$  ions/cm<sup>2</sup> (gauche) et  $3,5 \cdot 10^5$  ions/cm<sup>2</sup> (droite). Le rayon d'une trace est d'environ 4  $\mu$ m.

On peut ensuite mesurer le diamètre des traces ou compter le nombre de dommages à l'aide d'un microscope optique. Cela permet assez facilement de remonter à la fluence d'ions sur la plaque (Dörschel et al. 1996; Fromm et al. 1991; Xiaojiao et al. 2009; LEE et al. 2007).

#### (v) *Diode silicium*

Une diode silicium est constituée d'une jonction *p-n*. Les diodes peuvent être basées sur des substrats de type p (les trous sont des porteurs de charge majoritaires) ou de type n (électrons majoritaires). Dans le domaine de la radiothérapie, les diodes sont utilisées en mode passif (sans polarisation durant l'irradiation) en raison des débits de dose importants (quelques Gy/min) (Benoit 2008). Dans ce cas, la zone de déplétion est réduite à son épaisseur minimale et la sensibilité (dépendant du volume de la zone déplétée) minimum. Lors de l'irradiation, des paires électrons / trous sont générées dans la zone de charge d'espace (i.e., la zone déplétée), sont séparées par le champ électrique intrinsèque, et collectées. Cette collection induit un courant, proportionnel au débit de dose, mesuré via un électromètre ou une chaîne d'acquisition électronique classique. Les diodes sont très largement utilisées en dosimétrie médicale en raison de leur simplicité d'utilisation (lecture presque immédiate) ainsi que leur sensibilité (meilleure que les chambres d'ionisation). L'inconvénient, probablement majeur des diodes, réside dans la perte de sensibilité avec la dose cumulée. Jornet et al. ont montré une perte de sensibilité de 3,4% et 0,2% par dose de 100 Gy pour deux types de diodes irradiées avec des photons issus d'un LINAC 18 MV (Jornet et al. 2000). Les diodes ont donc besoin d'être ré-étalonnées de façon fréquente. Les autres facteurs à considérer sont la dépendance en énergie (le numéro atomique du Si est 14), la dépendance avec le débit de dose et la température (Saini & Zhu 2004).

Cette première partie a permis de présenter quelques systèmes de contrôle de la dosimétrie utilisés notamment en radiothérapie. Nous avons dressé un rapide aperçu des

Développements instrumentaux de la ligne Radiograaff : de la conception à la qualification

dosimètres disponibles commercialement, utilisés en routine clinique et qui peuvent être adaptés à nos besoins. Le

Tableau 7 résume les avantages et inconvénients de chaque type de dosimètre.

Paramètres	Chambre d'ionisations	Scintillateur + Capteurs CCD	Films	CR-39	Diode
Résolution spatiale	-	Elevée (dépend de la taille de pixels de la caméra CCD, ex. 22,5 µm pour le model CCD-1242E&EM)	Elevée (~100 µm)	Elevée	-
Equivalence aux tissus	Oui	Non	Oui	Proche	Non
Lecture immédiate	Oui	Oui	Non	Non	Oui
Linéarité de la réponse	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Résistance aux rayonnements	Oui	Oui	Oui (mais problèmes de saturation)	-	Non
Dépendance en énergie	Oui	Oui	Faible	Oui	Oui
Dépendance débit de dose*	Oui à très haut débit	Oui	Très faible	Oui - Réponse dégradée à haut débit	Oui
Dépendance température	Oui	Non	Oui	Oui	Faible
Durée de vie (réutilisable)	Bonne	Bonne	Usage unique	Usage unique	Bonne
Facilité, rapidité utilisation	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Facilité de lecture	Oui	Oui	Oui	Non	Oui

Tableau 7 - Synthèses des principales caractéristiques des dosimètres utilisés en routine clinique. \*Tous les détecteurs ont une plage d'utilisation en fluence et/ou débit de dose.

## b) Contrôle de la dosimétrie de la ligne d'irradiation Radiograaff

(i) *Le détecteur*

Le détecteur que nous avons utilisé pour ces mesures est un détecteur à semi-conducteur en silicium. En général, il est désigné sous l'appellation de « PIPS » (Passivated Implanted Planar Silicon). Son principe de fonctionnement est celui d'une jonction p-n. Ce détecteur est fabriqué à partir d'une pastille de silicium très pur de type n (du fait des impuretés donneuses d'électrons résiduelles). La surface d'entrée est « passivée », c'est-à-dire qu'elle est recouverte d'une fine couche de  $\text{SiO}_2$  (60 Å environ) afin de protéger la zone implantée du silicium. Un schéma de principe de ce type de détecteur est montré sur la

Figure 27.

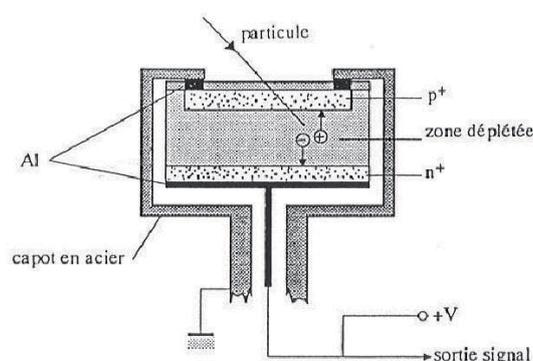


Figure 27 : Schéma simplifié d'un détecteur silicium de type "PIPS".

La diffusion des porteurs majoritaires d'une zone à l'autre conduit à la création d'un champ électrique s'opposant à ces déplacements de charges. Un équilibre s'établit et une zone désertée en charges mobiles apparaît à la jonction des zones p et n. Après avoir traversé la couche morte, ( $\text{SiO}_2$  + zone p+) les particules perdent de l'énergie dans la zone déplétée en créant en particulier des paires électron-trou (dans le silicium la création d'une paire correspond en moyenne à une perte de 3,62 eV) : les porteurs sont alors collectés de part et d'autre de la jonction grâce au champ électrique.

Enfin, dans le but de limiter le bruit, et donc de ne pas détériorer la résolution, le détecteur est isolé électriquement. Les signaux sont acheminés jusqu'au préamplificateur de charges (Canberra 2003B). La tension de polarisation du détecteur est de +75 V dans l'air. Ce qui permet d'avoir une zone de déplétion maximale de 100  $\mu\text{m}$  et ainsi de collecter toute l'énergie de la particule incidente. Notons que des protons de 3 MeV sont stoppés dans 92  $\mu\text{m}$  de silicium. Le préamplificateur possède deux sorties signaux : une sortie rapide et une sortie lente dédiée à la spectroscopie.

(ii) *L'électronique associée au détecteur*

Nos mesures effectuées avec le détecteur PIPS ont trois objectifs :

- Calibrer le système de monitoring en ligne (fibres scintillantes),
- Mesurer l'énergie du faisceau à la sortie de la fenêtre d'extraction,
- Analyser l'homogénéité du faisceau, en scannant le PIPS latéralement devant la fenêtre d'extraction.
- 

Pour ce faire, nous utilisons une chaîne de spectroscopie classique pour la mesure en énergie et une chaîne de comptage (voie rapide) pour les deux autres mesures.

**Chaîne de spectroscopie.** Le détecteur est connecté à un préamplificateur Canberra 2003B qui fournit une tension de sortie positive proportionnelle aux charges accumulées dans la capacité du circuit intégrateur. Ces signaux sont ensuite acheminés vers un amplificateur de spectroscopie Tennelec (TC205). La constante de temps de mise en forme des signaux a été choisie égale à 0,25  $\mu$ s. Les impulsions mises en forme sont ensuite envoyées dans le convertisseur analogique numérique (carte d'acquisition du PC). Le gain de l'amplificateur est ajusté à 200 de façon à ne pas saturer le spectre en énergie (ADC, 2048 canaux).

**Chaîne de comptage.** Les signaux de la sortie rapide du préamplificateur sont envoyés dans l'amplificateur rapide « timing filter » Canberra (ne permet pas la mise en forme des signaux) qui permet d'indiquer si une particule a été détectée. Grâce à la rapidité de la réponse de l'amplificateur, nous pouvons travailler à des taux de comptage de l'ordre de 70 000 coups/s sans risque d'empilement des signaux (résultats des mesures dans la suite du chapitre). Ces signaux sont ensuite acheminés vers un discriminateur à seuil (choisi à 200 mV pour s'affranchir du bruit du détecteur et d'éventuels courants parasites), puis vers deux voies : soit une visualisation rapide des taux de comptage grâce à un module Gate & Delay et un indicateur de niveaux (échelle de comptage), soit après adaptation, les signaux sont traités par le programme d'acquisition Labview (cf. section 1.2.5).

La

Figure 28 présente le schéma de l'électronique avec les deux voies d'acquisition des signaux. Notons que les signaux en sortie de la voie lente de l'amplificateur sont de 40 mV (en moyenne) pour les impulsions de bruit et de 3,2 V pour le signal avec faisceau. Les signaux en sortie de la voie rapide sont de 800 mV d'amplitude et de 50 ns de durée.

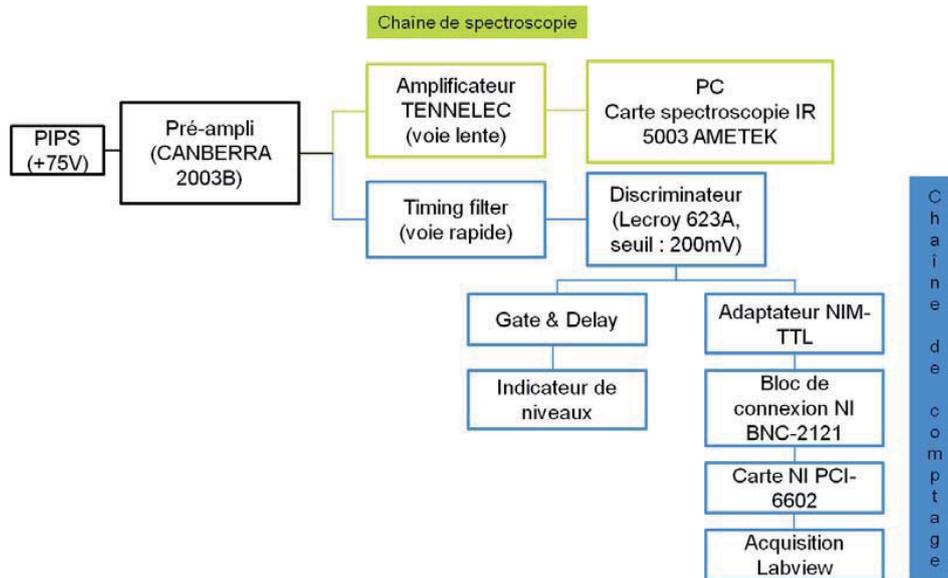


Figure 28 - Chaîne d'acquisition électronique des signaux du détecteur PIPS.

(iii) - *Contrôle qualitatif de la distribution spatiale des ions*

Afin d'avoir un contrôle rapide de la distribution spatiale des ions diffusés derrière la fenêtre d'extraction, nous utilisons un film radiochromique HD-810. Comme ce film est composé d'une seule couche sensible, il permet de se rapprocher le plus des conditions d'irradiation des cellules (avec une couche sensible de  $6 \mu\text{m}$  d'épaisseur, nous restons dans les conditions : TEL constant à 10% près). Comme nous l'avons mentionné dans la section 1.2.6a), ces films sont peu sensibles pour de faibles doses. Néanmoins, à partir de 3 Gy, il est possible d'observer la distribution spatiale des protons dont l'énergie initiale est de 3,5 MeV comme nous le verrons par la suite. Donc, au vu de leur tendance à montrer une réponse sous-évaluée de la dose pour des faisceaux de basse énergie, nous les utilisons pour un contrôle rapide de l'homogénéité du faisceau diffusé. C'est une mesure complémentaire à celle obtenue par le détecteur PIPS.

### 1.3 Evaluation et qualification de la plateforme

Dans cette seconde partie, nous allons discuter de l'évaluation de la plateforme Radiograaff. En effet, nous devons connaître l'énergie des particules incidentes et la distribution spatiale de la dose. Nous avons donc vérifié que les objectifs du cahier des charges, fixés au départ, sont atteints et qu'il est donc possible d'irradier des échantillons cellulaires avec une distribution de dose relative à mieux que  $\pm 5\%$  et avec un contrôle de l'énergie dans les cellules.

### 1.3.1 Matériel et méthode

a) Protocole de calibration et tests

(i) *Calibration*

Comme nous l'avons vu dans la section 1.2.4c), nous utilisons des fibres scintillantes pour effectuer le monitoring en ligne de l'expérience. Pour valider ce système de contrôle en ligne, nous l'avons tout d'abord calibré à l'aide du détecteur PIPS. Trois tailles de fibres scintillantes différentes sont utilisées expérimentalement : 1 mm (Fibre n°1 et Fibre n°4), 0,5 mm (Fibre n°3) et 0,3 mm (Fibre n°2). Notons que ces tailles sont approximatives ; elles ont été définies « visuellement ». Le but de cette mesure est de connaître les limites de fonctionnement (plage de linéarité) de chaque ensemble [fibre scintillante – fibre optique – PM] en fonction du débit de dose mesuré par le détecteur PIPS.

Nous plaçons le détecteur PIPS dans un boîtier en dural, collimaté par un trou de 1 mm de diamètre. Ce boîtier est positionné à l'identique des échantillons cellulaires, dans le passeur d'échantillon.

La

Figure 29 présente la réponse de chaque fibre pour différents débits de dose mesurés par le détecteur PIPS. Pour chaque point de mesure on effectue 3 comptages. L'acquisition se fait par le programme Labview développé à cet effet (cf. 1.2.5) avec une fibre (ici fibre n°3) en précompte, i.e. qui pilote les irradiations. Pour faire varier le débit de dose, nous avons seulement joué sur l'ouverture des fentes de définition du faisceau (en amont des quadrupôles). Dans ce cas précis, il n'y avait pas de collimateur C1 et le collimateur C2 avait une ouverture de 2 mm, et la fibre n°2 présentait une mauvaise connexion à la fibre optique (c'est pourquoi son taux de comptage ne figure pas sur le graphe).

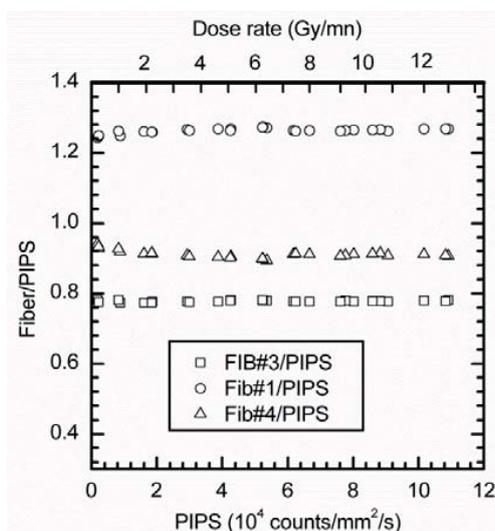


Figure 29 - Courbes de calibration du système de monitoring en ligne. Les triangles représentent le rapport Fibre#4/PIPS. Les carrés représentent Fibre#3/ PIPS et les cercles représentent le rapport Fibre#1/PIPS. Les erreurs statistiques sont de la taille des points. 13300 coups/s dans le PIPS correspond à un débit de dose de 2 Gy/min pour des protons de 3,5 MeV.

D'après ce graphe, on voit qu'il est possible de travailler à faibles débits de dose (< 1 Gy/min) et à débits de dose « conventionnels » utilisés en radiobiologie : [2-10] Gy/min (correspondant à [13300-66500] coups/s dans le PIPS), pour lesquels la réponse du système de monitoring en ligne reste linéaire. Ce qui nous a permis également de définir la surface effective de chaque fibre, présenté dans le

Tableau 8.

	Fibre n°1	Fibre n°2	Fibre n°3 (ici précompte)	Fibre n°4
Taille théorique	1 mm <sup>2</sup>	0,3 mm <sup>2</sup>	0,5 mm <sup>2</sup>	1 mm <sup>2</sup>
Taille effective	1 mm <sup>2</sup>	hors service	0,6 mm <sup>2</sup>	0,7 mm <sup>2</sup>

Tableau 8 - Surface effective des fibres scintillantes.

### (ii) Tests supplémentaires

Nous avons également effectué quelques tests pour valider le programme d'acquisition afin d'être sûrs que les compteurs s'arrêtent en même temps. Mais aussi pour vérifier que la fermeture de l'écran de tantale n'influence pas les comptages. En outre, nous avons également vérifié l'amplitude des signaux des fibres en faisant varier le seuil des discriminateurs.

**Test du programme d'acquisition : Précompte.** Pour une fluence donnée, nous avons augmenté progressivement la valeur du précompte pour voir si ceci pouvait introduire des erreurs statistiques de comptage. Ce qui n'est pas le cas. Néanmoins nous travaillons toujours avec des valeurs de précompte telles que le temps d'irradiation soit d'au moins 8-10 secondes.

**Test des seuils des discriminateurs sur le signal de chaque fibre.** Nous avons choisi le seuil des discriminateurs des fibres de telle sorte que nous obtenions un rapport signal sur bruit supérieur à 100. Pour ce faire nous avons placé le PIPS en précompte pour regarder la distribution des amplitudes du signal des fibres. La

Figure 30 présente le nombre d'impulsions en fonction de l'amplitude (en mV) du signal de la fibre de taille 0,5 mm (généralement utilisée en précompte lors des irradiations cellulaires), ainsi que la distribution du bruit de fond de cette dernière en fonction du seuil du discriminateur.

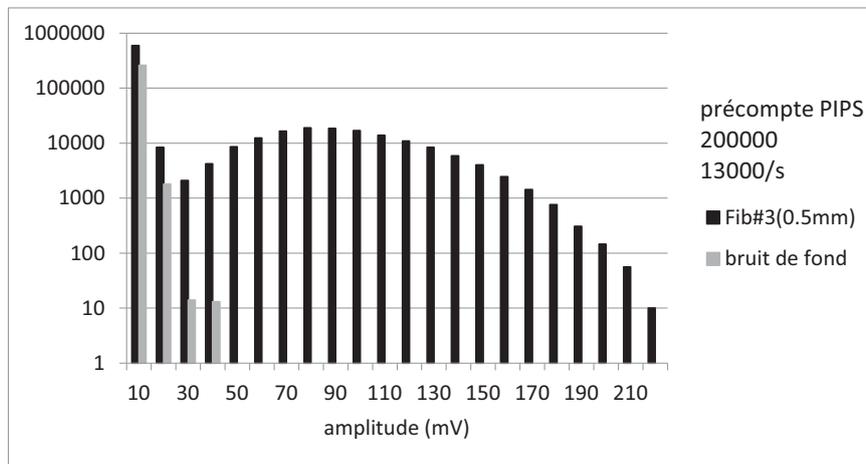


Figure 30 - Distribution des amplitudes des signaux de la fibre 0,5 mm.

Les signaux du bruit de fond du PM ont une amplitude de 10 mV (faible différence entre les impulsions avec ou sans faisceau). On voit également que la majorité des impulsions (avec faisceau) ont une amplitude supérieure à 70 mV, donc en utilisant un seuil des discriminateurs à 20 mV on coupe le bruit de fond sans altérer la qualité de la mesure. En outre, ce système de contrôle par les fibres scintillantes conduit à une mesure relative de la fluence, ce qui implique qu'on pourrait se permettre de travailler avec un peu plus de bruit de fond sans gêner la mesure.

(iii) *Résumé*

Avant chaque irradiation cellulaire, le protocole de dosimétrie suit les étapes suivantes :

- réglage des paramètres machine avec les collimateurs de taille adaptée et les diffuseurs pour obtenir le bon débit de dose en bout de ligne. Notons que d'une expérience à l'autre ces paramètres varient peu.
- contrôle de la dosimétrie à l'aide du détecteur PIPS : nous ajustons le courant machine, l'ouverture des lèvres de définition ou encore la taille des collimateurs pour plus de précision, afin d'obtenir le débit de dose souhaité.
- vérification des rapports des taux de comptage fibre/PIPS : on vérifie qu'il n'y ait pas de problème de connexion [fibre scintillante – fibre optique], de problèmes liés à l'électronique d'acquisition, etc.

Enfin, grâce au système de monitoring, nous sommes capables de contrôler l'irradiation en temps réel. Notons que 13300 coups/s dans le PIPS (collimaté ; surface de 0,78 mm<sup>2</sup>) correspond à un débit de dose de 2 Gy/min pour des protons accélérés à 3,5 MeV. En outre, pendant les irradiations nous connectons une sortie de la fibre de précompte sur les échelles, ce qui nous permet un contrôle rapide (visuel) des irradiations, en plus de la mesure précise donnée par le programme d'acquisition.

#### b) Protocole de mesure en énergie

Le spectre en énergie des protons dans l'air est mesuré en plaçant le détecteur PIPS à la position des échantillons cellulaires (reculé de 2 mm à cause du collimateur). Le flux de protons a été limité à 1000 protons.mm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (environ) afin d'éviter l'accumulation d'impulsions dans le préamplificateur. Le PIPS est polarisé à +75 V afin d'avoir une zone de déplétion maximale et donc de collecter toutes les charges. La mise en forme des impulsions en sortie de l'amplificateur est de 0,250 µs avec un gain de 200. L'étalonnage en énergie de la chaîne d'acquisition a été réalisé en utilisant une source de <sup>248</sup>Pu émettrice α. L'enregistrement des spectres se fait à l'aide du logiciel MAESTRO (ORTEC, **multichannel analyzer**).

#### c) Protocole de mesure de la distribution spatiale des ions

Pour mesurer la distribution spatiale des ions sur toute la largeur de la fenêtre d'extraction, et donc sur la surface d'irradiation de l'échantillon, nous avons procédé à un scan horizontal (profil en x) à l'aide du PIPS collimaté par un trou de 1 mm de diamètre (même support que pour la calibration).

**Méthode de détection.** Nous avons placé le PIPS dans son support sur un bord de la fenêtre d'extraction. Nous avons effectué un balayage latéral par pas de 1 mm devant la fenêtre de Mylar (25 mm de diamètre). Pour chaque position, nous avons mesuré le nombre de protons normalisé à la valeur du précompte (données brutes). Le précompte est défini par la fibre scintillante de 1 mm (pour cette mesure) et est fixé à 100000.

**Configuration.** Nous avons fixé l'ouverture des lèvres de définition à 1,6 mm avec un courant machine de 21 nA (environ). Nous avons placé le collimateur C1 (2 mm de diamètre), le diffuseur D1 (3600 Å), le collimateur C2 (2 mm de diamètre) et le diffuseur D2 (1,99 µm), ce qui correspond à 27500 protons/s (en moyenne) sur la surface du PIPS.

d) GATE v6.1 : simulations

Afin de comparer le résultat expérimental à la simulation, concernant la distribution spatiale des protons sur la zone d'irradiation, nous avons défini une géométrie proche de celle de la ligne de faisceau (les tubes en aluminium, les diffuseurs d'or, C2 = 3mm de diamètre et la fenêtre en Mylar). Le faisceau incident sur la première feuille a été choisi ponctuel (donc pas de C1) et mono-énergétique (3,5 MeV). Le détecteur a été simulé par une matrice en silicium (3 cm × 3 cm) avec un binning de 1 mm<sup>2</sup>, placé dans l'air à une distance de 2 cm de la fenêtre d'extraction, pour simuler l'espace d'air dû à la courbure de la feuille de Mylar (différence de pression), le millimètre d'air dû au collimateur placé devant de cristal de silicium, etc. La résolution en énergie du détecteur PIPS est prise en compte par convolution de l'énergie absorbée avec celle simulée. Le calcul a été effectué pour un nombre initial de protons  $I_0 = 6.10^9$ .

### 1.3.2 Résultats

a) Mesure en énergie

La Figure 31 montre le spectre en énergie mesuré dans l'air pour des protons dont l'énergie initiale est  $E_0 = 3,5$  MeV. On peut noter que le faisceau de protons extrait est très bien défini en énergie et ne contient pas de protons de basse énergie. Ceci, grâce à la double diffusion permettant d'éliminer les protons de basse énergie (rebonds) qui pourraient subsister s'il n'y avait qu'un seul diffuseur.

L'énergie mesurée des protons à la sortie de la fenêtre est de  $2,864 \pm 0,008$  MeV avec une largeur à mi-hauteur de  $58 \pm 2$  keV. La largeur du pic est plus élevée que celle de la résolution en énergie du détecteur (13 keV, mesurée à l'aide d'une source alpha sous vide). Ce phénomène s'explique par le ralentissement des protons, dans les diffuseurs d'or et dans le Mylar de la fenêtre d'extraction, qui induit une dispersion en énergie. Aucune variation dans le spectre en énergie n'a été observée en déplaçant le détecteur dans la zone d'irradiation (surface de la fenêtre).

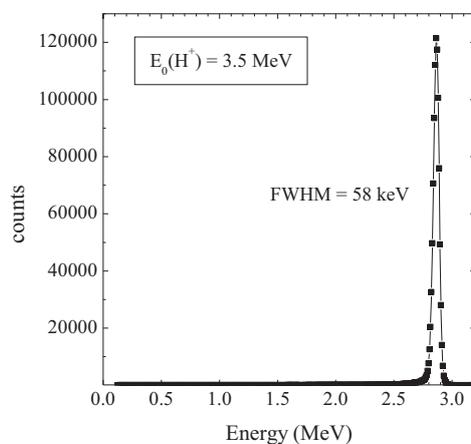


Figure 31 - Spectre en énergie des protons extraits à l'air mesuré par le détecteur PIPS préalablement étalonné.

Cette distribution en énergie a également été calculée, à partir de simulations SRIM et GATE, en tenant compte de la résolution en énergie du détecteur PIPS. Une comparaison des valeurs de l'énergie mesurée et calculée est présentée dans le

Tableau 9. Les valeurs calculées de l'énergie des protons et la largeur à mi-hauteur sont en bon accord avec les valeurs expérimentales. L'incertitude sur les valeurs calculées tient compte de l'incertitude sur l'épaisseur des feuilles (20% pour la fenêtre de Mylar et 10% pour les feuilles d'or) et de la précision de  $\pm 5\%$  sur le pouvoir d'arrêt des protons (SRIM 2011 program by J.F. Ziegler and J.P. Biersack, <http://www.srim.org>).

	Energie des protons à l'air	FWHM
Expérience	$(2.864 \pm 0.008)$ MeV	$(58 \pm 2)$ keV
SRIM	$(2.902 \pm 0.084)$ MeV	$(58.8 \pm 5)$ keV
GATE	$(2.923 \pm 0.083)$ MeV	$(57.6 \pm 4)$ keV

Tableau 9 - Energie des protons mesurée par le PIPS dans l'air comparée aux valeurs des énergies simulées par SRIM et GATE.

b) Qualification de la dosimétrie

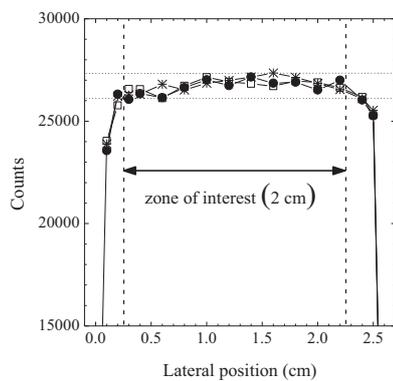
(i) *Mesure de l'hétérogénéité de la distribution spatiale de la Fluence*

Les résultats suivants montrent la distribution de la fluence (proportionnelle à la dose) sur toute la largeur de la fenêtre. Le profil de la distribution spatiale des protons a été mesuré à l'aide du détecteur PIPS (balayage horizontal), comme le montre la Figure 32 a. La variation du nombre de protons détectés est de  $\pm 2\%$  sur un diamètre 20

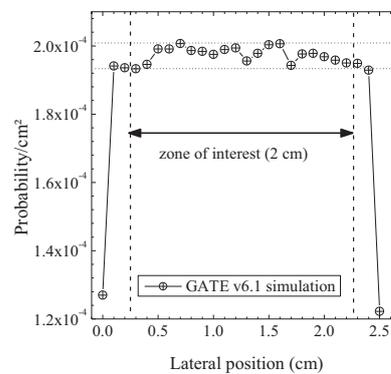
mm, qui correspond au diamètre des boîtes conçues pour irradier les échantillons cellulaires (cf. chapitre 3, section 3.2.1).

Ce profil peut être comparé à la simulation GATE. La Figure 32 b montre la distribution de probabilité du nombre de protons par  $\text{cm}^2$  par rapport à la position sur l'axe X horizontal pour une coupe de 1 mm de large sur l'axe Y (centre du faisceau), c'est à dire le nombre d'événements sur chaque bin (multiplié par un facteur 100 pour convertir les  $\text{mm}^2$  en  $\text{cm}^2$ ) normalisé au nombre initial de protons ( $I_0$ ) par  $\text{cm}^2$ .

On obtient donc le profil simulé de la distribution spatiale du faisceau diffusé qui montre une fluence uniforme à  $\pm 3,5\%$ . Il y a donc un bon accord entre le profil simulé et le profil mesuré.



a.



b.

**Figure 32 - a. Mesure de la distribution spatiale des ions extraits à l'air. Les barres d'erreur dues à la statistique sont de la taille des points. b. Simulation de la distribution spatiale.**

Nous avons irradié un film gafchromique HD-810 avec une fluence égale à  $2,5 \cdot 10^6$  protons/ $\text{cm}^2$  (correspondant à 3 Gy) et un flux de  $8,5 \cdot 10^5$  protons/ $\text{cm}^2/\text{s}$  (ce qui correspond à 1 Gy/min) pour un contrôle rapide de l'homogénéité du faisceau. Dans un deuxième temps nous avons estimé la distribution spatiale de la fluence en analysant le film grâce au numériseur Vidar (VXR-12) du Centre Léon Bérard. Il s'agit d'un densitomètre basé sur la transmission de l'intensité lumineuse incidente à travers le film et sur la conversion de cette grandeur analogique en valeur numérique (codage sur 12 bits). Nous sélectionnons une région d'intérêt. La densité optique moyenne de la sélection est calculée et la valeur de l'intensité (u.a.) correspondante lui est associée. À partir de cette étape le logiciel RIT 113 (associé au numériseur Vidar) peut calculer les profils (x, y) de fluence (ici sous forme de valeur d'intensité car nous n'avons pas calibré le système de numérisation) pour contrôler l'homogénéité du champ d'irradiation (Jalade 2005). La Figure 33 montre la superposition de l'image d'un film gafchromique (HD-810) irradié par des protons (accélérés à 3,5 MeV pour une dose de 3 Gy avec un débit de dose de 1 Gy / min) et du résultat du profil scanné en x. Le résultat montre un profil de dose uniforme à  $\pm 1\%$ , en corrélation avec la mesure du PIPS (cf. Figure 32 a.).

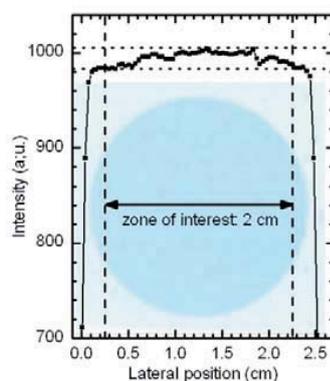


Figure 33 – Superposition de l'image d'un film Gafchromic (HD-810) irradié par des protons accélérés à 3,5 MeV pour une dose de 3 Gy avec un débit de dose de 1 Gy / min et du résultat du profil scanné en x.

(ii) *Estimation des incertitudes sur la dose*

Il y a différentes sources d'erreurs concernant la dose délivrée aux échantillons cellulaires.

En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, la dose dépend du TEL et de la Fluence. Nous avons trouvé une incertitude sur l'homogénéité de la fluence de  $\pm 2\%$ . En revanche, la valeur absolue de la fluence est mesurée par le détecteur PIPS qui est collimaté par un trou de  $(1 \pm 0,01)$  mm de diamètre. Cette incertitude sur le diamètre du collimateur, introduit  $\pm 2\%$  d'erreur sur le comptage des particules. Concernant le TEL des protons, nous prenons la valeur simulée par SRIM pour une énergie de 2,86 MeV, qui est égale à  $12,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$  (qui représente le TEL à l'entrée des cellules) avec une incertitude estimée à  $\pm 5\%$ .

Ces sources d'erreurs ne vont pas forcément dans le même sens mais elles ne sont pas non plus stochastiques. Chaque contribution apparait comme un facteur, impliquant que l'incertitude relative sur la dose est égale à la somme des incertitudes relative, soit :

$$\frac{\Delta D}{D} = \frac{\Delta \text{Fluence}}{\text{Fluence}} + \frac{\Delta \text{PIPS}}{\text{PIPS}} + \frac{\Delta \text{TEL}}{\text{TEL}} = \pm 9\%$$

Dans la réalité, on espère que cette erreur est moins importante, mais par rigueur nous préférons la maximiser.

c) *Résumé*

La plateforme Radiograaff est composée d'une ligne de faisceau horizontale à la sortie du système de transport de faisceau. Pour se placer dans des conditions stables pour l'accélérateur, nous avons choisi de travailler avec un faisceau dont le courant est

## Développements instrumentaux de la ligne Radiograaff : de la conception à la qualification

de l'ordre de 10-60 nA. L'intensité du faisceau peut être réduite grâce à des éléments placés sur sa trajectoire, dans la ligne d'irradiation, afin d'obtenir le débit de dose souhaité. Une vue schématique de l'installation Radiograaff est présentée par la Figure 34.

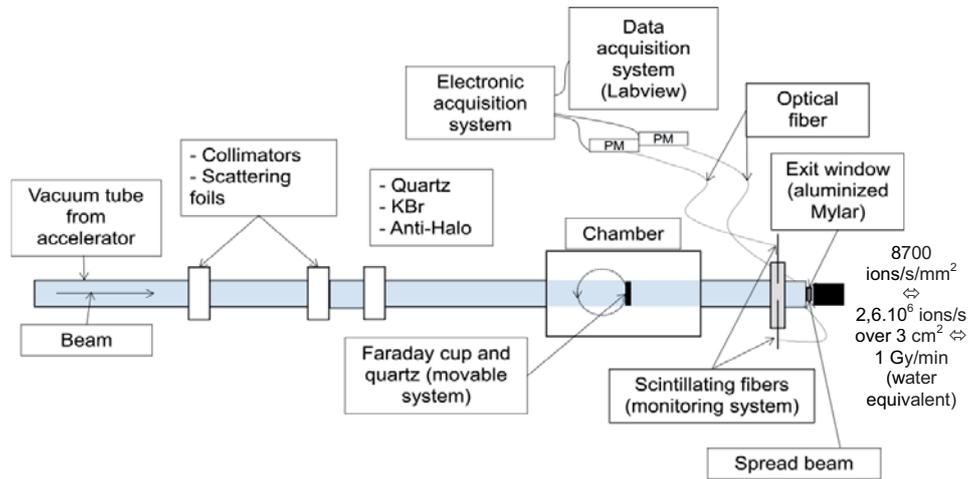


Figure 34 : Schéma complet de la ligne d'irradiation Radiograaff.

En résumé, à l'entrée de la ligne de faisceau sont placés : un collimateur de diamètre variable (1-3 mm) et un diffuseur d'or de 0,36  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. 60 cm plus loin, se trouve une deuxième série de collimateurs (0,5-2 mm) et diffuseur d'or de 1,99  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. De cette manière, l'intensité du faisceau est réduite, car une grande partie des protons sont coupés par le second collimateur et le faisceau est homogène en bout de ligne grâce au deuxième diffuseur. Les protons sont extraits à l'air à travers une fenêtre de sortie de 12  $\mu\text{m}$  de Mylar aluminisé et de 25 mm de diamètre, qui est située à une distance de 115 cm de la deuxième feuille d'or. Avant l'extraction du faisceau, les protons traversent une chambre à vide, où une cage de Faraday escamotable peut être utilisée pour mesurer l'intensité initiale du faisceau de protons (c'est-à-dire, avant diffusion). À l'entrée de cette chambre sont placés : un collimateur anti-halo de 20 mm de diamètre, pour éviter d'éventuels protons dûs à des rebonds dans le tube, qui viendraient contribuer à du bruit de fond pour le système de monitoring en ligne, et un quartz escamotable qui permet de visualiser le faisceau initial et ainsi de contrôler la position des différents collimateurs qui définissent sa trajectoire. Pour finir, le système de contrôle en ligne est placé entre la chambre à vide et la fenêtre d'extraction. Nous avons vu que ce système est valide pour toutes les gammes de débits de dose utilisés en radiobiologie. Une fibre scintillante est dédiée au pilotage des irradiations (ouverture et fermeture de l'écran de tantale et stoppe le comptage des autres détecteurs) via un programme d'acquisition automatisé Labview. Nous avons également mis en place un système de passeur d'échantillons automatisé et une enceinte thermostatée en bout de ligne, qui seront plus longuement développés dans le chapitre suivant.



## 3

## Développements techniques et expérimentaux pour la plateforme Radiograaff et premiers résultats de radiobiologie

<b>3 Développements techniques et expérimentaux pour la plateforme Radiograaff et premiers résultats de radiobiologie.....</b>	<b>89</b>
<b>3.1 Introduction .....</b>	<b>89</b>
<b>3.2 Développements spécifiques pour la radiobiologie cellulaire.....</b>	<b>90</b>
3.2.1 Mise au point de protocoles biologiques dédiés à la plateforme Radiograaff	90
3.2.2 Passeur d'échantillons automatisé.....	92
3.2.3 Enceinte thermostatée et atmosphère contrôlée.....	93
3.2.4 Laboratoire de biologie cellulaire .....	94
<b>3.3 Etudes d'irradiations cellulaires sur la plateforme Radiograaff.....</b>	<b>96</b>
3.3.1 Rappels sur les principaux mécanismes en radiobiologie.....	96
3.3.2 Choix des observables biologiques.....	106
3.3.3 Choix des lignées tumorales humaines .....	109
3.3.4 Matériel et méthode.....	109
3.3.5 Culture cellulaire et irradiation .....	109
3.3.6 Protocole de réalisation de courbe de survie .....	110
3.3.7 Immunodétection de dommages à l'ADN : analyse par microscopie .....	110
<b>3.4 Résultats des études de radiobiologie .....</b>	<b>111</b>
3.4.1 Détermination de la survie clonogénique.....	111
3.4.2 Cinétique du nombre de foci par noyau .....	114
<b>3.5 Poursuite des études sur les dommages à l'ADN : vers une automatisation de l'analyse.....</b>	<b>117</b>
3.5.1 Utilisation d'un microscope confocal .....	117
3.5.2 Développement d'une macro d'analyse : cahier des charges .....	120
3.5.3 Développement d'une macro d'analyse : principe général.....	121
3.5.4 Exemple d'un protocole.....	123
3.5.5 Illustration d'un comptage par la macro.....	124
3.5.6 Résultat du comptage du nombre de foci par noyau par la macro 5.0 sur la lignée SQ20B après irradiation protons.....	125



# 3

## Développements techniques et expérimentaux pour la plateforme Radiograaff et premiers résultats de radiobiologie

### 3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, nous avons développé une plateforme d'irradiation, grâce à laquelle nous pouvons mener à bien des études en radiobiologie. Le chapitre précédent s'est focalisé sur la partie instrumentation qui a permis d'obtenir les caractéristiques suivantes : une surface d'irradiation des échantillons de 3 cm<sup>2</sup>, c'est à dire suffisamment grande pour irradier un nombre assez important de cellules pour certaines expériences, un contrôle en fluence à  $\pm 2\%$  incluant les fluctuations des détecteurs et les hétérogénéités spatiales, un programme de pilotage de l'irradiation facilitant la reproductibilité et le contrôle en ligne de l'expérience.

À ce volet physique et instrumentation ont été associés des développements portant sur la radiobiologie, que j'ai pu prendre en charge avec l'aide précieuse des biologistes du laboratoire de radiobiologie Cellulaire et Moléculaires de l'hôpital Lyon Sud, des services techniques de l'IPNL et du support financier de l'IN2P3 via le GdR MI2B. Les financements de la Région Rhône-Alpes via le programme régional de recherche en hadronthérapie et l'aide des différents services techniques de l'IPNL ont permis la création d'un laboratoire de biologie cellulaire dans nos locaux. Enfin, j'ai pu bénéficier d'une collaboration avec les chercheurs du Centre Commun de Quantimétrie de Grange Blanche et du Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand, qui a permis l'avancement des travaux sur l'aspect analyse de résultats de la réponse cellulaire aux irradiations protons.

Pour évaluer l'efficacité biologique des protons de moyenne énergie, nous avons effectué deux types d'expériences : la mesure de la survie clonogénique ainsi que l'étude de la cinétique de formation des cassures double-brins de l'ADN.

Pour ce faire, nous avons irradié deux lignées cellulaires des voies aérodigestives supérieures de radio-sensibilités graduelles : la lignée SCC61 (radiosensible) et la lignée SQ20B (radiatorésistante) (Head and Neck Squamous Carcinoma Cells - HNSCC). Ces deux lignées ont précédemment été étudiées puisque nous avons déjà obtenu un ensemble de données en les irradiant au GANIL (Caen, France) et au GSI (Allemagne) avec des ions carbone de 9,8 MeV/u et 72 MeV/u et des ions argon de 88 MeV/u (M. Maalouf et al. 2009; Alphonse et al. 2002).

Ce chapitre est organisé de la manière suivante. La première partie traite des développements techniques associés à la plateforme et dédiés à la biologie. Dans une seconde partie, nous présentons des rappels sur les principaux mécanismes en radiobiologie. Nous présentons le matériel et la méthode de culture cellulaire et d'irradiation, mais également les traitements et méthodes d'analyse, associés à nos deux sujets d'étude. Enfin, dans une troisième partie, nous présentons les résultats préliminaires de la survie cellulaire ainsi les courbes du nombre de dommages à l'ADN par noyau cellulaire après irradiation avec des protons de 2,9 MeV.

## 3.2 Développements spécifiques pour la radiobiologie cellulaire

### 3.2.1 Mise au point de protocoles biologiques dédiés à la plateforme Radiograaff

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 section 1.2.3(iii), les contraintes physiques associées aux irradiations avec des protons de quelques MeV restreignent le type de support pour irradier des cellules. Comme la pénétration des protons de 3,5 MeV est de 150  $\mu\text{m}$  dans l'eau, il est évident que la plupart des boîtes de Petri communément utilisées pour faire des expériences en radiobiologie (comme par exemple les « Flasks » en plastique dont l'épaisseur est de 1mm) sont inadaptées ici. Le compromis entre tenue mécanique et faible épaisseur de la fenêtre d'extraction dans l'air oblige à travailler avec un champ d'irradiation de forme circulaire et de diamètre restreint par rapport au standard d'irradiation X.

Nous avons cherché différentes solutions de support pour répondre aux conditions d'irradiation (taille et énergie du faisceau extrait) ainsi qu'au respect des conditions expérimentales imposées par la biologie (adhérence des cellules, maintien de conditions stériles, etc.). Dans cette section nous verrons trois protocoles que nous avons testés : « boîte de pétri », « labtek » et « 24 puits ».

**Protocole « boîte de pétri ».** Comme nous l'avons plusieurs fois exposé, nous devons assurer de bonnes conditions environnementales pour les échantillons biologiques avec une perte minimale d'énergie des protons avant l'impact sur les cellules. C'est pourquoi, après deux essais, nous avons conçu le support suivant avec l'aide du service mécanique de l'IPNL : le fond de la boîte de Pétri est constitué d'une feuille de mylar de 13  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, pincée entre deux anneaux en plastique comme le montre la

Figure 35. La culture cellulaire se fait de manière monocouche sur le mylar, puis l'irradiation a lieu à travers la feuille de mylar.

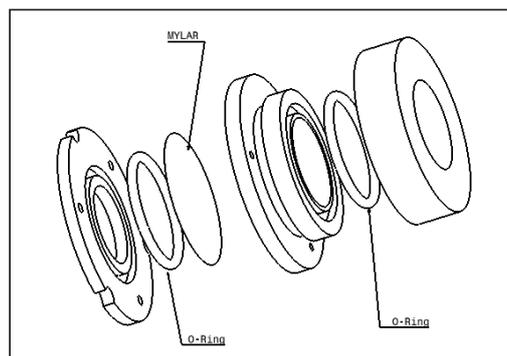


Figure 35 - Schéma de la conception des boîtes de culture cellulaire dédiées à la plateforme Radiograaff, réalisées à l'IPNL.

Nous avons rencontré de nombreuses difficultés avec ce type de support. Cependant les premières expériences ont bien fonctionné avec le « protocole 1 », que l'on peut résumer en :

- monter la boîte de Petri avec le mylar et les anneaux préalablement stérilisés à l'étuve,
- effectuer un simple lavage à l'éthanol (sans stériliser) avec des anneaux en aluminium (avant d'ensemencer les cellules),
- ajouter de la polylysine sur le mylar pour permettre l'adhérence des cellules au mylar,
- ensemencer les cellules.

Après plusieurs utilisations, l'apparition de sels d'aluminium a contaminé nos puits. En résumé, quand les anneaux sont neufs, il n'y a aucun problème, mais dès que nous avons effectué plusieurs lavages et ensemencements, nous n'arrivons plus à obtenir des puits suffisamment propres.

Nous avons donc fait usiner de nouveaux anneaux en plastique (PET) résistants aux rayonnements et à la chaleur (tests préliminaires avant la fabrication). Nous avons alors mis en place le « protocole 2 » :

- monter les nouvelles boîtes de Petri avec le mylar,
- irradier les boîtes sous rayons X permettant la stérilisation parfaite des supports,
- ajouter de la polylysine sur le mylar sous hotte pour permettre l'adhérence des cellules au mylar,
- ensemencer les cellules.

À ce jour, nous n'avons pas encore réussi à faire adhérer certains types de cellules sur le mylar, même avec des produits permettant une fixation plus forte (utilisation du Cell Tack à la place de la polylysine). Ce protocole pourtant intéressant doit encore être amélioré.

**Protocole « labtek ».** Dans le but d'évaluer l'efficacité biologique des protons délivrés par la plateforme Radiograaff, nous avons opté pour une solution qui fonctionne même si les conditions expérimentales pour la biologie ne sont pas les meilleures : irradiation des cellules à l'air dans des Labteks à 2 puits.

Les labteks sont des chambres de culture à 1, 2, 4 ou 8 compartiments fixés sur une lame de microscopie 26 x 76 mm, munie d'un couvercle. Ces chambres sont stérilisées aux rayons gamma. La culture s'effectue dans les compartiments. Le protocole d'irradiation mis en place est le suivant :

- ensemencer les cellules sous hotte,
- sortir un support « labteks » de l'incubateur juste avant irradiation,
- aspirer le milieu de culture (porter un masque, des gants et ne pas parler),
- irradier,
- remettre du milieu de culture dans les compartiments (porter un masque, des gants et ne pas parler) et replacer dans l'incubateur.

Pour les études de microscopie, il suffit ensuite de détacher la chambre de la lame sur laquelle on pourra déposer une lamelle pour permettre la visualisation des cellules.

Les risques de contamination sont plus élevés que dans la solution précédente, mais nous avons réussi à faire des expériences successives sans contamination des cultures après irradiation.

**Protocole « 24 puits ».** Nous avons testé un nouveau support commercialisé par Zell-kontakt : des plaques 24 puits (

Figure 36). Chaque puits a un diamètre de 15 mm et un volume de 37,5 cm<sup>3</sup>. Le fond est une feuille mince (25 µm d'épaisseur) de chlorotrifluoroéthylène (PTCFE, dérivé du Téflon,  $d = 2,09 \text{ g/cm}^3$ ). La perte d'énergie des protons de 3 MeV dans ce support est de 492,5 keV (simulation SRIM). Ce support est recommandé pour la microscopie (indice de réfraction de 1,34). De plus, il est très facile de découper la feuille de PTCFE du support pour la monter sur une lame afin de faire des études en microscopie. Toutes ces propriétés permettent donc d'irradier les cellules à travers le PTCFE dans de bonnes conditions. Nous fermons la partie opposée (film adhésif stérile à la place du couvercle) afin de conserver le milieu de culture tout au long de l'irradiation. Enfin, la trypsine fonctionne très bien, les lignées cellulaires avec lesquelles nous travaillons se décolent très facilement de ce film plastique.

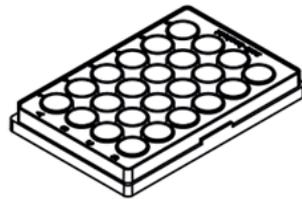


Figure 36 - Schéma technique de la plaque 24 puits (Imaging Plate 24, Zell Kontakt).

À l'heure actuelle, nous avons testé ce support pour valider son utilisation pour des études de survie cellulaire (la trypsine fonctionne) ainsi que pour valider son utilisation en microscopie (marquage fluorescent, montage des feuilles de chlorotrifluoroéthylène sur des lames et visualisation par microscopie confocale). L'entreprise n'est temporairement plus en mesure de fournir ces boîtes (audit) c'est pourquoi nous ne sommes pas allés plus loin. Pour utiliser à l'avenir ce type de support et pour que la distribution spatiale des ions soit toujours à  $\pm 2\%$  sur toute la surface (sans irradiation des puits voisins), nous devons modifier le diamètre de la fenêtre d'extraction et adapter le passeur d'échantillon.

### 3.2.2 Passeur d'échantillons automatisé

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 section 1.2.4c), nous avons mis au point un programme de pilotage de l'expérience (fermeture de l'écran de tantale, etc.) et de la translation du passeur d'échantillon (

Figure 37) spécialement conçu pour chaque support d'irradiation cellulaire.



Figure 37 - Passeur d'échantillons automatisé à l'aide de platines motorisées (X,Y). Sur cette photographie, il supporte le porte-échantillon spécifique aux boîtes de Petri.

Actuellement nous avons deux types de supports : un porte-échantillon pour les « boîtes de pétri » et pour les « Labtek » (le porte-échantillon « 24 puits » est en développement). Les platines (X, Y) permettent le déplacement du porte-échantillon sur 200 mm (course maximale) avec une vitesse de déplacement de 20 mm/s. La précision du pas en X et Y est meilleure que 1  $\mu\text{m}$ . Le centre de la fenêtre d'extraction est repéré (à l'aide d'une croix) et le centre de la boîte de culture cellulaire est repéré sur le porte échantillon. L'alignement de la boîte au centre du faisceau se fait par concordance des deux repères. La précision globale sur le positionnement des échantillons est alors inférieure au millimètre.

### 3.2.3 Enceinte thermostatée et atmosphère contrôlée

Une enceinte autour de la fenêtre d'extraction a été mise en place pour permettre la régulation de la température (37°C) durant les irradiations grâce à une résistance chauffante (0-70°C). Avant chaque irradiation, l'enceinte est nettoyée avec un détergeant (anios) et un antiseptique utilisé pour désinfecter les hottes à flux laminaire. Les boîtes de culture cellulaires sont donc maintenues dans un environnement propice au bon déroulement des expériences et nous réussissons ainsi à éviter toute contamination. En outre, cette enceinte est modifiable pour accueillir un système de

régulation en gaz : CO<sub>2</sub> à 5% (pour améliorer les conditions de culture), azote (pour travailler en hypoxie), etc. La photographie (

Figure 38) présente le système vu de face.



**Figure 38 - Enceinte thermostatée (plateforme Radiograaff).**

### 3.2.4 Laboratoire de biologie cellulaire

Cette section présente le laboratoire de biologie cellulaire développé à l'IPNL. Nous décrivons le matériel qui l'équipe. Des photographies du local (aménagement préliminaire) sont présentées par la

Figure 39.

Les besoins en matériel pour équiper un laboratoire de biologie cellulaire sont les suivants :

- Poste de Sécurité Microbiologique – PSM (hotte à flux laminaire – évite la contamination des cellules lors de leur manipulation),
- hotte chimique (manipulation de solvants),
- incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub> pour la culture cellulaire en condition normale),
- centrifugeuse (permet la séparation de produits (milieu, cellules, particules, etc.) en fonction de la densité),
- microscope optique (observer les cellules, mais aussi, évolutif pour nous permettre de le coupler à un microscope AFM),

- pompe à vide (pour aspirer le milieu de culture dans les puits de culture cellulaire par exemple),
- bain Marie,
- vortex (permet de mélanger les solutions, notamment les microtubes),
- congélateur (-80°C),
- réfrigérateur,
- machine à glace,
- compteur de cellules

Tout cet équipement est indispensable pour effectuer des expériences de survie clonogénique, de cytométrie, de marquage fluorescent, etc.

Par ailleurs grâce à un sas, un protocole d'entrée/sortie (avec sur-chaussures) et un dispositif de traitement d'air (surpression et filtration), les risques de contamination biologique seront réduits.



Figure 39 : Aménagement du Laboratoire de biologie cellulaire de l'IPNL.

## 3.3 Etudes d'irradiations cellulaires sur la plateforme Radiograaff

### 3.3.1 Rappels sur les principaux mécanismes en radiobiologie

Parmi les macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipides et sucres) qui constituent une cellule, les molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) jouent un rôle central dans le fonctionnement de la cellule en tant que vecteur de ses propriétés génétiques. L'ADN est porteur de l'information génétique apparue, élaborée et conservée au cours de l'évolution.

En l'absence de toute agression externe, l'ADN des cellules est altéré par les radicaux libres formés au cours du métabolisme normal de l'oxygène principalement par la mitochondrie (Tubiana et al. 2008). Il s'agit de lésions simples de type modifications de bases et de sucres, des cassures simple brin (CSB) et plus rarement des cassures double brin (CDB). Les cellules ont acquis au cours de l'évolution la capacité de faire face aux risques génotoxiques associés à leur métabolisme et aux conditions normales de l'environnement. En effet, l'environnement, qui comporte naturellement des rayonnements ionisants et le métabolisme cellulaire peuvent conduire à des lésions de l'ADN. Pour les rayonnements, on parle alors de très faibles doses (dose annuelle de rayonnements  $\leq 20$  mSv). En revanche, une irradiation engendre davantage de lésions complexes. En particulier ces types de lésions peuvent être dus à une exposition à une irradiation thérapeutique ou accidentelle, avec une distribution spatiale plus concentrée en fonction de la dose et du débit de dose. Notons que les effets des irradiations dépendent notamment du type cellulaire, de la quantité d'ADN (phase du cycle cellulaire), du degré d'oxygénation, du pH, de la teneur en glutathions et autres thiols, etc.

Les organismes vivants ont mis au point des mécanismes de réparation en raison de l'importance de l'intégrité du message génétique et de la fréquence des dommages induits au niveau du génome. Ces mécanismes sont relatifs aux nombreuses agressions provenant du métabolisme endogène et de l'environnement. La réparation de nombreux types de lésions est fonction d'une certaine spécificité des processus de reconnaissance. L'importance des systèmes de signalisation, par conséquent une bonne réparation des dommages à l'ADN, est mise en évidence par le fait que des défauts de fonctionnement peuvent conduire à différents processus : la mort de la cellule, des anomalies de développement, la dégénérescence de tissus et d'organes, le vieillissement précoce ou des instabilités génomiques. Enfin, l'irradiation génère un large spectre de lésions chromosomiques (Tubiana et al. 2008).

Dans cette section, nous allons faire quelques rappels sur la structure de l'ADN, ainsi que sur les principes généraux de la régulation du cycle cellulaire. Ensuite, nous

verrons les différents types de lésions de l'ADN. Nous aborderons, en outre, les systèmes de réparation de l'ADN et l'état de la chromatine. Pour finir, nous verrons les différents types de mort cellulaire radio-induite.

#### a) La structure de l'ADN

La molécule d'ADN est constituée de deux chaînes ou brins complémentaires qui sont unis entre eux par des liaisons hydrogène entre les bases des deux brins. Un brin d'ADN est un polymère formé par l'association de nucléotides (cf.

Figure 40) assemblés entre eux par l'intermédiaire de liaisons covalentes qui joignent le sucre à l'acide phosphorique.

Un nucléotide comporte :

- Une base purique [Adénine (A) ou Guanine (G)] ou pyrimidique [Cytosine (C) ou Thymine (T)],
- Un sucre (le désoxyribose), qui est lié à la base en question,
- Un acide phosphorique lié au sucre (permet la liaison des bases entre elles).

Les bases s'associent de façon complémentaire, ainsi, en face d'une thymine sur une chaîne se trouve une adénine sur l'autre, de même qu'en face d'une guanine se trouve une cytosine.

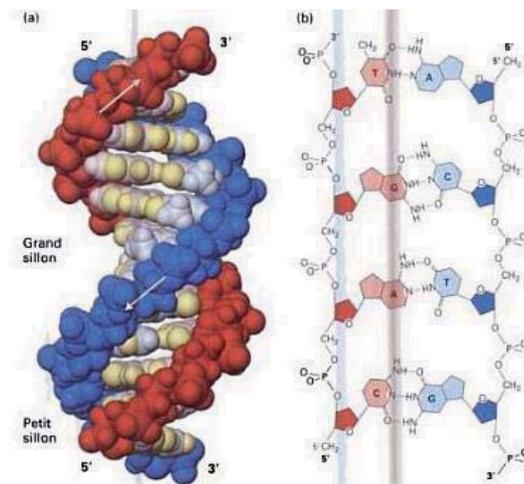


Figure 40 – La double hélice d'ADN.[Lodish, H. et al., *Biologie moléculaire de la cellule*, De Boeck Supérieur.]

#### b) Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des réactions métaboliques, interdépendantes et synchronisées, qui aboutissent à la duplication des chromosomes et à la division cellulaire. Il est constitué de quatre phases (cf.

Figure 41) :

1. La phase G<sub>1</sub> (Gap 1), phase de croissance et d'accumulation de réserves faisant suite à la mitose ou à la sortie de quiescence (G<sub>0</sub>) sous l'effet de stimulations mitogènes ;
2. La phase S (synthèse), dans laquelle la cellule duplique la totalité de son génome ;
3. La phase G<sub>2</sub> (Gap 2), contrôle l'intégrité du génome avant le passage en mitose ;
4. La phase M (mitose), qui mène à la condensation et à la ségrégation des chromosomes sur le fuseau mitotique, et s'achève avec la libération de deux cellules-filles.

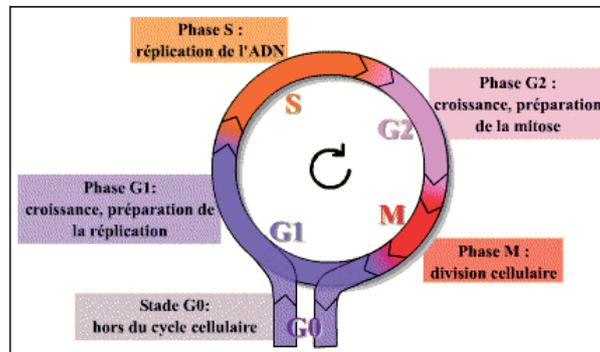


Figure 41 - Les quatre phases du cycle cellulaire et le stade G<sub>0</sub>.

Chaque étape est étroitement liée à l'exécution de celle qui la précède. Les cellules eucaryotes ont développé, à cet effet, un mécanisme doté de nombreux points de contrôle (*checkpoints*) où les cellules sont « analysées ». C'est le cas, par exemple, après une irradiation. On y trouve des senseurs communs à la signalisation des lésions de l'ADN et à l'induction de la mort cellulaire. En effet, si le mécanisme de régulation du cycle cellulaire fonctionne bien, alors une cellule ayant des dommages irréparables ne passera pas les checkpoints et ne se retrouvera pas dans le cycle suivant.

c) Les lésions induites à l'ADN par les rayonnements

Quelle que soit la nature du rayonnement, l'interaction avec le milieu biologique peut conduire à une **lésion directe** de la molécule d'ADN. En effet, les atomes de cette molécule peuvent directement être ionisés ou excités, initiant ainsi une cascade d'évènements conduisant à un effet biologique. Cependant, les rayonnements interagissent également avec tous les autres atomes et molécules présents dans les cellules. Les interactions des rayonnements sur les molécules d'eau, principal constituant cellulaire, conduisent à la production de radicaux libres oxygénés particulièrement agressifs pour la molécule d'ADN. On parlera alors **d'effets indirects**

des rayonnements ionisants. Dans cette section, nous allons nous intéresser aux types de lésions que peuvent subir les cellules. Nous détaillerons seulement les dommages à l'ADN, qui semble être la cible ayant le plus d'impact sur le devenir de la cellule après irradiation. Un schéma qui résume ce qui va suivre est présenté par la

Figure 42.

(i) *Cassures simple-brin (CSB)*

Les cassures simple-brin résultent, soit d'un effet direct des rayonnements X, soit de l'attaque des radicaux et notamment des radicaux HO° (formés lors de la radiolyse de l'eau) qui entraînent la rupture des liaisons phosphate-sucre suite à l'attaque d'un atome d'hydrogène de la molécule de 2-désoxyribose par le radical.

Le taux de formation des cassures simple-brin varie linéairement en fonction de la dose et est plus faible lorsque le TEL du rayonnement augmente (Tubiana et al. 2008 ; Olive 1998). En effet, nous avons vu dans le chapitre 1 section 1.2.1, que les rayonnements de haut TEL ont pour conséquence des dommages complexes au niveau cellulaire résultant de l'effet « cœur de trace ». Donc des particules de haut TEL vont former un nombre important de dommages très localisés, ce qu'on qualifie généralement de cassures double-brin (deux cassures simple-brin très proches) ou de dommages multiples localisés. Ces types de lésions seront présentés dans la suite de cette section.

Les CSB sont relativement vite réparées (en moins d'une heure) et ont peu d'impact en matière de létalité cellulaire selon des études basées sur la survie clonogénique (Olive 1998). Ainsi, le nombre de CSB est estimé à environ 1000 par cellule de mammifère et par Gy pour un rayonnement de faible TEL et de 500 par cellule et par Gy dans le cas de rayonnement de haut TEL (Tubiana et al. 2005).

(ii) *Cassures double-brin (CDB)*

Les cassures double-brin correspondent à une rupture des deux chaînes en des sites proches l'un de l'autre. Ce type de cassures forme une catégorie de lésions parmi les plus difficiles à réparer. Leur nombre est estimé entre 40 et 100 dans une cellule de mammifère par Gy de rayonnement (Tubiana et al. 2005). Heilmann et al. ont montré que l'efficacité de formation de ces CDB s'accroît avec l'augmentation du TEL (Heilmann et al. 1996). La cinétique de réparation des CDB, relativement longue, est un paramètre important dans la radiosensibilité cellulaire (Löbrich et al. 1998).

(iii) *Modifications de bases*

Les bases peuvent être détruites ou modifiées par des attaques radicalaires ou au cours de la réparation. Elles subissent surtout une hydroxylation (radical HO°) avec formation d'hydroperoxydes en présence d'oxygène par rupture des liaisons sucre-phosphate. Les bases pyrimidiques sont plus sensibles que les bases puriques. On a par ordre de sensibilité : T > C >> A > G. La formation de bases modifiées entraîne des

distorsions de la molécule d'ADN. Notons qu'on observe 2 à 3 de ces altérations pour 10 cassures simples de chaînes.

(iv) *Modification des sucres*

Les altérations du désoxyribose sont plus rares (0,2 à 0,3 altérations des sucres pour 10 cassures simple brin). Les sucres sont oxydés puis hydrolysés avec libération de la base. L'élimination d'une base entraîne la création d'un site abasique.

(v) *Pontages*

Le radical hydroxyle provoque dans l'ADN la formation de pontages intrabrins (dimères de thymine notamment – rayonnements UV) et interbrins (pontage ADN-ADN) par des liaisons covalentes (Cadet et al. 1997). Il existe, en outre, des pontages entre un brin et une protéine.

(vi) *Dommages multiples localisés*

Les lésions multiples localisées (ou LMDS – locally multiply damaged sites) sont constituées de cassures de l'ADN associées à des dommages de bases sur une distance de 10 à 20 nucléotides (Ward 1988). En raison de leur complexité, les LMDS sont, comme les CDB, difficiles à réparer. Ces lésions sont donc en premier lieu létales, mais certaines d'entre elles peuvent même être mutagènes et liées à des instabilités génétiques susceptibles d'aboutir à une cancérogénèse.

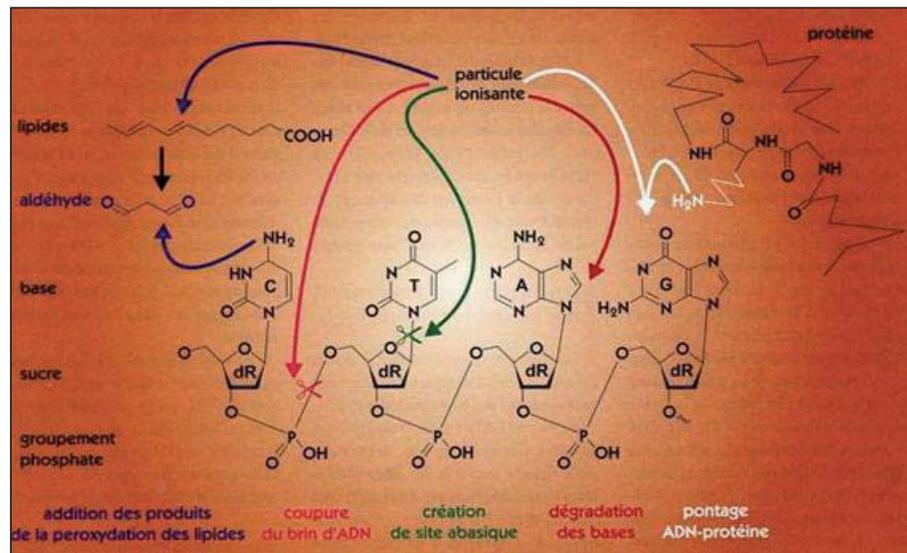


Figure 42 - Schéma résumé des différents types de lésions induites par des rayonnements ionisants. [J. Cadet, Mécanismes biologiques Partie 2 : Lésions radioinduites de l'ADN, Clefs CEA. <http://www-dsv.cea.fr> (mise à jour : mai 2013)].

#### d) La signalisation des dommages à l'ADN

Dès les premières doses d'irradiation, la cellule réagit selon sa nature, son état énergétique et physiologique (phase du cycle, etc.) et ses caractéristiques génétiques en déclenchant une cascade de signalisations.

La première phase comporte deux étapes :

- 1) *Détection* des lésions de l'ADN par des protéines senseurs (détectrices) qui se lient éventuellement aux lésions ;
- 2) *Transmission* du signal par des protéines dites transmetteurs qui sont des kinases présentes dans tous les organismes eucaryotes. Il en existe deux : l'ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (nous nous intéresserons à cette protéine en particulier) et l'ATR (Ataxia Telangiectasia RAD3 Related).

Le choix de la protéine kinase mise en jeu dépend notamment du type et du nombre de lésions. Ainsi, la phosphorylation de la protéine ATM, très précoce, fait suite à une CDB de l'ADN alors que l'activation d'ATR suivrait celle d'ATM et n'interviendrait que pour la réparation de lésions plus sévères et tardives (Bakkenist & Kastan 2003).

La deuxième phase est celle où ATM active (par phosphorylation d'un ou plusieurs sites) les protéines dites *effectrices*. Ces protéines contrôlent la progression ou l'arrêt du cycle cellulaire (ce qui peut donner le temps à la cellule de réparer les lésions) ainsi que la réparation de l'ADN ou l'*apoptose* (cf. 3.3.1g)). Parmi les protéines activées, on peut citer l'histone H2AX impliquée dans la structure de la chromatine.

e) La réparation des lésions de l'ADN

Il existe quatre principaux systèmes de réparation activés selon le type de lésions : La réparation par **excision de base** ou BER (Base Excision Repair), qui prend en charge les modifications de bases comme la méthylation, l'oxydation, la réduction ou la fragmentation de bases. La **réparation par excision de nucléotides**, le NER (Nucleotide Excision Repair), qui permet de réparer certaines lésions qui créent une forte distorsion de l'ADN. Les CDB sont prises en charge par deux systèmes de réparation, la **recombinaison homologue** (HR, Homologous Recombinaison) et la **ligation non homologue** (NHEJ, non homologous endjoining) (Moore et al. 2000). Seuls ces deux derniers mécanismes seront décrits.

Les cassures double-brin de l'ADN spontanées ou radio-induites sont létales si elles ne sont pas réparées. Il existe deux grandes voies de recombinaison de l'ADN pour ce type de dommages :

- la **recombinaison homologue** (HR) (
- Figure 43 A.), qui est un mécanisme assez lent du fait qu'il utilise le chromosome homologue non endommagé pour assurer une réparation fidèle de la lésion. Les analyses génétiques réalisées chez le *saccharomyces cerevisiae*, qui est une espèce de levure, ont permis d'identifier plusieurs gènes - RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, MRE11, XRS2,..., qui jouent un rôle prépondérant dans la recombinaison homologue et dont les déficiences conduisent à une sensibilité accrue aux rayonnements ionisants (Pâques & Haber 1999).

Les événements impliqués lors de la recombinaison homologue sont complexes et sont résumés succinctement dans cette illustration : (i) activité nucléolytique 5'-3' ; (ii) reconnaissance des extrémités ADN 3' par la protéine Rad51 en association avec les protéines RPA, Rad54, Rad52 ; (iii) échange de brin d'ADN entre chromatide soeur ; (iv) Extension des extrémités 3' par l'ADN polymérase 1 ; (v) ligature (ADN ligase 1). Finalement, les jonctions de « Holliday » sont éliminées par clivage et ligature. La séquence nucléotidique ainsi réparée est très souvent dépourvue d'erreurs.

- la **recombinaison non homologue** (NHEJ) ou aussi dite réparation par jonction d'extrémités (end-joining) (
- Figure 43 C.), qui est beaucoup plus rapide mais dont le manque de fidélité peut conduire à l'insertion ou à la délétion de quelques nucléotides au moment de la jonction.

Ce mécanisme (NHEJ), semble assez simple puisqu'il consiste, après reconnaissance de la lésion, à joindre les extrémités double-brins de l'ADN générées par la cassure. Il repose sur la liaison d'un complexe protéique au niveau de ces extrémités qui permet de maintenir la cohésion entre les deux brins qui doivent être joints (Capp et al. 2006). Plus précisément, ce mécanisme de réparation requiert les protéines Ku qui se lient aux extrémités libres de l'ADN et le recrutement de DNA-PKcs. Par la suite Ku recrute XRCC4 ainsi que l'ADN ligase IV, et DNA-PKcs induit la phosphorylation de XRCC4, modulant ainsi son activité. La Ligase IV permet la liaison des extrémités de l'ADN. Le complexe Mre11-Rad50-Xrs2/Nsb1 contient les activités exo- /endo-nucléases et hélicases et peut intervenir dans la voie de réparation NHEJ, plus spécifiquement si les extrémités de l'ADN nécessitent d'être remaniées avant ligature. Cependant, d'autres nucléases peuvent intervenir dans ce processus à la place de Mre11.

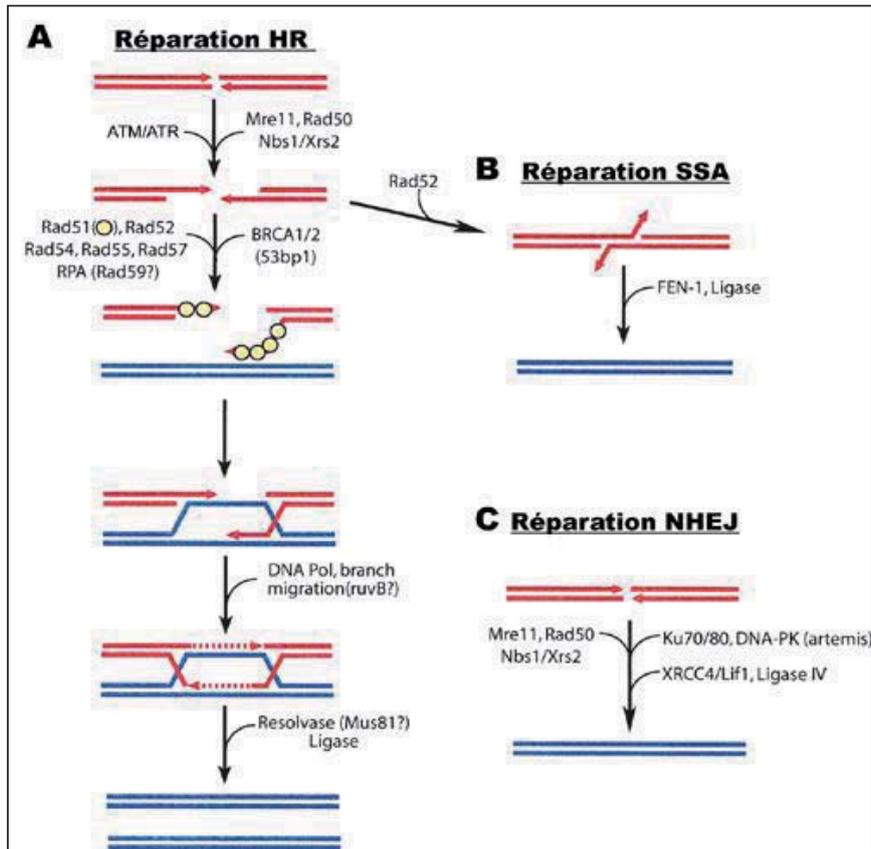


Figure 43 – Trois mécanismes de réparation des CDB (modifié de Peterson & Cote, 2004). A. Recombinaison Homologue (HR). B. Réparation par appariement des extrémités protubérantes simple brin (SSA). Dans ce cas particulier, il en résulte la perte d'une des deux séquences répétées. C. Recombinaison non-homologue (NHEJ).

En résumé, suite à la génération de lésions sur la molécule d'ADN, la réparation de ces dommages nécessite à la fois leur détection et l'induction d'une signalisation afin de ralentir le cycle par l'action de protéines effectrices et d'induire une réparation de l'ADN par l'action d'autres protéines. La coordination entre le métabolisme de l'ADN et le cycle cellulaire est importante pour permettre une réparation efficace. Enfin, suite à la formation d'une CDB, une modification de la chromatine résulte de la phosphorylation de la protéine H2AX par ATM, permettant une plus grande accessibilité de la région lésée pour la réparation.

f) Le rôle de la chromatine dans la réparation de l'ADN

La structure chromatiniennne est susceptible d'influencer l'induction de lésions et leur réparation. L'ADN est recouvert irrégulièrement de protéines chromatiniennes permettant de « filtrer » l'accès aux radicaux radio-induits et aux agents chimiques

généotoxiques. Dans cette section nous allons décrire brièvement la structure et la fonction de la chromatine et nous verrons un des marqueurs chromatiniens associé à la réparation de CDB de l'ADN : l'histone H2AX.

(i) *Chromatine : structure et fonction*

La structure des chromosomes eucaryotes permet l'empaquetage du matériel génétique à l'intérieur du noyau des cellules. Caractérisée par différents niveaux structuraux (

Figure 44), c'est la chromatine qui est à l'origine de cet empaquetage génomique.

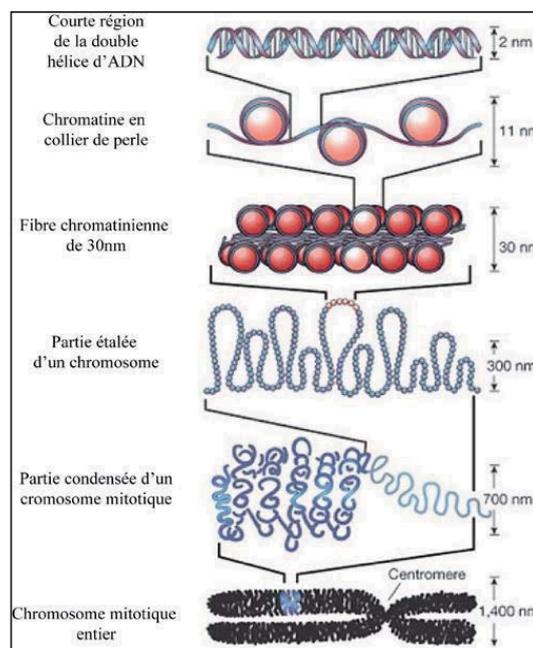


Figure 44 - Différents niveaux de condensation de l'ADN. [Modifié de Felsenfeld et Groudine, 2003].

La chromatine peut être soit active transcriptionnellement (euchromatine) ou tellement condensée qu'elle devient transcriptionnellement inactive (hétérochromatine). La condensation/décondensation chromatinienne est régulée au cours du cycle cellulaire. Ainsi, lors de la mitose, cette structure est fortement condensée pour permettre la ségrégation adéquate des chromosomes. Par contre, dans les autres phases, elle devient diffuse, résultat d'une décondensation partielle. C'est d'ailleurs par cette dynamique qu'elle est considérée comme un acteur très important dans la régulation transcriptionnelle. En effet, cette structure condensée empêche l'accès à l'ADN et

donc aux processus biologiques présents dans le noyau tels que la transcription, la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN.

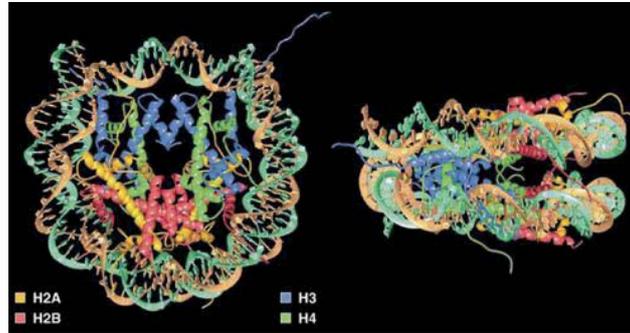


Figure 45 - La structure du nucléosome [Modifié de Luger et al., 1997].

Enfin, l'unité de base de la chromatine est le nucléosome qui enroule environ 150 paires de bases d'ADN autour d'un octamère de petites protéines : les histones. Constituée de deux copies des histones H3 et H4 et de deux dimères des histones H2A-H2B (Figure 45), la première structure cristallographique du nucléosome a été déterminée en 1997 (Luger et al. 1997). (Rogakou et al. 1999). Une cinquième histone (H1) assure la compaction de l'ADN à un niveau supérieur.

(ii) *L'histone H2AX*

La phosphorylation de la sérine 139 de la queue C-terminale de l'histone H2AX chez les mammifères est associée très tôt à la réparation de l'ADN.

Ce résidu est connu pour être modifié, dans les minutes suivant l'apparition d'une cassure double-brin de l'ADN, sur la région lésée de la chromatine (Rogakou et al. 1999). Il a même été établi qu'elle précède et agit sur le recrutement du complexe de réparation MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) et de la protéine Rad51 (Paull et al. 2000).

L'histone H2AX, phosphorylé par ATM 1 à 3 minutes après l'induction de CDB, déclenche la signalisation du dommage radio-induit et le recrutement des divers facteurs de réparation, probablement en modifiant la structure de la chromatine autour des CDB (Bakkenist & Kastan 2003; Bakkenist & Kastan 2004). Il se forme des foyers d'histones H2AX phosphorylés ( $\gamma$ -H2AX) correspondant aux CDB et détectables par immunohistochimie, comme nous le verrons par la suite (cf. 3.3.2b)).

g) Les différents types de mort cellulaire

Nous avons évoqué dans les sections précédentes, les lésions de l'ADN dues à l'irradiation ainsi que la réparation en fonction du type de dommage causé, avec notamment le rôle de la chromatine dans le processus de réparation des cassures double-brin. Les types de mort radio-induite dépendent du type cellulaire et de l'environnement (type de particules, stress, etc.). En radiobiologie, la mort cellulaire s'accompagne, par définition, d'une perte du potentiel clonogénique ou pouvoir répliatif. Il y a cinq modes

de mort cellulaire : la mort immédiate, la sénescence, la mort mitotique, l'apoptose et l'autophagie.

- La mort immédiate : survient quelques minutes à quelques heures après une forte dose de rayonnement. Elle peut être considérée comme un suicide cellulaire (proche de l'apoptose) mais avec un caractère morphologique semblable à une nécrose (explosion de la cellule avec relargage du matériel génétique) ;
- la sénescence : est considérée comme un stade ultime de différenciation cellulaire dans lequel la cellule subit un arrêt définitif du cycle cellulaire tout en maintenant une activité métabolique faible ;
- la mort mitotique : est liée à la perte de la faculté d'accomplir avec succès une mitose symétrique. Elle est corrélée à la présence de lésions chromosomiques non réparées, et caractérisée par la libération de micronoyaux et par l'apparition de cellules binucléées et de cellules géantes ;
- l'apoptose : est le suicide de la cellule (terme introduit par *Kerr* en 1972). Elle peut être provoquée par des causes endogènes ou exogènes comme par exemple le stress oxydatif, l'hyperthermie et la présence de CDB non réparées ;
- l'autophagie : est une dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule par ses propres constituants (lysosomes). Elle peut aboutir à la mort cellulaire après exposition à un stress important.

En résumé, la fonction physiologique des morts cellulaires est d'abolir la capacité proliférative des cellules qui auraient, par exemple, incomplètement réparé les dommages à l'ADN induits par des stress exogènes ou endogènes.

### 3.3.2 Choix des observables biologiques

Dans le but de confirmer l'efficacité biologique des protons délivrés par la plateforme Radiograaff, nous avons établi une courbe de survie clonogénique que nous avons comparée à celle obtenue par irradiation de ces mêmes cellules (HNSCC) avec des photons. De plus, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, nous nous sommes intéressés à la vitesse de réparation des dommages après irradiation. Il s'agit d'étudier la capacité de réparation des cellules tumorales. Les irradiations par ions carbone induisent des dommages complexes (LMDS et CDB), connus pour conduire à des aberrations chromosomiques (Ritter & Durante 2010), (Lee et al. 2010). C'est pourquoi il est important d'étudier si des protons de haut TEL peuvent induire le même type de dommages. Dans cette section nous allons montrer la méthode pour établir une courbe de survie cellulaire, puis, nous présenterons le principe de l'*immunodétection* des dommages à l'ADN, ces derniers étant observables grâce à la phosphorylation des histones H2AX (cf. section 3.3.1f(ii)).

a) **Survie cellulaire : définition**

La radiosensibilité des cellules saines ou d'origine tumorale est déterminée par la réalisation de courbes de survie clonogénique après irradiation. Pour des cellules différenciées et qui ne prolifèrent pas, la mort peut se définir comme la perte irréversible de la fonction cellulaire. En outre, si des doses considérables sont nécessaires pour entraîner la mort d'une cellule immédiatement après une irradiation, pour des doses plus faibles, la cellule peut continuer à vivre pendant un temps plus ou moins long. Pour des lignées proliférantes, certaines cellules irradiées vont réussir à effectuer quelques divisions mais ne seront plus capables de se diviser indéfiniment.

On définit les courbes de survie cellulaire comme la représentation graphique de la relation entre le taux de survie des cellules, c'est-à-dire qui ont gardé la capacité de proliférer un nombre minimal de fois (6 divisions, soit des clones de  $2^6$  cellules), et la dose délivrée.

Le modèle mathématique le plus souvent utilisé, pour représenter les courbes de survie cellulaire, est le *modèle linéaire quadratique*. Dans une représentation semi-logarithmique, la courbe obtenue comporte un épaulement et une partie distale linéaire, ce qui est souvent interprété par le fait que la cellule peut être tuée de deux façons différentes. Soit elle meurt par l'action d'un seul événement létal qui sera représenté par la composante linéaire de la courbe de survie, soit par combinaison de deux événements sub-létaux qui correspondent à la portion quadratique de la courbe.

Le taux de survie est donné par :

$$S = \exp(-\alpha D - \beta D^2),$$

où  $S$  est la survie à la dose considérée  $D$ ,  $\alpha$  et  $\beta$ , sont deux paramètres qui représentent respectivement la tangente à l'origine avec pente négative et l'épaulement (cf. Figure 46).

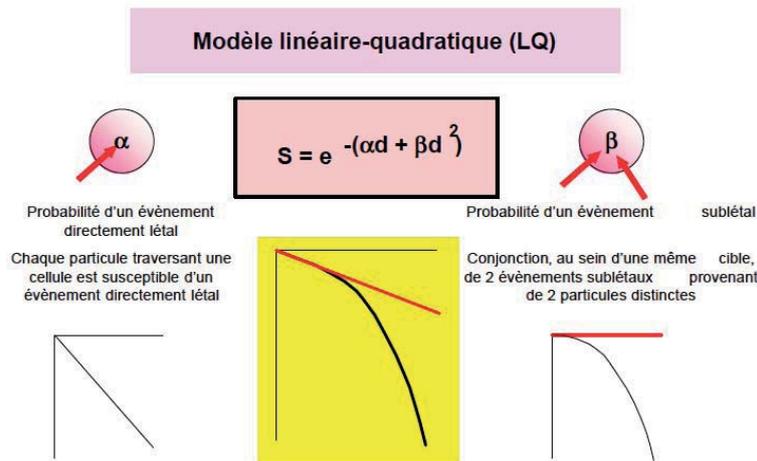


Figure 46 - Le modèle linéaire quadratique [www.imre.ucl.ac.be].

Les différents paramètres calculés à partir de cette équation vont caractériser la radiosensibilité. Un des plus fréquemment utilisé est la SF2 : fraction de cellules survivantes à 2 Gy. Plus la SF2 est grande, moins la lignée cellulaire étudiée est radiosensible. Notons que ce modèle linéaire-quadratique est incorrect aux faibles et fortes doses, mais convient assez bien dans le domaine qui nous intéresse (Prasad 1984; Tubiana et al. 2008).

b) Immunodétection de dommages à l'ADN

Comme nous l'avons vu dans la section 3.3.1c(ii), les cassures double brin (CDB) sont des dommages cellulaires assez complexes pouvant conduire à des ségrégations incorrectes lors de la mitose, des réarrangements ou à des pertes chromosomiques (Rogakou et al. 1999), aboutissant à la mort de la cellule ou à une carcinogénèse (Wyman & Kanaar 2006).

La phosphorylation des histones H2AX, dont l'image est appelée communément *foci*, est le marqueur biologique le plus simple à observer sur les CDB induites par radiation (Bouquet et al. 2006). D'après les études menées par Rothkamm et al., le nombre de foci  $\gamma$ -H2AX formés de cette manière semble être directement proportionnel au nombre de CDB formées, et leur déphosphorylation semble être corrélée à la réparation de ces cassures (Rothkamm & Löbrich 2003). Après immunomarquage (fluorescence) des foci  $\gamma$ -H2AX deux méthodes d'analyse sont possibles : la cytométrie de flux ou le comptage par microscopie associé à un programme d'analyse.

La cytométrie de flux est une technique permettant de faire défiler des particules (par exemple des cellules) en suspension dans un liquide, à grande vitesse dans un faisceau laser, en les comptant et en les caractérisant. La longueur d'onde du laser est choisie en fonction de la longueur d'onde d'émission du marqueur fluorescent. C'est la lumière réémise qui permet de classer la population suivant plusieurs critères (par exemple l'intensité de fluorescence) et de les trier. Dans le cadre de nos études, cette technique peut offrir deux avantages : la rapidité du traitement des foci ainsi que la capacité à traiter des sous-populations basées sur l'expression d'une autre fluorescence (marquée sur un anticorps ou une molécule) (MacPhail et al. 2003). C'est une méthode qui offre la possibilité de mesurer les changements de l'intensité des foci  $\gamma$ -H2AX en relation avec la position du cycle cellulaire (Schmid et al. 2010). En revanche, l'intensité lumineuse n'est pas forcément corrélée au nombre de cassures double-brin.

La microscopie, quant à elle, est une méthode d'analyse plus lente mais dont le résultat donne un nombre de foci par noyau en fonction du temps post-irradiation. Par exemple, grâce à une méthode d'analyse par microscopie confocale associée à un programme de reconstruction 3D, on est capable de compter le nombre de dommages présents dans chaque noyau. La microscopie apporte une information supplémentaire (par rapport à la cytométrie) sur la localisation des foci dans chaque noyau et leur dimension (un ordre de grandeur est par exemple de  $0,035 \mu\text{m}^3$  à  $3,1 \mu\text{m}^3$  pour une réparation de 15 à 30 minutes après irradiation 2 Gy protons – exemple :

Figure 52).

Dans cette partie, nous allons voir les protocoles mis en place pour l'étude des dommages à l'ADN causés par les protons de la plateforme Radiograaff. Nous aborderons

le protocole de l'immunofluorescence permettant de visualiser les foci ainsi que l'acquisition et le traitement des images par le logiciel ImageJ.

### 3.3.3 Choix des lignées tumorales humaines

Le choix des lignées cellulaires a été fait selon le type d'expérience que nous voulions mener. Notons que la radiosensibilité est différente d'une lignée à l'autre. Elle varie selon les caractéristiques cellulaires et le type de rayonnement. Ces deux paramètres, à prendre en compte, conditionnent la réponse des cellules aux irradiations.

Deux lignées cellulaires tumorales humaines ont été utilisées lors de ce travail :

- la lignée SCC61 (radiosensible,  $SF_{2_{\text{photon}}} : 0,36$ ), établie à partir d'un patient atteint d'un carcinome épidermoïde de la langue sensible à la radiothérapie,
- la lignée SQ20B (radiatorésistante,  $SF_{2_{\text{photon}}} : 0,72$ ), établie à partir d'un patient porteur d'un carcinome épidermoïde du larynx résistant à la radiothérapie (Weichselbaum *et al.*, 1986).

Ces lignées ont été choisies en fonction de leur radiosensibilité (M. Maalouf *et al.* 2009). Par ailleurs, des études cliniques présentées par le groupe de Chiba (Japon) (Mizoe *et al.* 2004) ont démontré que le contrôle tumoral des HNSCC (Head and Neck Squamous Carcinoma Cells) traitées par hadronthérapie est très inférieur à celui des autres carcinomes ORL, renforçant l'intérêt de ce modèle.

### 3.3.4 Matériel et méthode

#### a) Culture cellulaire et irradiation

Les deux lignées ont été cultivées dans du milieu d'EAGLE modifié par Dulbecco, (DMEM) additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF), préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes, de pénicilline à 100 U/ml, de streptomycine à 0,1 g/l (PAA). Le milieu de culture des deux lignées de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (HNSCC) contient également de l'hydrocortisone (Sigma) à 0,04 mg/l. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité et en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Nous irradiions (photons ou protons) les cellules en phase exponentielle de croissance après 10-16h d'ensemencement (monocouche) dans des boîtes dédiées aux irradiations (spécifiques au type de rayonnement).

Pour les irradiations photoniques d'énergie moyenne 250kV, les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de 25 cm<sup>2</sup> (Flask). Les irradiations ont été réalisées dans le laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de Lyon-Sud à l'aide d'un irradiateur X (modèle X-Rad320 de la marque PXI). Les boîtes de culture sont irradiées par-dessus, dans un champ de 20x20cm<sup>2</sup>, à une distance de 50 cm et à un débit de dose de 2 Gy/min.

Pour les irradiations par les protons, les cellules ont étéensemencées dans des Labtek de 6,25 cm<sup>2</sup> (conditions d'ensemencement avec le protocole « Labtek » cf. 3.2.1. Le milieu de culture est enlevé pendant la durée de l'irradiation (maximum 1 min) et un nouveau milieu est réintroduit juste après. Les irradiations ont été réalisées sur la

plateforme Radiograaff avec des protons accélérés à 3,5 MeV correspondant à 2,9 MeV à l'entrée des cellules (LET = 12,5 keV/μm). Le débit de dose était de 2 Gy/min.

b) Protocole de réalisation de courbe de survie

Les survies cellulaires ont été établies d'après une méthode standard de formation de colonies (Puck & Marcus 1955). Pour synthétiser : après irradiation, les cellules sont détachées (trypsine) de leur support (Flask ou Labtek), comptées, et diluées pour être réensemencées à concentration connue ( $N_{c, e, d}$ ). Ensuite, les cellules sont placées à l'incubation durant 10 jours environ, ce qui correspond à 6 divisions cellulaires. Pendant cette période les cellules vont se diviser et donner des colonies qui sont aisément visibles à l'œil nu après fixation et coloration. Par définition, les cellules d'une colonie sont les descendantes d'une seule cellule mère ayant survécu à l'irradiation.

Pour évaluer la survie d'une lignée cellulaire aux rayonnements, nous avons besoin de la valeur de son « plating efficiency ». Cette valeur indique le pourcentage de cellules qui ont adhéré au support et qui sont capables de donner des colonies (avant irradiation). Par exemple, si le nombre de colonies est de 20 après ensemencement de 100 cellules, alors, le plating efficiency sera de 20%. La fraction de cellules survivantes pour une dose donnée  $S(D)$  est exprimée par :

$$S(D) = \frac{n}{N_{c, e, d}(D) \times (PE)}$$

où  $n$  représente le nombre de colonies comptées,  $N_{c, e, d}$  le nombre de cellules ensemencées et  $PE$  le « plating efficiency ».

c) Immunodétection de dommages à l'ADN : analyse par microscopie

La détection des foci  $\gamma$ -H2AX se fait par immunochimie, qui est une méthode de localisation de protéines. De 15 minutes à 24h après irradiation, les cellules sont lavées avec du PBS (phosphate buffered saline), fixées avec du paraformaldéhyde (PFA, 4%) et conservées à 4°C. Ensuite les cellules sont *perméabilisées* pendant 3 minutes maximum. Comme nous l'avons abordé dans la section 3.3.1f(ii), les foyers d'histones H2AX phosphorylés sont spatialement corrélés avec les CDB. Ils sont « reconnus » par un anticorps primaire spécifique couplé à un anticorps secondaire porteur d'un fluorochrome, permettant alors la localisation des dommages par microscopie à fluorescence. Le principe est le suivant : un tampon (HEPES, pH = 7,4, 10% Triton x-100) permet de faire pénétrer des anticorps dans la cellule. Précisément après différents lavages, les cellules sont incubées 1h avec un anticorps Anti-phospho-H2AX (anticorps primaire). Après plusieurs lavages, on incube à nouveau les cellules pendant 1h avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG. L'anticorps secondaire, porteur du fluorophore, vient se fixer à l'anticorps primaire lui-même fixé à l'histone phosphorylé ( $\gamma$ -H2AX). La Figure 47 présente le schéma de principe du marquage fluorescent. Enfin, nous finissons par colorer les noyaux au DAPI (5μg/ml) pendant 15 minutes à température ambiante. Nous conservons les lames à 4°C et à l'obscurité.

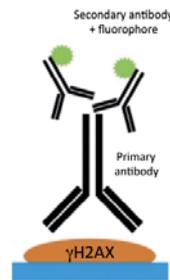


Figure 47 - Principe du marquage fluorescent des dommages à l'ADN.

Les images des noyaux cellulaires ont été acquises avec un microscope à fluorescence plein champ (microscope Axio Imager Z1 Zeiss) de la plateforme de microscopie de Lyon Sud, à température ambiante. Les fichiers d'images sont au format .TIF. On récupère les images des foci marqués à l'Alexa488 (vert) ainsi que celles des noyaux marqués au DAPI (bleu), puis on les ouvre dans le software ImageJ. Enfin, on superpose ces images pour n'en former plus qu'une, afin de pouvoir compter manuellement le nombre de foci par noyau. (La statistique est d'une centaine de noyaux par point de cinétique).

## 3.4 Résultats des études de radiobiologie

### 3.4.1 Détermination de la survie clonogénique

#### a) Résultats

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la survie clonogénique des lignées SCC61 et SQ20B en réponse aux irradiations par rayons X de 250 kV et par le faisceau de protons de 2,9 MeV, sur une gamme de dose de 1-5 Gy. Le résultat est présenté sur la Figure 48.

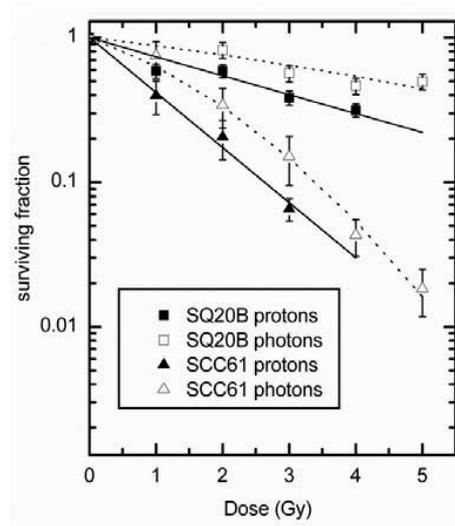


Figure 48 - Courbes de survie cellulaire des lignées SCC61 (cellules radiosensibles) et SQ20B (cellules radiorésistantes) irradiées avec des protons de 2.9 MeV (symboles pleins) et avec des photons (symboles vides).

L'équation  $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$  du modèle linéaire quadratique (détaillé dans la section 3.3.2a) a été ajustée sur les données expérimentales. Les valeurs des coefficients  $\alpha$  et  $\beta$ , de la fraction de survie à 2 Gy ( $SF2$ ) et de la dose  $D_{10}$  correspondant à 10% de survie ont été déduites de ce modèle et sont reportées dans le

Tableau 10). Les valeurs du plating efficiency ( $PE$ ) sont également reportées. Les incertitudes qui figurent dans ce tableau ne tiennent pas compte de l'erreur sur la dose ( $\Delta D_{proton}$ ) délivrée comme présenté dans la section 1.3.2b(ii) du chapitre 2.

Particules	Lignée cellulaire	PE	$\alpha$ (Gy <sup>-1</sup> )	$\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )	SF2	$D_{10}$ (Gy)
Photons	SCC61	$0.14 \pm 0.04$	$0.36 \pm 0.04$	$0.1 \pm 0.02$	$0.33 \pm 0.06$	$3.3 \pm 0.3$
	SQ20B	$0.21 \pm 0.03$	$0.19 \pm 0.04$	*	$0.75 \pm 0.15$	$12.0 \pm 4.0$
Protons	SCC61	$0.13 \pm 0.03$	$0.88 \pm 0.06$	-	$0.17 \pm 0.02$	$2.6 \pm 0.2$
	SQ20B	$0.19 \pm 0.03$	$0.3 \pm 0.04$	-	$0.55 \pm 0.04$	$7.7 \pm 1$

Tableau 10 - Paramètres biologiques des cellules SCC61 et SQ20B irradiées par des rayons X de 250 kV ou par des protons de 2,89 MeV.  $\alpha$  et  $\beta$  sont les paramètres d'ajustement issus du modèle quadratique,  $SF2$ , la fraction de cellules survivantes à une irradiation de 2 Gy et  $D_{10}$  est la dose à 10% de survie. Les erreurs ne tiennent pas compte de l'erreur sur la dose délivrée. \* Cas particulier, nous avons utilisé un fit linéaire beaucoup plus proche de la réalité.

Il faut noter que pour la lignée SQ20B la dose d'irradiation n'est pas assez élevée pour que la survie chute en dessous de 10%. Par conséquent, la valeur de la dose  $D_{10}$  et l'EBR à 10% de survie résultent d'une extrapolation et doivent donc être considérés avec prudence. En outre, le modèle linéaire quadratique n'est pas applicable pour la

lignée SQ20B au vu du manque de points en irradiation photons. C'est pourquoi nous avons appliqué un fit donnant une estimation de  $D_{10}$  par la valeur supérieure de l'ordre de 12 Gy, mais de manière relativement certaine, inférieure à 15 Gy. NB : Ces valeurs de doses sont des valeurs théoriques pour lesquelles l'ajustement de la courbe de survie semble la plus proche des points expérimentaux.

L'exposition aux protons de 12,5 keV/ $\mu$ m entraîne dans les deux lignées cellulaires une diminution du taux de survie cellulaire plus importante que par l'exposition aux rayons X. Nous avons calculé les EBR à 10 % de survie ainsi que les incertitudes associées. Nous avons évalué les sources d'erreurs suivantes :

- $\frac{\Delta D_{proton}}{D_{proton}}$ , l'erreur sur la dose (en protons) délivrée aux cellules, est égale à  $\pm 11\%$  (cf. chapitre 2, section 1.3.2b)(ii),
- $\frac{\Delta D_{10\text{fit-photon}}}{D_{10\text{fit-photon}}}$ , l'incertitude sur l'ajustement des courbes de survie, est égale à  $\pm 9\%$  pour la lignée SCC61,
- $\frac{\Delta D_{10\text{photon}}}{D_{10\text{photon}}}$ , l'incertitude sur la  $D_{10}$  pour une irradiation en photon, est égale à  $\pm 5\%$ ,
- $\frac{\Delta D_{10\text{fit-proton}}}{D_{10\text{fit-proton}}}$ , l'incertitude sur l'ajustement des courbes de survie SCC61 en proton, est égale à  $\pm 7,6\%$ .

En admettant un caractère pseudo aléatoire à toutes ces erreurs, nous pouvons alors déduire l'incertitude sur l'EBR, de la manière suivante:

$$\Delta EBR = EBR \times \sqrt{\left[ \left( \frac{\Delta D_{10\text{fit-photon}}}{D_{10\text{fit-photon}}} \right)^2 + \left( \frac{\Delta D_{10\text{photon}}}{D_{10\text{photon}}} \right)^2 + \left( \frac{\Delta D_{10\text{fit-proton}}}{D_{10\text{fit-proton}}} \right)^2 + \left( \frac{\Delta D_{proton}}{D_{proton}} \right)^2 \right]}$$

Ce qui conduit au résultat suivant :  $EBR_{10\%} = \mathbf{1,27 \pm 0,21}$  pour les cellules SCC61. Pour la lignée SQ20B, le calcul des incertitudes n'a pas de sens ici, nous pouvons seulement estimer l'EBR maximale pour cette lignée qui est égale à **1,6**.

## b) Discussion

Pour tous les types de rayonnements, les cellules SQ20B sont systématiquement moins sensibles que les cellules SCC61. Par exemple, la fraction de survie après irradiation protons à 2 Gy est de  $0,17 \pm 0,02$  pour la lignée SCC61 et de  $0,55 \pm 0,04$  pour la lignée SQ20B. En comparaison, la réponse à l'irradiation photon donne une SF2 de  $0,33 \pm 0,06$  pour la lignée SCC61 et de  $0,75 \pm 0,15$  pour la lignée SQ20B. Ces différences en termes de radiosensibilité ont déjà été observées sur ces deux lignées cellulaires lors d'expériences précédentes avec des ions carbone (72 MeV/u et 9,8 MeV/u) ainsi qu'avec des ions argon (88 MeV/u) (Michael Beuve et al. 2008; M. Maalouf et al. 2009). La hiérarchie du niveau de radiorésistance n'est donc pas affectée par le changement de nature du rayonnement.

Notons également qu'une étude similaire a été menée par Belli et al. qui ont irradié la lignée SQ20B avec des protons de TEL = 19,8 keV/ $\mu$ m (Belli 2000). Les

résultats reportés vont dans le même sens que les nôtres. la SF2 protons =  $0,63 \pm 0,05$  et l'EBR à 10% de survie (par rapport à un rayonnement de  $^{60}\text{Co}$ ) est égale à  $1,43 \pm 0,29$ .

Le

Tableau 11 récapitule les résultats des EBR mesurées pour la lignée SQ20B pour les expériences de M. Belli, M. Beuve ainsi que celui issu des irradiations sur la plateforme Radiograaff. Chaque expérience a utilisé le même protocole d'irradiation : le protocole segment de trace (cf. chap1 section 1.1.1a)).

Expérience	M. Belli, 2000		M. Beuve, 2008		Radiograaff, 2013	
Particule	Protons		Ions carbone		Protons	
Energie (MeV/u)	1,49		72		2,9	
TEL (keV/ $\mu\text{m}$ )	$19,8 \pm 0,7$		33,6		$12,5 \pm 0,6$	
Lignée SQ20B	SF2	EBR	SF2	EBR	SF2	EBR
	$0,63 \pm 0,05$	$1,43 \pm 0,29$	0,23	2,1	$0,55 \pm 0,05$	$< 1,6$

Tableau 11 - Récapitulatif des résultats des différents EBR<sub>10%</sub> mesurés sur la lignée cellulaire SQ20B en fonction de l'énergie et des particules mises en jeu.

### 3.4.2 Cinétique du nombre de foci par noyau

La visualisation de foci dans les noyaux par microscopie à fluorescence a été extrêmement utile pour élucider les voies de détection et de réparation de l'ADN dans de nombreuses études (Luger et al. 1997; Rogakou et al. 1999; Paull et al. 2000; Rothkamm & Löbrich 2003). Cependant, des recherches récentes, donnant un aperçu de la réponse de la chromatine aux dommages de l'ADN, suggèrent que la plupart des molécules immobilisées à proximité de lésions ne sont pas directement impliquées dans la réparation de l'ADN. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont révélé que l'histone  $\gamma$ -H2AX est absente des zones directement apposées aux CDB et que la distribution des foci  $\gamma$ -H2AX le long de la chromatine est non-homogène (Savic et al. 2009). En outre, plusieurs protéines qui interagissent avec cet histone modifié par les dommages à l'ADN ne semblent pas participer à la réparation de l'ADN. Au lieu de cela, la propagation des modifications de la chromatine loin des lésions primaires pourraient être un mécanisme auxiliaire pour coordonner la réparation avec la transcription et la réplication (Lukas et al. 2011). En conséquence, les récentes découvertes sur les mécanismes qui régissent la formation de foci mettent l'accent sur l'importance de ne pas assimiler ces foyers avec des cassures double-brin dans toutes les situations (Costes et al. 2010). Actuellement sur Radiograaff, cela a permis de rendre compte des effets des protons de moyenne énergie sur deux lignées de radiosensibilité différentes et de montrer, d'une autre manière que par l'étude de la survie clonogénique, que les dommages des protons de 2,9 MeV sont complexes et difficilement réparables. C'est pourquoi nous étudions le nombre de foci par noyaux, qui est une quantité que nous maîtrisons et non la cinétique de réparation qui, à l'état actuel d'avancement de l'étude, n'aurait aucun sens.

## a) Résultats

La

Figure 49 présente le nombre de foci par noyau en fonction du temps après irradiation des deux lignées cellulaires, SCC61 et SQ20B. Sur cette figure, nous comparons les irradiations protons (2,9 MeV ; 12,5 keV/ $\mu\text{m}$ ) réalisées en avril 2012, avec les irradiations par ions carbone (75 MeV/u ; 30 keV/ $\mu\text{m}$ ) effectuées au GANIL et analysées par Maïté Hanot (Hanot et al. 2012), ainsi qu'avec les irradiations par photons X (250 kV). Pour les irradiations protons ont été réalisé avec le protocole biologique « boîtes de pétri » (cf.3.2.1). Toutes les irradiations ont été réalisées à une dose biologique de 2 Gy et à débit de dose de 2 Gy/min.

Nous avons fixé les cellules 15 min, 30 min, 2h, 4h et 24h après irradiation, puis nous avons appliqué le protocole de marquage cellulaire comme décrit dans la section 3.3.4c). Enfin, nous nous sommes placés dans des conditions d'analyse les plus proches possibles de celles de Maïté Hanot.

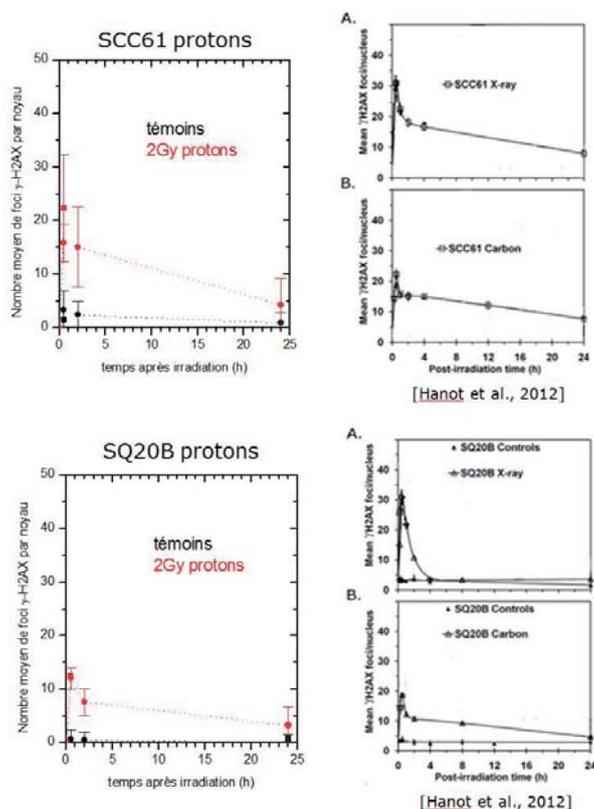


Figure 49 - Courbes de cinétique du nombre de cassures d'ADN estimé par le protocole  $\gamma$ -H2AX pour les lignées cellulaires SCC61 et SQ20B. À gauche, les résultats préliminaires après irradiations protons (2,98 MeV). À droite, les résultats des irradiations de ces mêmes lignées par photons X (250 kV) et ions carbone de 75 MeV/u (GANIL) [Hanot et al., 2012].

Par manque de statistique, le résultat des irradiations protons présente des barres d'erreur importantes. En revanche, si on s'en tient aux ordres de grandeur, la

forme des courbes du nombre de foci en fonction du temps post-irradiation protons, est similaire à celles obtenues par irradiations avec des ions carbone. Sur la

Figure 49 on observe une phase de croissance durant laquelle il y a phosphorylation de l'histone H2AX (cf. 3.3.1f(ii)), suivie d'une phase de décroissance que l'on peut interpréter, avec prudence, comme la réparation des dommages à l'ADN. Soit tout est réparé, et dans ce cas il n'y a plus de foci au bout de 24h, soit la réparation est incomplète et dans ce cas il y a des foci résiduels à 24h. Les points importants sont résumés dans le

Tableau 12.

	<b>SCC61</b>	<b>SQ20B</b>
<b>Caractéristiques</b>	Radiosensible	Radiorésistante
<b>Nombre de foci <math>\gamma</math>-H2AX /noyau après 24h (ordres de grandeur)</b>	X : 8 Ions carbone : 9 Protons : 8 Témoin (0Gy): < 3 (protons)	X : < 5 Ions carbone : 5 Protons : 7 Témoin (0Gy): < 3 (protons)
<b>Vitesse de réparation</b>	X : lente Ions carbone : lente Protons : lente	X : rapide Ions carbone : lente Protons : lente

Tableau 12 - Synthèse des données clés issues des graphes du nombre de foci par noyau en fonction du temps post-irradiation et en fonction du type de rayonnement.

D'après ces résultats préliminaires et pour cette observable biologique, il n'y a pas de bénéfice à irradier la lignée SCC61 avec des ions (protons ou carbone) plutôt que des photons X puisque le nombre de foci résiduels est semblable. En revanche pour la lignée SQ20B, les résultats obtenus par irradiation avec des ions carbone (75 MeV/u, 33,5 keV/ $\mu$ m) et des protons (2,98 MeV, 12,5 keV/ $\mu$ m) montrent un nombre de foci résiduels à 24h très important par rapport aux irradiations X (cf.

Tableau 12). Cette observation appuie l'hypothèse que l'exposition des cellules à des rayonnements de TEL élevé induit des dommages plus complexes que ceux induits par des rayons X, et que la lignée radiorésistante SQ20B ne peut pas réparer. Ce résultat préliminaire montre que les dommages induits par les protons de 2,9 MeV semblent proches de ceux induits par les ions carbone de 75 MeV/u.

## b) Discussion

D'après Lorat et al., l'organisation d'ordre supérieur de la chromatine détermine l'accessibilité des lésions de l'ADN à des complexes de réparation, définissant la façon dont les CDB sont détectées et traitées. Les lésions de l'ADN dans l'hétérochromatine semblent être plus complexes, avec plusieurs cassures rapprochées spatialement induisant de graves perturbations de la chromatine. La restauration imparfaite des

configurations chromatiniennes peut laisser des CDB induites comme mémoire épigénétique des dégâts avec des répercussions potentiellement pathologiques (Lorat et al. 2012). Il serait donc intéressant dans un futur proche, d'identifier les dommages complexes en complément du marquage des foci  $\gamma$ -H2AX, d'étudier les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN et donc d'approfondir sur les mécanismes mis en jeu en réponse aux irradiations des protons de 12,5 keV/ $\mu$ m.

### 3.5 Poursuite des études sur les dommages à l'ADN : vers une automatisation de l'analyse

Après avoir utilisé une méthode de comptage manuel des dommages à l'ADN, il nous a semblé préférable de trouver une autre solution, automatique, plus reproductible et plus fiable (non dépendante de la personne qui analyse). En effet, cette méthode est longue et fastidieuse. Comment reconnaître toujours la même taille ou intensité lumineuse d'un foci entre le début et la fin de l'analyse qui peut prendre plusieurs semaines ? Quelles sont les erreurs introduites par un comptage à l'œil ? Ces questions et, plus généralement, l'utilisation des outils d'analyse automatique d'image appliquées aux problématiques de la biologie ne sont bien sûr pas nouvelles (Böcker & Iliakis 2006). En revanche, elles sont toujours d'actualité. La recherche d'une automatisation est indispensable lorsque l'analyse de données en masse est envisagée. C'est un sujet à l'étude dans le cadre, par exemple, du pôle Radiobiologie du GdR MI2B, du WP radiobiologie de FranceHadron et du LabEx PRIMES.

Ce qui suit ne doit pas être appréhendé comme une étude achevée, mais au contraire comme faisant partie d'une étape d'appropriation du problème et des difficultés associées. Il s'appuie sur une dynamique de collaboration avec le groupe PAVIRMA de Clermont-Ferrand (G. Montarou et F. Chandez), le Centre Commun de Quantimétrie de Lyon (Yves Tourneur et Denis Ressnikoff) et bien sûr avec le LRCM de Lyon-Sud (Claire Rodriguez-Lafrasse, Gersende Alphonse et Priscilla Battiston-Montagne).

Ce travail préliminaire vise à entreprendre la construction d'un algorithme s'appuyant sur des outils intégrés au logiciel d'analyse d'image ImageJ. Il s'agit aussi de comparer les images issues de deux microscopes, comparant en particulier le mode plein champ et confocal.

Concrètement, nous avons élaboré une macro en deux dimensions dans le but de valider cette nouvelle méthode par rapport aux expériences précédentes et la méthode manuelle. Rappelons que les microscopes utilisés étaient des pleins champs (2D).

Dans un futur proche, nous nous attacherons à mettre au point une macro en trois dimensions. Mais tout d'abord, voyons quel a été notre « cahier des charges » pour le développement et la mise au point de ce nouveau protocole d'analyse.

#### 3.5.1 Utilisation d'un microscope confocal

Les images des cellules sont acquises à la plateforme d'imagerie du Centre Commun de Quantimétrie (CCQ, Université Claude Bernard Lyon 1) en utilisant un microscope confocal à balayage laser Leica SP2 équipé d'un objectif 63X (NA 1,32) avec un zoom 2X. Précisément, l'acquisition de l'image se fait par un balayage point par point

du faisceau laser par un système de miroirs galvanométriques (CLSM Confocal Laser Scanning Microscope). À travers l'objectif, la lumière monochromatique du laser excite les molécules fluorescentes présentes dans l'échantillon et la lumière ainsi émise parcourt le chemin inverse. Ensuite, séparée de la lumière d'excitation par un miroir dichroïque, cette lumière émise traverse un diaphragme appelé « pinhole » ne laissant passer que les rayons issus du plan focal (confocal). Enfin, l'intensité lumineuse est quantifiée par un photomultiplicateur.

Si on veut utiliser un signal échantillonné, il faut s'assurer que l'échantillon contienne la majeure partie de l'information du signal d'origine. Autrement dit, une perte d'information se produit si le pas d'échantillonnage est trop grand. Selon le critère de Nyquist-Shannon, le pas d'acquisition doit être au plus égal à la moitié de la résolution envisagée pour que le signal reconstitué ne soit pas dégradé par l'échantillonnage

Dans notre cas, il suffit de jouer sur le pas du balayage du miroir d'un facteur 2 ce qui a pour conséquence une zone scannée apparente 2 fois plus petite que le champ observé avec l'optique 63X (zoom 2X).

a) Acquisition des images

On sélectionne un champ de  $119 \times 119 \mu\text{m}^2$  ( $1024 \times 1024$  pixels). Ensuite, on effectue une série de sections optiques dans l'axe vertical Z (cf.

Figure 50), sur l'épaisseur totale de l'échantillon, par pas de 500 nm (typiquement de 20 à 40 coupes dans notre cas).



Figure 50 - Exemple d'une série de sections optiques dans l'axe vertical Z. [Nicolas V., Principe de la microscopie confocale à balayage laser, [www.ijm.fr](http://www.ijm.fr)]

Pour chaque coupe en Z, nous avons utilisé un mode d'acquisition séquentiel en deux étapes pour chaque coupe. Il est possible de visualiser dans le même plan focal (pour chaque coupe) les noyaux (marqués au DAPI) et les foci (marqués à l'Alexa488). Pour ce faire, les images des noyaux (DAPI) ont été acquises avec une longueur d'onde d'excitation de 405 nm et collectées sur un spectre de [410 - 493] nm. Ensuite, les images des foci (Alexa488) ont été acquises avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et collectées sur un spectre de [500 - 618] nm. À la fin de l'acquisition, on obtient une pile d'images superposées.

b) Résolution du microscope

La résolution du microscope a été déterminée grâce à la fonction de transfert de l'objectif, communément appelée PSF (Point Spread Fonction). Le protocole de mesure

est le suivant : nous préparons une solution avec des billes microscopiques fluorescentes (0,170 $\mu\text{m}$  de diamètre) dont la taille est inférieure à la résolution théorique du microscope. On obtient une tache. En connaissant la taille de la bille, la longueur d'onde utilisée (550 nm), l'ouverture numérique de l'objectif (1,32) et la taille du pinhole (1,0 unité d'Airy) on remonte à la fonction de transfert (déformation) du microscope (par déconvolution) (Cole et al. 2011). On obtient le résultat de la PSF du microscope grâce à un rapport généré par le logiciel MetroloJ, comme le montre l'exemple suivant (Figure 51).

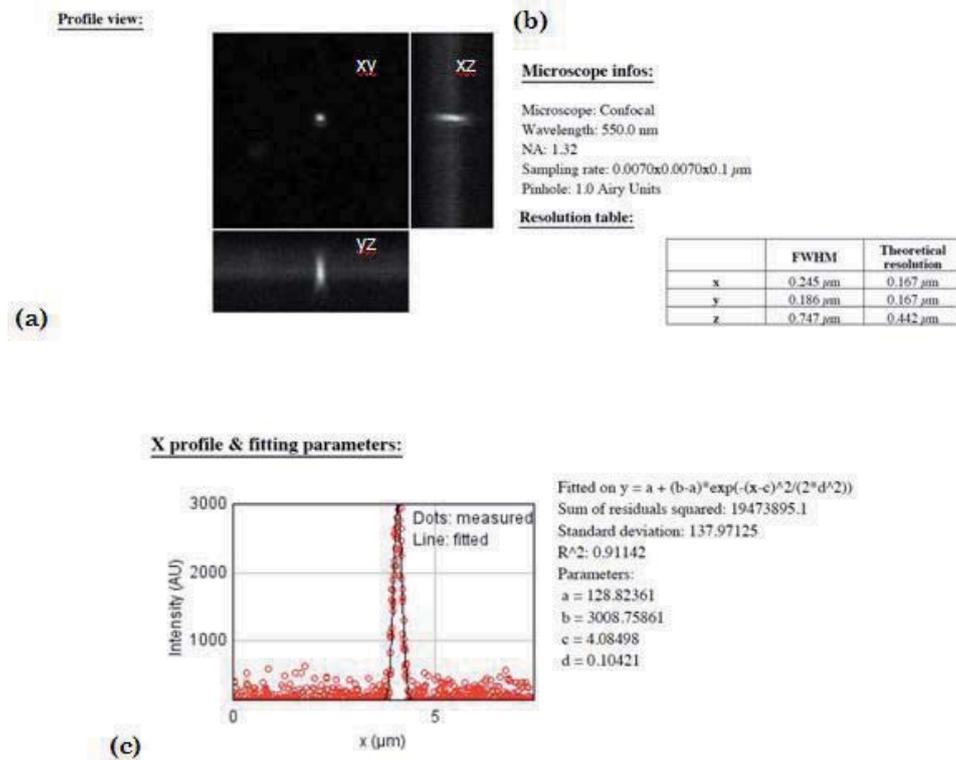


Figure 51 - Exemple d'un résumé de la mesure de la PSF à l'aide du logiciel MetroloJ (ImageJ). MetroloJ génère (a) images des microsphères en xy, xz et yz ; (b) liste des paramètres entrés (longueur d'onde, etc.) ainsi que le tableau des résolutions théorique et réelle (FWHM) (c) profil en intensité de la microbille fluorescente avec les paramètres d'ajustement utilisés pour déterminer la résolution (ici un profil en x).

La résolution optique latérale (XY) obtenue par cette méthode est d'environ 250 nm, et la résolution optique axiale (Z) est d'environ 750 nm (cf. Tableau 13). Pour respecter la règle d'échantillonnage de Nyquist, nous aurions dû choisir un pas (taille de pixel) de 375 nm (750 nm / 2) en Z (plutôt que 500 nm), mais pour un premier essai nous

avons effectué un compromis entre le temps d'acquisition (nombre de coupes raisonnable) et la qualité de l'image.

	Résolution théorique (nm)	Résolution réelle (nm)
X,Y	167, 167	245, 186
Z	442	747

Tableau 13 - Résultat de la PSF du microscope Confocal à balayage laser Leica SP2.

On comprend bien qu'à l'aide de ce type de microscope une reconstruction 3D des noyaux et des foci sera possible. Nous verrons par la suite que nous utilisons ces images pour obtenir le nombre de foci par noyaux à partir de projections (2D).

### 3.5.2 Développement d'une macro d'analyse : cahier des charges

Pour comprendre les enjeux et les difficultés de l'élaboration d'une macro d'analyse, partons d'un exemple concret. La

Figure 52 est la projection en Z d'une pile d'images acquises par un microscope confocal (cf. 3.5.1a)). Cette figure permet de nous représenter une zone typique que l'on voit depuis l'objectif du microscope. On peut observer les noyaux en bleu, et les foci en vert.

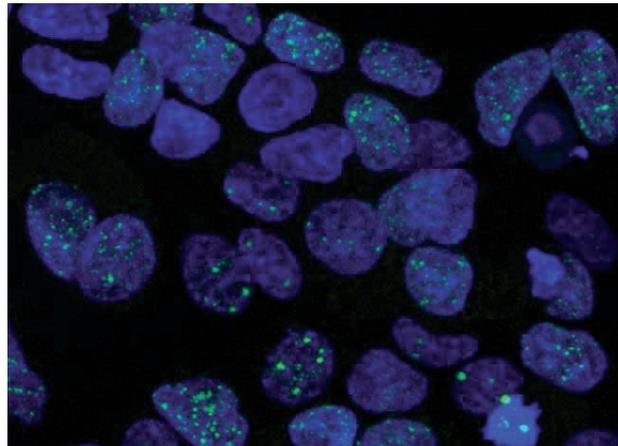


Figure 52 – Image (brute après projection en Z) de noyaux SQ20B (irradiés par des protons de 2,9 MeV) marqués au DAPI (bleu) et des foci marqués à l'Alexa488 (vert) acquise par microscopie confocale.

Sur cette image nous voyons que la plupart des cellules sont à confluence (se touchent) et certains mêmes, se superposent.

Pour développer cette macro, nous avons donc dû nous poser les bonnes questions et élaborer une stratégie afin de les résoudre (parfois partiellement), étape par étape :

- nous voulons compter chaque noyau. Pour ce faire, nous avons plusieurs solutions : soit utiliser une fonction de type *Watershed* (Serge Beucher and Fernand Meyer, 1993) qui permet de séparer deux (ou plusieurs) noyaux collés en les « coupant » (cette méthode présente deux inconvénients : la coupure peut être relativement arbitraire entre les deux noyaux et le temps d'analyse est augmenté) ; soit de faire l'acquisition d'une zone où les noyaux ne se touchent pas (ce qui induit évidemment un biais qui devra être mentionné) ; soit encore de supprimer de l'image tous les noyaux qui se touchent et garder seulement les noyaux isolés. Au-delà du biais induit, la quantité de cellules restantes sera plus faible (statistique). De plus, la faisabilité de l'automatisation de cette tâche est une question ouverte;
- certains noyaux sont en phase de mitose. À cette étape du cycle cellulaire, la fluorescence du marquage Alexa488 est trop intense, les foci ne sont pas distincts les uns des autres. Il est donc préférable de ne pas les prendre en compte. Si cela est envisageable, il serait pertinent de *synchroniser* (état cellulaire donné) les cellules avant irradiation pour réduire l'hétérogénéité de phase ;
- nous voulons compter les foci présents dans chaque noyau. La difficulté première dans ce travail est de déterminer ce qui est ou n'est pas un foci. Le fond du noyau peut être couvert d'une coloration verte. Il peut s'agir d'un problème de lavage après marquage. Doit-on définir une taille minimum et une taille maximum pour écarter cette information? Ou peut-être qu'il serait préférable de compter les foci les plus intenses sans prendre en compte leur taille ?

### 3.5.3 Développement d'une macro d'analyse : principe général

Dans ce qui suit, le protocole a été de choisir une zone où les noyaux ne sont pas à confluence, afin de simplifier au maximum l'élaboration de la macro d'analyse et de comptage. Les piles d'images ont été analysées avec une macro (référéncée par la suite sous le nom macro 5.0) mise au point en collaboration avec le centre d'imagerie CCQ. À partir du logiciel ImageJ (Rasband 2012), qui agit d'abord sur les noyaux et ensuite sur les foci.

- 1) La macro 5.0 intègre un plugin de reconstruction d'image : *3D object counting* (Bolte & Cordelieres 2006). Ce plugin quantifie chaque objet trouvé selon une simple sélection d'objet en 3D. Ici, nous nous servons de ce plugin pour segmenter (i.e. définir une frontière géométrique) chaque noyau, tranche par tranche, et obtenir son volume reconstruit en trois dimensions. Ce plugin analyse chaque pixel, et ses 8 pixels voisins et est capable de corrélérer les objets entre eux pour recomposer le volume total de l'objet (noyau). Une étape essentielle, également, est la suppression des noyaux en phase de mitose qui s'effectue par rapport à un seuil en intensité fixé sur les foci, pour chaque noyau. En d'autres termes, si un noyau présente des foci dont l'intensité lumineuse totale est trop élevée, alors il sera supprimé de l'image.
- 2) Ensuite on effectue une projection de la pile d'image (noyaux + foci) en Z. Les foci ne sont pas analysés par le plugin 3D. Ils sont simplement segmentés sur l'image projetée (2D) et associés au noyau auquel ils « appartiennent ».
- 3) À chaque objet est associé un niveau de gris différent (dénombrement) et un numéro, ce qui permet de les repérer visuellement, comme le montre la Figure 53.

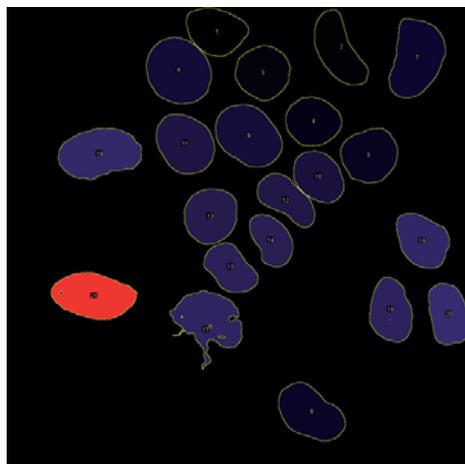


Figure 53 – Image des noyaux sélectionnés et repérés après segmentation, projection et suppression des mitoses (macro 5.0).

4) Ensuite on applique la fonction *FindMaxima* d'ImageJ. Cette fonction consiste à déterminer un seuil sur l'intensité lumineuse, et à compter tous les maxima locaux dont l'intensité se situe au-dessus de ce seuil. C'est ce qu'on peut observer sur la

5) Figure 54 (qui correspond à un zoom sur les noyaux 8,3, 11 et 9 de la Figure 53). Chaque noyau est représenté en gris foncé et les foci en gris clair. Le seuil *FindMaxima* est de 35 (nous aborderons plus en détails le choix du seuil dans la section suivante). Les points blancs sur les foci représentent ces « points chauds » et seront comptabilisés comme foci.

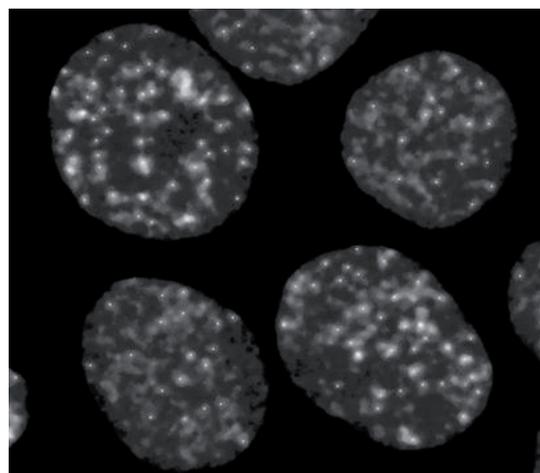


Figure 54 – Exemple de noyaux irradiés par des protons de 2,9 MeV après traitement par la macro 5.0. Le seuil *FindMaxima* a été choisi égal à 35 pour cet exemple précis.

Avant de faire l'analyse de nombreuses piles d'images, nous avons effectué quelques tests, notamment sur le choix du seuil FindMaxima de la macro 5.0. Voyons un exemple de protocole.

### 3.5.4 Exemple d'un protocole

Nous avons testé différents seuils pour la fonction FindMaxima. Nous avons sélectionné les images marquées à l'Alexa488 (sans les noyaux), ensuite nous avons appliqué un filtre médian et enfin nous avons fait une projection en Z. Le but est de trouver le seuil optimal pour l'analyse et le comptage des foci, et donc un protocole d'analyse validé par les biologistes et les physiciens.

Deux exemples de tests de seuils sont présentés par les Figure 55 et

Figure 56. Ces deux images sont identiques. On peut observer des croix qui représentent les points lumineux comptés au-dessus du seuil choisi. Un seuil à 0 montre une image pleine de croix (sans réel intérêt). La

Figure 55 a un seuil FindMaxima égal à 22, pour lequel on remarque encore beaucoup de croix en dehors des noyaux. Il semble donc que ce seuil soit trop bas dans ce cas, puisqu'il détecte du bruit de fond (fluorochromes présents sur la lame). La

Figure 56 montre environ 4 croix en dehors des noyaux pour un seuil de 35. Ce seuil semble mieux adapté dans ce cas.

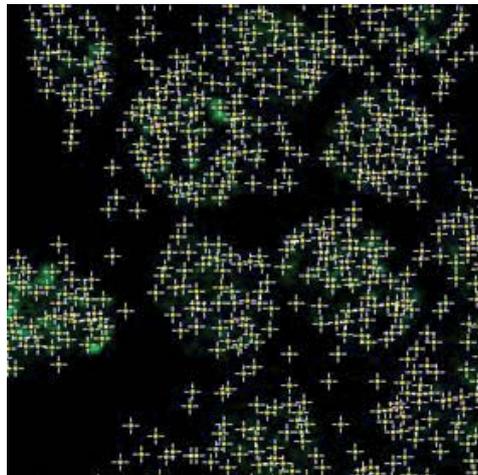


Figure 55 - Pile d'images de foci marqués à l'Alexa488 avec un seuil d'intensité lumineuse Findmaxima = 22. Les cellules sont des SQ20B irradiées à 2Gy par des protons de 2,98 MeV fixées 15min après irradiation.

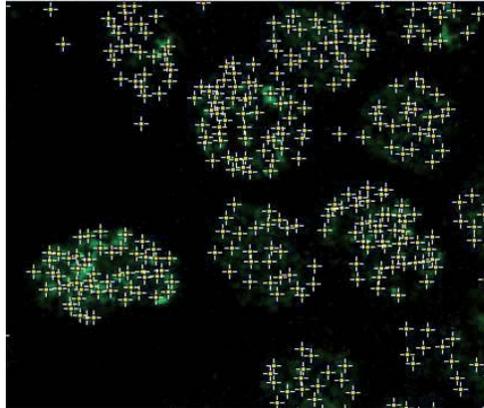


Figure 56 - Pile d'images de foci marqués à l'Alexa488 avec un seuil d'intensité lumineuse Findmaxima = 35. Les cellules sont des SQ20B irradiées à 2Gy par des protons de 2,98 MeV fixées 15min après irradiation.

**Le protocole.** Premièrement, le choix du seuil doit être vérifié sur différentes images. Ici nous avons choisi de montrer une image pour un temps post-irradiation de 15 min, la morphologie des foci évoluant dans le temps, il faut également affiner le choix du seuil en prenant un temps 4h ou 24h après irradiation ainsi qu'au moins un témoin. Deuxièmement, ce test doit être effectué avant chaque comptage. En effet, l'intensité (voire la réussite) d'un marquage peut varier d'une expérience à l'autre. Donc avant tout comptage, il faut vérifier impérativement ce paramètre d'entrée. En revanche, comme toutes les lames d'une même expérience ont été traitées dans les mêmes conditions, il ne faut plus changer ce paramètre pendant l'analyse.

### 3.5.5 Illustration d'un comptage par la macro

Dans cette section nous présentons un exemple de résultats obtenus après analyse par la macro 5.0. La macro donne 3 types de résultats : une image des noyaux repérés par un numéro (par exemple cf. Figure 53), une image des noyaux avec les foci (par exemple cf.

Figure 54) et un tableau (tableur Excel) de résultats du comptage pour chaque image analysée. Un exemple de résultat de comptage du nombre de foci dans chaque noyau présent sur une image donnée, est reporté dans le tableau

Tableau 14.

Noyau numéro	Nombre de foci	Noyau numéro	Nombre de foci
1	21	12	6
2	26	13	15
3	17	14	11
4	15	15	9
5	19	16	24
6	30	17	30
7	40	18	31
8	48	19	37
9	36	20	22
10	11	21	28

**Tableau 14 - Résultat d'un comptage du nombre de foci par noyau effectué à l'aide de la macro 5.0, sur une image donnée. On obtient un tableau du nombre de foci en fonction du numéro du noyau que l'on peut repérer sur une image associée (ici la Figure 53).**

Les numéros des noyaux font référence à la Figure 53. Il s'agit de cellules SQ20B irradiées à 2Gy (protons de 2,9 MeV) et fixées 15min après irradiation. Cet exemple rend compte de la facilité avec laquelle on effectue l'analyse. Grâce au repérage de chaque noyau en parallèle de l'image brute ou l'image des foci repérés par la fonction FindMaxima, cela permet à l'utilisateur d'avoir la possibilité de vérifier le comptage à tout moment.

### 3.5.6 Résultat du comptage du nombre de foci par noyau par la macro 5.0 sur la lignée SQ20B après irradiation protons

Après acquisition d'images à l'aide du microscope confocal du CCQ, nous avons compté le nombre de foci par noyau (pour chaque condition) grâce à la macro 5.0. L'étude a porté seulement sur la lignée SQ20B (protocole « Labtek – cf. 3.2.1) (expérience mars 2013).

Le résultat que nous allons présenter vise uniquement à évaluer la méthode d'analyse. En effet, le résultat issu de ces images n'est pas rigoureusement exploitable car nous avons choisi des zones sur les lames telles que les noyaux ne sont pas à confluence. Nous craignons d'avoir introduit un biais car ces zones se trouvent généralement sur les bords des Labtek, et donc risquent de ne pas ou peu avoir été irradiées (rappelons que la fenêtre d'extraction est circulaire alors que les Labtek sont rectangulaires). Il faut donc être très attentif aux zones choisies ou changer le protocole d'acquisition d'image. C'est un point sur lequel nous devons travailler dans les prochains mois.

La Figure 57 présente le nombre de foci par noyau de la lignée SQ20B, irradiée avec des protons de 2,9 MeV, pour une dose de 2 Gy et un débit de dose de 2 Gy/min. Les carrés noirs pleins représentent les cellules irradiées. Les carrés noirs vides représentent les témoins. Les barres grises représentent l'écart type de la distribution, i.e. la largeur

de la distribution du nombre de foci par rapport à la valeur moyenne. Les barres (en noir et en vert) représentent l'incertitude statistique sur la valeur moyenne du nombre de noyau analysé. Enfin, les triangles verts sont les points issus des irradiations de la lignée SQ20B d'avril 2012 (2 Gy protons), que nous avons présenté dans la section 3.4.2.

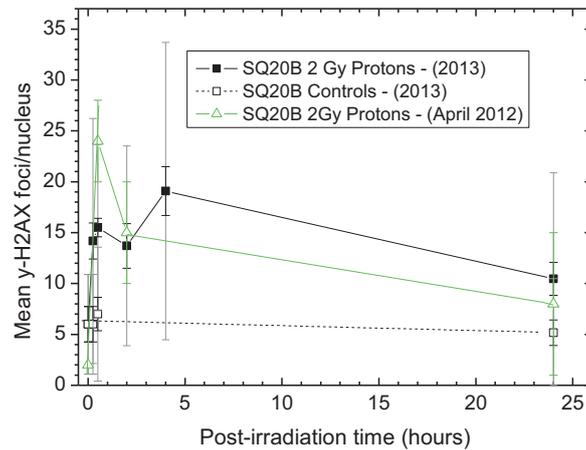


Figure 57 - Courbes de réparation de la lignée cellulaire SQ20B après irradiations à 2 Gy protons (2,98 MeV) (débit de dose 2 Gy/min). L'analyse et le comptage ont été faits avec la macro 5.0 en appliquant un seuil de 35 (FindMaxima). Les barres en gris (ou en vert) représentent la largeur de la distribution du nombre de foci par rapport à une valeur moyenne, et les barres en noires représentent l'incertitude statistique sur la valeur moyenne du nombre de noyaux analysés.

On voit sur ce graphique que la statistique n'est pas suffisante pour donner une conclusion pertinente du point de vue de la biologie. En revanche on peut proposer une piste de recherche.

En effet, plusieurs points sont à noter si l'on compare ce résultat à celui trouvé en avril 2012 (cf. 3.4.2) :

- pour les temps courts, il est difficile d'affirmer que le nombre de foci par noyau est le même, compte tenu des barres d'erreur importantes dans les deux cas. En revanche, on observe une phase croissante jusqu'au temps 30 minute après irradiation. Et les points 30 minutes et 2h après irradiation suivent bien la même tendance décroissante,
- avec une très grande réserve, on observe potentiellement un deuxième pic au temps 4h qui n'avait pas été mis en évidence pour les irradiations carbone (ni pour les irradiations protons car nous n'avions pas fait les temps 4h en avril 2012). Ce second pic a déjà été observé par d'autres biologistes (Thompson 2012). Cela viendrait du fait que la réparation des cassures double-brin passerait par une voie de recombinaison non homologue (NHEJ). Il y aurait recrutement du complexe Mre11-RAD50 qui créerait des cassures dans le cas où les extrémités de l'ADN nécessitent d'être remaniées avant ligature. Il faudra refaire cette expérience avec une meilleure analyse par microscopie (choix des champs) pour vraiment conclure à un tel résultat.

- enfin, après ce pic, on observe une phase de décroissance. Aux barres d'erreur près, le nombre de foci résiduels 24h après irradiation est équivalent à celui d'avril 2012 (environ 8 foci résiduels).

Pour conclure, la cinétique des foci sur ce graphe suit une même tendance (observée en avril 2012) sur certains points et de toute évidence la macro 5.0 semble fonctionner. Plus de statistique nous permettra de tirer des conclusions précises et d'interpréter le nombre de foci par noyau. Le pic du nombre de foci par noyau observé 4h après irradiation est à étudier en détail. Il faut refaire cette expérience pour pouvoir vraiment conclure sur un effet purement biologique, ou à un artéfact introduit par le protocole de seuillage en intensité *FindMaxima* ou encore, par le protocole d'acquisition des images (choix des zones). Cette nouvelle méthode d'analyse n'est pas tout à fait mise au point, et du travail reste à fournir pour bien maîtriser le problème avant de passer à une analyse 3D. En revanche, on peut dire que cette méthode est reproductible et nous maîtrisons tous les paramètres d'entrée, ce qui ouvre des perspectives à terme. En outre, par rapport à d'autres méthodes de comptage, le gain de temps est considérable. La partie la plus chronophage de ce travail reste l'acquisition des images qui est une étape délicate puisque que pour bien séparer deux (ou plusieurs) foci rapprochés il faut utiliser un microscope pourvu d'une très bonne résolution (X,Y et Z).

En résumé, nos premières expériences nous ont permis d'estimer une EBR à 10% de survie cellulaire, sur deux lignées HNSCC de radiosensibilités différentes, après irradiations protons de 2,9 MeV (Radiograaff). Les valeurs obtenues étaient  $1,27 \pm 0,21$  pour la lignée SCC61 et au plus 1,6 pour la lignée SQ20B. Ces études permettront de mieux comprendre la réponse cellulaire en fonction de la dose, du débit de dose et du rayonnement, ce qui sera utile notamment dans le cadre de la radioprotection, de la neutronthérapie et de l'hadronthérapie.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des irradiations protons sur ces mêmes lignées cellulaires mais, cette fois, dans le but de quantifier les dommages induits à l'ADN. Cette étude a pour but de comparer les dommages à l'ADN induits par les protons comparés aux dommages induits par les ions carbone. Cette expérience par comptage du nombre de foci  $\gamma$ -H2AX par noyau, nécessite d'être reproduite et analysée avec le plus grand soin pour pouvoir tirer des conclusions quantitatives. Enfin, nous avons mis en place un nouveau protocole d'analyse afin de s'affranchir des incertitudes introduites par le comptage manuel. Toutefois, nous devons apporter un certain nombre d'améliorations à cette méthode, tant sur le protocole de microscopie que sur le programme d'analyse automatisé.

En conclusion, ces études préliminaires montrent le potentiel de la plateforme Radiograaff pour les études des effets radio-induits (in-vitro) pour un rayonnement de TEL élevé.







# Conclusion et perspectives



## Conclusion et perspectives

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont présenté le développement de la ligne d'irradiation Radiograaff délivrant des protons de moyenne énergie pour des études en radiobiologie. Un des objectifs majeurs qui a motivé ce projet est l'amélioration des prédictions de la dose biologique pour une personnalisation future des traitements, en fonction des indicateurs de radiorésistance des tumeurs. Ainsi, une meilleure connaissance des effets sur les tissus tumoraux offre des perspectives pour le choix du rayonnement employé en fonction du type de tumeur, ainsi qu'une meilleure adaptation de la dose. Nous avons défini les tâches à réaliser en regroupant les exigences d'un point de vue de la physique, dans le développement de la ligne d'irradiation, ainsi que de la radiobiologie, principal sujet d'étude sur cette plateforme. Le but était de pouvoir irradier des cellules à l'air sur une surface de 2 cm<sup>2</sup> minimum avec une distribution spatiale de la fluence meilleure que  $\pm 5\%$  et une variation du TEL dans les noyaux cellulaires (20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au maximum) inférieure à  $\pm 10\%$ , tout en ayant les meilleures conditions expérimentales requises pour la biologie.

Dans un premier temps, nous avons conçu une ligne d'irradiation opérationnelle pour l'irradiation cellulaire à partir de l'accélérateur Van de Graaff 4MV de l'IPNL. Grâce à deux doublets de collimateurs et diffuseurs d'or, nous avons obtenu un flux de protons adapté aux irradiations cellulaires. En bout de ligne, le faisceau est extrait à l'air à travers une feuille mince (12  $\mu\text{m}$ ) de Mylar aluminisé de 25 mm de diamètre. Derrière cette fenêtre d'extraction se situent quatre fibres scintillantes placées sur les bords du faisceau diffusé et reliées à des fibres optiques, elles-mêmes reliées à des photomultiplicateurs, pour permettre le contrôle en ligne de la fluence. La mesure de l'énergie, l'évaluation de la fluence et la calibration du système de monitoring ont été effectuées avec des protons accélérés à 3,5 MeV utilisant un détecteur PIPS placé à l'air à la position des échantillons biologiques. La zone d'irradiation est entourée d'une enceinte thermostatée pour maintenir les cellules à 37 °C durant l'irradiation.

Avec le système de double diffusion, nous avons obtenu une fluence homogène à  $\pm 2\%$  sur une surface de 20 mm de diamètre. En minimisant l'énergie perdue pour diffuser et extraire le faisceau à l'air, nous pouvons irradier des cellules avec une variation du TEL entre l'entrée et la sortie du noyau cellulaire (20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au maximum), inférieure à  $\pm 9\%$ . Enfin, l'erreur sur la dose délivrée à l'entrée des cellules a été estimée à  $\pm 10\%$  (incluant l'incertitude sur la valeur théorique du TEL).

La plateforme Radiograaff constitue maintenant un outil pour étudier les effets radio-induits sur les cellules par des particules de TEL élevé. En outre, les conditions de pratique de la biologie sont appropriées avec la présence d'un laboratoire d'accueil de cultures cellulaires, ce qui est le point fort de l'installation.

Dans un deuxième temps, les premières irradiations cellulaires ont permis de valider les performances de la plateforme Radiograaff. Nous avons réalisé des courbes de survie cellulaire, qui ont permis de calculer les EBR à 10 % de survie pour les cellules SCC61 (radiosensibles) et les cellules SQ20B (radiorésistantes). Les valeurs obtenues étaient  $1,27 \pm 0,21$  pour la lignée SCC61 et au plus 1,6 pour la lignée SQ20B. Ces premières estimations, et en particulier les courbes de survie aux rayons X avec des doses plus élevées, doivent être reproduites pour réduire les incertitudes et vérifier la

reproductibilité du protocole et des résultats. Nous pouvons déjà en tirer un certain nombre d'informations. À l'heure actuelle, il est bien établi que l'EBR des protons de haut TEL est plus élevé que celui des rayons X (Belli et al. 1998; Paganetti et al. 2002; Belli 2000). Les valeurs d'EBR obtenues sont en accord avec les valeurs publiées. De plus, il a été observé que l'EBR augmente en fonction de la radiorésistance des cellules (Weyrather & Kraft 2004). Pour des irradiations protons, nous avons observé que comme cela avait été montré pour des irradiations par ions carbone (Beuve et al. 2008; Maalouf et al. 2009; Hanot et al. 2012), les cellules SQ20B restent toujours plus résistantes que les cellules SCC61.

Nous avons également commencé à étudier les dommages à l'ADN causés par les protons de 2,9 MeV grâce à l'étude du nombre de foci  $\gamma$ -H2AX par noyau en fonction du temps post-irradiation. Bien que le comptage des foci  $\gamma$ -H2AX ne soit pas une donnée suffisante pour conclure avec précision sur un type de dommages engendrés ou sur une voie de réparation suivie par le système cellulaire étudié, nous pouvons observer que les protons de TEL = 12,5 keV/ $\mu$ m induisent des dommages complexes à l'ADN. En effet, nous trouvons un nombre de foci résiduels élevé à 24h (avec une grande réserve compte-tenu des barres d'erreur), comparé aux irradiations par rayons X. Cette expérience devra être reproduite et analysée avec le plus grand soin pour pouvoir tirer des conclusions quantitatives.

Comme nous l'avons abordé dans la section discussion du chapitre 3, il nous semble indispensable de compléter cette étude en identifiant le ou les types de dommages à l'ADN. En outre, nous devons approfondir les recherches sur les voies de réparation qu'empruntent les cellules (par le marquage d'autres protéines qui ont un rôle dans la réparation de ces dommages), en particulier la lignée SQ20B, qui est sensible aux rayonnements de haut TEL.

Après expérimentation et réflexion, nous avons décidé de travailler sur de nouveaux protocoles d'analyse pour le comptage des foci  $\gamma$ -H2AX. Un des enjeux de cette étude est la reproductibilité du comptage d'une expérience à l'autre (cf. chapitre 3) et la recherche d'une automatisation pour l'analyse d'images à grande échelle. Nous avons élaboré une macro ImageJ en deux dimensions pour pouvoir valider certains paramètres, en nous appuyant sur des résultats obtenus précédemment (référence), à partir d'images acquises avec un microscope plein champ (2D). Cette étude préliminaire ne permet pas de déduire un résultat quantitatif, néanmoins, cette méthode d'analyse semble prometteuse puisqu'elle permet de s'affranchir des incertitudes introduites par le comptage manuel. En revanche, des efforts sont à entreprendre aussi sur la partie acquisition. Il faut, par exemple, s'assurer de ne pas introduire de biais en choisissant des zones où les noyaux ne sont pas à confluence. Peut être serait-il souhaitable d'ensemencer moins de cellules pour éviter une trop forte concentration dans certaines zones (problèmes de chevauchement).

Sur le plan instrumental, nous ne pensons pas que la ligne d'irradiation nécessite de modifications à court terme. Des améliorations seront apportées en fonction des futures expériences de radiobiologie. Néanmoins, nous souhaitons améliorer certains aspects comme : les supports cellulaires, l'enceinte thermostatée avec l'ajout d'une lampe UV pour permettre la décontamination avant la mise en place des échantillons ainsi que des voies d'arrivée de gaz pour pouvoir travailler sous hypoxie, par exemple.

Sur le plan radiobiologique, nous devons améliorer les protocoles ainsi que reproduire les expériences pour obtenir des résultats fiables. Il serait également intéressant d'ajouter une lignée cellulaire de radiosensibilité intermédiaire pour compléter l'étude en cours. Enfin, nous devons poursuivre les études sur les foci  $\gamma$ -H2AX, reproduire plusieurs fois l'expérience présentée dans ce manuscrit, et améliorer le protocole de microscopie ainsi que la méthode d'analyse. C'est pourquoi, nous finirons l'élaboration et la mise au point de la macro en trois dimensions pour pouvoir comparer les trois méthodes (manuelle, 2D et 3D) et déduire celle qui sera la plus adaptée à nos besoins.

Radiograaff est une plateforme qui s'inscrit dans le paysage actuel des lignes d'irradiation en France. Elle fait parti du réseau national des plateformes d'irradiation pour la dosimétrie et la radiobiologie. Elle peut contribuer à l'aboutissement des projets de recherche associés, comme par exemple, au LabEx PRIMES ou l'infrastructure nationale FranceHadron. Nous prévoyons l'accueil d'expériences plus variées en apportant, si besoin, des solutions et adaptations. Nous souhaitons bien entendu faire émerger des projets communs, comme la mise en place d'un microscope à force atomique entouré d'une enceinte thermostatée, au sein du laboratoire de biologie cellulaire ou encore l'imagerie des impacts d'ions. Des projets innovants permettront à la plateforme Radiograaff de favoriser son ouverture vers des partenaires des Sciences du Vivant.



## Références

- Alpen, E.L., 1997. *Radiation biophysics*, Access Online via Elsevier. Available at: [http://books.google.fr/books?hl=en&lr=&id=eaewy0-C9-cC&oi=fnd&pg=PP2&dq=alpen,+e.l.,+1998,+radiation+biophysics&ots=IPDv6jMGKq&sig=hUGkYf3fze\\_1VuOLqCQ00N4L8tg](http://books.google.fr/books?hl=en&lr=&id=eaewy0-C9-cC&oi=fnd&pg=PP2&dq=alpen,+e.l.,+1998,+radiation+biophysics&ots=IPDv6jMGKq&sig=hUGkYf3fze_1VuOLqCQ00N4L8tg) [Consulté le août 13, 2013].
- Alphonse, G. et al., 2002. Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to  $\gamma$ -radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant SQ20B cells. *International journal of radiation biology*, 78(9), p.821–835.
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), p.499–506.
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2004. Initiating cellular stress responses. *Cell*, 118(1), p.9–17.
- Barendsen, G.W. et al., 1966. The effect of oxygen on impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by ionizing radiations of different LET. *International Journal of Radiation Biology*, 10(4), p.317–327.
- Battermann, J.J. et al., 1981. Observations on pulmonary metastases in patients after single doses and multiple fractions of fast neutrons and cobalt-60 gamma rays. *European Journal of Cancer (1965)*, 17(5), p.539–548.
- Beebe, G.W., Kato, H. & Land, C.E., 1977. Life Span Study Report 8. *Radiation Effects Research Foundation Technical Report RERF TR*, p.1–77.
- Belli, D.B., 2000. Inactivation of human normal and tumour cells irradiated with low energy protons. *International journal of radiation biology*, 76(6), p.831–839.
- Belli, M. et al., 1987. Proton irradiation facility for radiobiological studies at a 7 MV Van de Graaff accelerator. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 256(3), p.576–580.
- Belli, M. et al., 1989. RBE-LET Relationship for the Survival of V79 Cells Irradiated with Low Energy Protons. *International Journal of Radiation Biology*, 55(1), p.93–104.
- Belli, M. et al., 1998. RBE-LET relationships for cell inactivation and mutation induced by low energy protons in V 79 cells: further results at the LNL facility. *International Journal of Radiation Biology*, 74(4), p.501–509.
- Benoit, D., 2008. *Mise au point et évaluation d'un système fibré de dosimétrie en ligne utilisant des matériaux phosphorescents stimulables optiquement. Application à la mesure de dose en radiothérapie et au monitoring de faisceaux*. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier. Available at: <http://thesesups.ups-tlse.fr/392/> [Consulté le février 11, 2013].

- Besserer, J. et al., 1999. An irradiation facility with a vertical beam for radiobiological studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 430(1), p.154–160.
- Bethe, H.A., 1937. Nuclear physics B. Nuclear dynamics, theoretical. *Reviews of Modern Physics*, 9(2), p.69.
- Beuve, Michael et al., 2008. Radiobiologic parameters and local effect model predictions for head-and-neck squamous cell carcinomas exposed to high linear energy transfer ions. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 71(2), p.635–642.
- Beuve, M et al., 2008. Radiobiologic Parameters and Local Effect Model Predictions for Head-and-Neck Squamous Cell Carcinomas Exposed to High Linear Energy Transfer Ions. *International Journal of Radiation OncologyBiologyPhysics*, 71(2), p.635-642.
- Bewley, D.K., 1968. A comparison of the response of mammalian cells to fast neutrons and charged particle beams. *Radiation research*, 34(2), p.446–458.
- Bird, R.P. et al., 1980. Inactivation of synchronized Chinese hamster V79 cells with charged-particle track segments. *Radiation Research*, 82(2), p.277–289.
- Blackwell, C.R. et al., 1998. Radiochromic film dosimetry: recommendations of AAPM radiation therapy committee task group 55. *Medical physics*, 25, p.2093.
- Blakely, E.A. et al., 1979. Inactivation of human kidney cells by high-energy monoenergetic heavy-ion beams. *Radiation research*, 80(1), p.122–160.
- Blanc, D. et al., 1997. *Les Rayonnements ionisants: détection, spectrométrie, dosimétrie*, Masson.
- Böcker, W. & Iliakis, G., 2006. Computational methods for analysis of foci: Validation for radiation-induced  $\gamma$ -H2AX foci in human cells. *Radiation research*, 165(1), p.113–124.
- Bolte, S. & Cordelieres, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, 224(3), p.213–232.
- Bouquet, F., Muller, C. & Salles, B., 2006. Report The Loss of  $\gamma$ -H2AX Signal is a Marker of DNA Double Strand Breaks Repair Only at Low Levels of DNA Damage. *Cell Cycle*, 5(10), p.1116–1122.
- Bragg, W.H. & Kleeman, R., 1905. XXXIX. On the  $\alpha$  particles of radium, and their loss of range in passing through various atoms and molecules. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 10(57), p.318–340.
- Buchholz, T.A. et al., 1992. The role of fast neutron radiation therapy in the management of advanced salivary gland malignant neoplasms. *Cancer*, 69(11), p.2779–2788.
- Butson, M.J. et al., 2003. Radiochromic film for medical radiation dosimetry. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 41(3-5), p.61–120.

- Cadet, J. et al., 1997. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 131*, p.1–87.
- Capp, J.-P. et al., 2006. The DNA polymerase  $\lambda$  is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 34(10), p.2998–3007.
- Carabe, A. et al., 2012. Range uncertainty in proton therapy due to variable biological effectiveness. *Physics in medicine and biology*, 57(5), p.1159.
- Cole, R.W., Jinadasa, T. & Brown, C.M., 2011. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nature protocols*, 6(12), p.1929–1941.
- Colliaux, A., 2009. *Implication de l'oxygène et des antioxydants dans le processus de radiolyse de l'eau induite par l'irradiation aux ions de haute énergie: simulations numériques pour la radiobiologie*. PhD thesis, Université Claude Bernard Lyon 1.
- Costes, S.V. et al., 2010. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1), p.78–87.
- Courtois, C., 2011. *Contrôle faisceau et dosimétrie en protonthérapie*. Université de Caen. Available at: <http://hal.in2p3.fr/tel-00638702/> [Consulté le février 6, 2013].
- Curtis, S.B., 1974. Radiation physics and evaluation of current hazards. *Space Radiation Biology and Related Topics, CA Tobias and P. Todd, Eds., Academic Press, New York*, p.21–99.
- Daftari, I. et al., 1999. An application of GafChromic MD-55 film for 67.5 MeV clinical proton beam dosimetry. *Physics in Medicine and Biology*, 44, p.2735.
- Daftari, I.K. et al., 1996. New UCSF proton ocular beam facility at the Crocker Nuclear Laboratory Cyclotron (UC Davis). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 380(3), p.597–612.
- Dörschel, B., Hartmann, H. & Kadner, K., 1996. Variations of the track etch rates along the alpha particle trajectories in two types of CR-39. *Radiation Measurements*, 26(1), p.51–57.
- Folkard, M., 1996. Inactivation of V79 cells by low-energy protons, deuterons and helium-3 ions. *International Journal of Radiation Biology*, 69(6), p.729–738.
- Folkard, M. et al., 1989. The Irradiation of V79 Mammalian Cells by Protons with Energies below 2 MeV. *International journal of radiation biology*, 56(3), p.221–237.
- Fromm, M. et al., 1991. Proton and alpha track profiles in CR39 during etching and their implications on track etching models. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part D. Nuclear Tracks and Radiation Measurements*, 19(1-4), p.163–168.

- Fukushima, Y. et al., 2006. Development of an easy-to-handle range measurement tool using a plastic scintillator for proton beam therapy. *Physics in Medicine and Biology*, 51, p.5927.
- Furusawa, Y. et al., 2009. Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated  $^3\text{He}$ -,  $^{12}\text{C}$ -and  $^{20}\text{Ne}$ -ion beams. Available at: [http://www.rrjournal.org/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1667%2F0033-7587\(2000\)154%5B0485%3AIOAAHC%5D2.0.CO%3B2](http://www.rrjournal.org/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1667%2F0033-7587(2000)154%5B0485%3AIOAAHC%5D2.0.CO%3B2) [Consulté le juillet 22, 2013].
- Golovkov, M. et al., 1997. *Fragmentation of 270 A MeV carbon ions in water*, GSI. Available at: <http://bio.gsi.de/PUBS/1997/1997f.conf.ps> [Consulté le août 12, 2013].
- Gray, L.H. & Read, J., 1942. The effect of ionizing radiations on the broad bean root. *British Journal of Radiology*, 15(169), p.11–16.
- Hanada, T. et al., 2007. Availability of a tool using CCD camera-plastic scintillator system in HDR for quality assurance. In *Nuclear Science Symposium Conference Record, 2007. NSS'07. IEEE*. p. 1443–1446.
- Hanot, M. et al., 2012. Glutathione Depletion and Carbon Ion Radiation Potentiate Clustered DNA Lesions, Cell Death and Prevent Chromosomal Changes in Cancer Cells Progeny. *PloS one*, 7(11), p.e44367.
- Hanot, M., 2008. Irradiation par microfaisceau de particules alpha : Implication des espèces réactives de l'oxygène dans l'effet de voisinage. Available at: <http://hal-cea.archives-ouvertes.fr/tel-00429902/> [Consulté le novembre 10, 2010].
- Heilmann, J. et al., 1996. Measurement of intracellular DNA double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 34(3), p.599–608.
- IAEA, T., 2000. 398. Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy: An International Code of Practice for Dosimetry based on Standards of Absorbed Dose to Water. *Vienna International Atomic Energy Agency*.
- ICRU, S.P., 1993. Ranges for Protons and Alpha Particles. *International Commission on Radiation Units and Measurements. Report*, 49.
- Jalade, P., 2005. *Mesures et modélisation des effets radiobiologiques des ions légers sur des cellules tumorales humaines: application à l'hadronthérapie*. Université Claude Bernard-Lyon I. Available at: <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00012047/> [Consulté le février 25, 2013].
- Jan, S. et al., 2011. GATE V6: a major enhancement of the GATE simulation platform enabling modelling of CT and radiotherapy. *Physics in Medicine and Biology*, 56(4), p.881–901.
- Jornet, N., Ribas, M. & Eudaldo, T., 2000. In vivo dosimetry: intercomparison between p-type based and n-type based diodes for the 16–25 MV energy range. *Medical physics*, 27, p.1287.

- K. Weyrather, S.R., 1999. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *International journal of radiation biology*, 75(11), p.1357–1364.
- LEE, J.Y. et al., 2007. Study on the tracks in a nuclear track detector (CR39) for detection of laser-induced charged particles. *Journal of the Korean Physical Society*, 51(1), p.426–430.
- Lee, R. et al., 2010. Complex exchanges are responsible for the increased effectiveness of C-ions compared to X-rays at the first post-irradiation mitosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 701(1), p.52–59.
- Lestand, L., 2012. *Etude de la mesure en ligne de l'activité Béta+ induite lors des traitements d'hadronthérapie, en vue de leur contrôle balistique*. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II. Available at: <http://hal.in2p3.fr/tel-00785229/> [Consulté le août 13, 2013].
- Löbrich, M., Cooper, P.K. & Rydberg, B., 1998. Joining of correct and incorrect DNA ends at double-strand breaks produced by high-linear energy transfer radiation in human fibroblasts. *Radiation research*, 150(6), p.619–626.
- Lorat, Y. et al., 2012. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PloS one*, 7(5), p.e38165.
- Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), p.251–260.
- Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J., 2011. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature cell biology*, 13(10), p.1161–1169.
- Mörtel, H. et al., 2002. Automation of the particle dosimetry and the dose application for radiobiological experiments at a vertical proton beam. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 489(1-3), p.503–508.
- Maalouf, Mira et al., 2009. Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 74(1), p.200–209.
- Maalouf, M. et al., 2009. Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 74(1), p.200–209.
- Maalouf, M., Durante, M. & Foray, N., 2011. Biological effects of space radiation on human cells: history, advances and outcomes. *Journal of radiation research*, 52(2), p.126–146.
- MacPhail, S.H. et al., 2003. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *International journal of radiation biology*, 79(5), p.351–359.

- Mercado-Uribe, H. et al., 2009. Experimental study of the response of radiochromic films to proton radiation of low energy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267(10), p.1849–1851.
- Mizoe, J. et al., 2004. Dose escalation study of carbon ion radiotherapy for locally advanced head-and-neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 60(2), p.358–364.
- Montecchi, M. & Ingram, Q., 2001. Study of some optical glues for the Compact Muon Solenoid at the large hadron collider of CERN. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 465(2), p.329–345.
- Moore, C.W. et al., 2000. DNA damage-inducible and RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 154(3), p.1085–1099.
- Neary, G.J., Tonkinson, S.M. & Williamson, F.S., 1959. The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on *Vicia Faba* Roots and the Effect of Oxygen: Part I. Reduction of Root Growth. *International journal of radiation biology*, 1(3), p.201–215.
- Noël, G. et al., 2003. Le traitement par neutrons: hadronthérapie partie II: bases physiques et expérience clinique. *Cancer/Radiothérapie*, 7(5), p.340–352.
- Olive, P.L., 1998. The role of DNA single-and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiation research*, 150(5s), p.S42–S51.
- Paganetti, H. et al., 2002. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 53(2), p.407–421.
- Pâques, F. & Haber, J.E., 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), p.349–404.
- Paull, T.T. et al., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 10(15), p.886–895.
- Piermattei, A. et al., 2000. Radiochromic film dosimetry of a low energy proton beam. *Medical physics*, 27, p.1655.
- Pignol, J.-P. et al., 1999. Beam collimation and bolusing material optimizations for  $> 10$  boron neutron capture enhancement of fast neutron (BNCEF): definition of the optimum irradiation technique. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 43(5), p.1151–1159.
- Pleinert, H., Lehmann, E. & Körner, S., 1997. Design of a new CCD-camera neutron radiography detector. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 399(2-3), p.382–390.

- Prasad, K.N., 1984. CRC handbook of radiobiology. Available at: [http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti\\_id=6019882](http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti_id=6019882) [Consulté le juillet 25, 2013].
- Puck, T.T. & Marcus, P.I., 1955. A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 41(7), p.432.
- Rasband, W.S., 2012. ImageJ: Image processing and analysis in Java. *Astrophysics Source Code Library*, 1, p.06013.
- Ritter, S. & Durante, M., 2010. Heavy-ion induced chromosomal aberrations: a review. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 701(1), p.38–46.
- Rogakou, E.P. et al., 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*, 146(5), p.905–916.
- Roots, R. et al., 1979. Impaired repair capacity of DNA breaks induced in mammalian cellular DNA by accelerated heavy ions. *Radiation Research*, 78(1), p.38–49.
- Rothkamm, K. & Löbrich, M., 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), p.5057.
- Ruchti, R.C., 1996. THE USE OF SCINTILLATING FIBERS FOR CHARGED-PARTICLE TRACKING. *Annual Review of Nuclear and Particle Science*, 46(1), p.281–319.
- Saini, A.S. & Zhu, T.C., 2004. Dose rate and SDD dependence of commercially available diode detectors. *Medical physics*, 31, p.914.
- Sarfehnia, A., Kawrakow, I. & Seuntjens, J., 2010. Direct measurement of absorbed dose to water in HDR Ir brachytherapy: Water calorimetry, ionization chamber, Gafchromic film, and TG-43. *Medical physics*, 37, p.1924.
- Savic, V. et al., 2009. Formation of dynamic  $\gamma$ -H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Molecular cell*, 34(3), p.298–310.
- Scampoli, P. et al., 2001. Low-energy light ion irradiation beam-line for radiobiological studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 174(3), p.337–343.
- Scharadt, D., Elsässer, T. & Schulz-Ertner, D., 2010. Heavy-ion tumor therapy: Physical and radiobiological benefits. *Reviews of modern physics*, 82(1), p.383.
- Schmid, T.E. et al., 2010. Differences in the kinetics of  $\gamma$ -H2AX fluorescence decay after exposure to low and high LET radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 86(8), p.682–691.

- Skarsgard, L.D. et al., 1967. Survival, chromosome abnormalities, and recovery in heavy-ion-and X-irradiated mammalian cells. *Radiation Research Supplement*, 7, p.208–221.
- Sorokina, S. et al., 2013. Relative biological efficiency of protons at low and therapeutic doses in induction of 53BP1/γH2AX foci in lymphocytes from umbilical cord blood. *International journal of radiation biology*, (0), p.1–8.
- Spencer, L.V. & Attix, F.H., 1955. A theory of cavity ionization. *Radiation Research*, 3(3), p.239–254.
- Stone, R.S., 1948. Neutron therapy and specific ionization. *The American journal of roentgenology and radium therapy*, 59(6), p.771.
- Thompson, L.H., 2012. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 751(2), p.158–246.
- Trojaa, S. et al., 2000. 2D and 3D dose distribution determination in proton beam radiotherapy with GafChromic TM film detectors. *Technology and Health Care*, 8, p.155–164.
- Tubiana, M. et al., 2005. *Dose-effect relationships and the estimation of carcinogenic effects of low doses of ionising radiation*, Joint Report No. Available at: [http://www.academie-medecine.fr/Upload/anciens/rapports\\_227\\_fichier\\_lie.rtf](http://www.academie-medecine.fr/Upload/anciens/rapports_227_fichier_lie.rtf) [Consulté le mars 19, 2013].
- Tubiana, M. et al., 2008. *Radiobiologie radiothérapie et radioprotection*, Paris: Hermann.
- Vatnitsky, S.M., 1997. Radiochromic film dosimetry for clinical proton beams. *Applied radiation and isotopes*, 48(5), p.643–651.
- Ward, J.F., 1988. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 35, p.95.
- Wéra, A.C. et al., 2008. Preliminary results of proton beam characterization for a facility of broad beam in vitro cell irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 266(10), p.2122–2124.
- Weyrather, W.K. & Kraft, G., 2004. RBE of carbon ions: experimental data and the strategy of RBE calculation for treatment planning. *Radiotherapy and Oncology*, 73, p.S161–S169.
- Wyman, C. & Kanaar, R., 2006. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.*, 40, p.363–383.
- Xiaojiao, D. et al., 2009. Calibration of CR-39 with monoenergetic protons. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 609(2-3), p.190–193.
- Zhao, L. & Das, I.J., 2010. Gafchromic EBT film dosimetry in proton beams. *Physics in Medicine and Biology*, 55, p.N291.

- Ziegler, J.F., Ziegler, M.D. & Biersack, J.P., 2010. SRIM—The stopping and range of ions in matter (2010). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(11), p.1818–1823.
- Zirkle, R.E. & Bloom, W., 1953. Irradiation of parts of individual cells. *Science See Saiensu*, 117. Available at: [http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti\\_id=4367518](http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti_id=4367518) [Consulté le août 13, 2013].

**Titre :** Développement de la plateforme Radiograaff d'irradiation protons pour des études en radiobiologie.

**Résumé :** Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été réalisés dans le cadre du développement d'une plateforme d'irradiation protons dédiée aux études en radiobiologie (Radiograaff) à partir de l'accélérateur Van de Graaff 4 MV de l'Institut de Physique Nucléaire de Lyon. Ceci, grâce à une collaboration étroite et interdisciplinaire entre les physiciens et ingénieurs de l'Institut de Physique Nucléaire de Lyon (IPNL) et des biologistes du Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (LRCM) du CHU de Lyon Sud. Afin de présenter le développement de la plateforme Radiograaff, ce manuscrit se découpera en trois chapitres.

Le premier chapitre présente les fondements de l'hadronthérapie et le contexte scientifique du projet. Nous traiterons, dans une première partie, de l'interaction ions-matière vivante afin de mieux cerner les concepts théoriques associés à l'hadronthérapie. Et nous présenterons, dans un second temps, les intérêts scientifiques et les objectifs du projet Radiograaff. Le deuxième chapitre concernera les développements instrumentaux de la ligne d'irradiation. Après avoir discuté du mode de délivrance et d'extraction du faisceau ainsi que des méthodes de simulation que nous avons employées pour le dimensionnement théorique la ligne d'irradiation, nous présenterons le système de contrôle de la dosimétrie. Le chapitre 2 sera conclu par les résultats de l'évaluation et de la qualification de la plateforme. Enfin, dans le troisième chapitre, après une brève présentation de quelques aspects de biologie et de radiobiologie, nous présenterons les premiers résultats obtenus concernant l'efficacité biologique relative des protons délivrés par la plateforme Radiograaff. Nous discuterons des protocoles, des conditions expérimentales ainsi que des méthodes d'analyse des résultats.

**Mots clés :** protons de moyenne énergie, dosimétrie, instrumentation, radiobiologie, dommages à l'ADN.

---

**Title :** Development of the proton irradiation platform Radiograaff for radiobiological studies.

**Abstract :** The work done in this thesis has been made in the development of a proton irradiation platform dedicated for radiobiological studies from the 4 MV Van de Graaff accelerator of the Institut de Physique Nucléaire de Lyon (IPNL). These developments have been made through a close interdisciplinary collaboration between physicists and engineers from IPNL and biologists from the Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (LRCM, CHU Lyon Sud). To present the development of Radiograaff platform, this manuscript will split into three chapters.

The first chapter introduces the basics of hadrontherapy and the scientific context of the project. In the first part of this chapter, we present the interactions between ion and matter in order to better understand the theoretical concepts associated with the hadrons. Then, we present the scientific interests and objectives of the Radiograaff project. The second chapter concerns the instrumental developments of the beam line. After discussing the delivery mode and beam extraction in air and simulation methods that we used to design the theoretical line radiation, we present the dosimetric monitoring system. The chapter 2 is concluded by the results of the evaluation and qualification of the platform. Finally, in the third chapter, after a brief presentation of some aspects of biology and radiobiology, we present the first results on the relative biological effectiveness of protons delivered by the Radiograaff platform. We discuss the protocols, experimental conditions and methods for analysing results.

**Keywords:** medium-energy protons, dosimetry, instrumentation, radiobiology, DNA damages.

---

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

Institut de Physique Nucléaire de Lyon (IPNL)  
Université Claude Bernard, Lyon 1  
4, rue Enrico Fermi. 69622 Villeurbanne.