

*ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE*

Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR 7178, CNRS

# THÈSE

Présentée par :

**Antoine DANVIN**

Soutenue le : **19 Septembre 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique / Chimie sous rayonnement

## **Effets du TEL et du débit de dose sur la radiolyse de l'eau et de biomolécules protéiques**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme DEL NERO Mirella**

Chargée de recherche, IPHC

**RAPPORTEURS :**

**Mme HOUEE-LEVIN Chantal**

Professeure, Université Paris-Saclay

**M BALDACCHINO Gérard**

Directeur de recherches, CEA Saclay

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M BARILLON Rémi**

Professeur, Université de Strasbourg

**M FROMM Michel**

Professeur, Université de Franche-Comté

**M VANDENBORRE Johan**

Chargé de recherches, Subatech

**M RAFFY Quentin**

Maître de conférences, Université de Strasbourg



---

## **Remerciements**

---

Ces trois années de thèse ont été une expérience unique, que j'ai pu traverser grâce aux personnes présentes à mes côtés. C'est avec beaucoup de gratitude que je veux écrire ces quelques mots, ou pages, pour vous remercier de votre soutien incroyable.

Merci à toutes les personnes de l'équipe de Radiochimie: Sylvia, Olivier, Tania, Maria, Jean-Marc et Rémi. Toutes les discussions que nous avons eues, scientifiques ou non, furent toutes d'excellents moments. J'ai passé trois magnifiques années à vos côtés dans l'équipe et vous allez tous me manquer.

Merci en particulier à Catherine, Philippe et Christophe pour votre aide et votre encadrement sur tous les aspects des expériences.

Catherine pour toute l'aide que tu m'as accordée sur la partie analyse et sur le traitement des données. Philippe et Christophe pour toute la partie technique sur les accélérateurs et les dispositifs d'irradiation. Votre aide fut précieuse.

Merci à Marie, Nicolas et Lorraine de l'équipe DESIS pour m'avoir aidé sur les aspects physiques du dépôt d'énergie par les rayonnements.

Merci à Chantal Houée-Levin et à Gérard Bablacchini d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit et de juger mon travail. Je remercie également Michel Fromm et Johann Vandenbroucke pour votre participation au jury de thèse et pour votre intérêt pour mon travail. Enfin, je remercie Rémi Barillon pour avoir présidé le jury de ma thèse.

Merci beaucoup à Séverine, pour toutes les expériences que l'on a réalisées ensemble. Je les ai beaucoup appréciées et je trouve que l'on formait une belle équipe.

Merci à tous les jeunes chercheurs rencontrés au laboratoire: Abdennourak, Mirna, Lise, Lucile, Aline, Yana, Pauline, Eren, Marc Lu, Eric, Virginie, Paul, Tristan et Romanin. L'ambiance était vraiment incroyable grâce à vous. Nos petites sorties m'ont beaucoup aidé dans les moments difficiles.

Merci à Shangyao, qui est arrivé presque en même temps que moi au laboratoire et qui m'a aidé tout au long de mon stage et de ma thèse. Tes bon conseils et nos discussions vont me manquer.

Merci à Séléma pour toutes nos discussions et rigolades. J'ai fait de très belles découvertes grâce à toi. Nos sorties au Comphrien étaient toujours un plaisir.

Merci à Mehdi, le petit (pas si petit) dernier de l'équipe des doctorants. Toujours présent lorsque j'avais besoin de toi, tes visites surprises dans le bureau avec un timing impeccable vont me manquer.

Immense merci à Chénélia, arrivée en tant que stagiaire M1 et maintenant doctorante également. Pour toutes nos discussions, rires, les sessions Moodle et tant d'autres moments. Pour les si nombreuses expériences d'irradiations réalisées ensemble, en tant que comme tu l'as si bien dit "duo formidable et efficace".

Merci à Yann et Dominique pour m'avoir permis de travailler aussi souvent sur la plateforme ATRCA et sur le 4MV. Merci pour m'avoir aidé à enrichir mon vocabulaire et mon esprit avec les mots créés, charades et autres devinettes pendant les irradiations.

Merci à Marc, Michel, Jacky et Gaël pour votre aide lors des expériences à CYRCE.

Merci à Abbas, Nicolas et Florent pour les expériences à Aerial et pour votre aide sur la dosimétrie.

Special Thanks to Satoshi and Tamon for your warm welcome, help and support during the experiments in Japan. Thank you for all discoveries even when the weather was cloudy. I really enjoyed my time here and that is because of you. I really look forward to meet you again and I hope that it will happen during the next steps of my career.

Merci à Mineille pour m'avoir permis de réaliser ma thèse sous ta direction et ton soutien depuis trois ans. Ta rigueur scientifique et les nombreuses conseils m'ont permis d'énormément progresser.

Enfin, je remercie chaleureusement Quentin pour ton accompagnement et encadrement depuis plus de trois ans. Rien tes si nombreux conseils sur la recherche et l'enseignement. Cette thèse fut une excellente expérience, et c'est en grande partie grâce à l'accompagnement auquel j'ai eu droit.

Plus qu'un encadreur, tu as été un mentor pour moi. C'est toi qui m'a donné envie de partager à mon tour mes connaissances et d'envisager une carrière d'enseignant-chercheur.

Merci à tous les copains de Strasbourg et Besançon: Marvin, Théo, Pablo, Marie, Monie, Tahir, Louis, Julia, Alex et Roman.

Je ne pense pas que j'en serais là où j'en suis aujourd'hui sans vous. Vous m'avez tellement aidé dans les épreuves que j'ai traversé ces dernières années, je vous en suis si reconnaissant.

Vous êtes l'une des plus belles choses qui me soit arrivées dans ma vie.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement les membres de ma famille.

Mes frères et sœurs, Sébastien, Lucien et Marie, mais surtout mes parents pour le soutien inconditionnel dont vous avez fait preuve depuis le tout début.

On dit que les amis sont la famille que l'on choisit, mais si j'avais eu le choix j'aurais choisi la même famille aussi.

Je vous aime.

Merci.

# Table des abréviations

Acronyme / Abréviation	Signification
2-OH-TA	2-hydroxy-terephthalate
7OH-C3CA	Acide 7-HydroxyCoumarine-3-Carboxylique
ACSI	Advanced Cyclotron Systems Inc.
ADAM	ADamantanAMine
BIO	BioRoom
BRETSEL	Bras de Récupération d'Echantillons Télécommandé à Supervision Electronique
C3CA / 3CCA	Acide Coumarine-3-Carboxylique
CAD	Charged Aerosol Detector
CI	Chambre d'ionisation
CNAO	National Center for Oncological Hadrontherapy
CONV	Débit de dose conventionnel
CYRCé	Cyclotron pour la Recherche et l'Enseignement
DAD	Diode Array Detector
DALY	Disability-Adjusted Life Years
DOPA	DihydrOxyPhénylAlanine
DR	Dose-Rate
Fmoc	FluorénylMéthOxyCarbonyle
FNTD	Fluorescent Nuclear Track Detectors
FT-IR	Fourier Transform-Infra Red spectroscopy
Gy	Gray (J/kg)
HIMAC	Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HT	HadronThérapie
IAEA	International Atomic Energy Agency
IBiSA	Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie
ICANS	Institut de Cancérologie de Strasbourg Europe
LTQ	Linear Trap Quadrupole
Met / M	Méthionine
MetO	Méthionine sulfoxyde
MEXP	Medium Energy Room
MS	Mass Spectrometry
NFK	N-Formyl-Kynurénine
OER	Oxygen Enhancement Ratio
PEEK	PolyEtherEtherKetone
PEIGNE	Portoir Essentiel pour l'Irradiation d'un Grand Nombre d'Echantillons
Phe / F	Phénylalanine

Acronyme / Abréviation	Signification
PHI	Physics room
PIC	1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-hydroxypyrrrolo[2,3-b]-indole-2-carboxylic acid
PRECy	Plateforme de Radiobiologie Expérimentale auprès de Cyrcé
QST	Institute of Quantum Science and Technology
RBE	Relative Biological Effectiveness
RI	Rayonnement ionisant
RISM	Radiation-induced second malignancies
ROS	Reactive Oxygenated Species
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RT	RadioThérapie
RX	Rayons X
SOBP	Spread-Out Bragg Peak
SRIM	Stopping and Range of Ions in Matter (logiciel)
TA	Terephthalate
TEL	Transfert d'Energie Linéique
TFA	TriFluoro Acetate
Trp / W	Tryptophane
UHDR	Ultra-High Dose-Rate
USI	Unité du Système International
UV-Vis	UltraViolet - Visible Spectroscopy
VdG	Van De Graaff



# Sommaire

<b>Remerciements.....</b>	<b>3</b>
Table des abréviations .....	7
Sommaire .....	9
<b>Introduction Générale.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre 1 - Contexte de l'étude : de l'interaction rayonnement matière à la radiolyse de biomolécules en contexte thérapeutique.....</b>	<b>21</b>
A/ Interactions rayonnement-matière.....	22
1/ Types de rayonnements .....	22
2/ Grandeurs caractéristiques.....	23
3/ Types d'interactions .....	27
B/ Utilisation en thérapie .....	34
1/ Effet au niveau cellulaire et extracellulaire .....	34
2/ Radiothérapie conventionnelle .....	38
3/ Hadronthérapie .....	39
4/ Thérapie FLASH.....	40
C/ Dépôt d'énergie dans l'eau – début de la chimie sous rayonnement .....	41
1/ Étape physique.....	43
2/ Étape physico-chimique .....	44
3/ Étape chimique .....	45
4/ Effets de la présence de solutés.....	49
5/ Étape Biologique .....	51
D/ Interactions avec le vivant : l'ADN et les lipides .....	53
1/ L'ADN .....	53
2/ Les lipides.....	54
E/ Interactions avec le vivant : les protéines.....	54
1/ Structure des protéines .....	55
2/ Altérations des acides aminés et de la structure primaire – effets indirects.....	59
3/ Effets sur les structures secondaires et au-delà .....	69
<b>Chapitre 2 - Plateformes et dispositifs d'irradiations et méthodes analytiques .....</b>	<b>71</b>
Abstract.....	72

A/ Les dispositifs d'irradiations sous faisceaux d'ions .....	73
1/ Dispositifs d'irradiations en milieu aéré.....	73
2/ Irradiations sous atmosphère contrôlée .....	78
B/ Plateformes d'irradiations .....	79
1/ Rayonnements de faible TEL : photons et électrons.....	79
2/ Les rayonnements de TEL moyen - Protons .....	83
3/ Les rayonnements de haut TEL - Ions lourds He et C.....	87
C/ Dosimétrie .....	91
1/ Dosimètres physiques .....	92
2/ Dosimètres chimiques.....	94
D/ Plateformes analytiques .....	95
1/ Les analyses « in situ » .....	95
2/ Le couplage HPLC-MS.....	96
E/ Les systèmes étudiés .....	97
1/ L'eau oxygénée.....	97
2/ Les sondes du radical hydroxyle.....	98
3/ Les biomolécules protéiques.....	100
F/ Les méthodes analytiques .....	102
1/ La radiolyse de l'eau .....	102
2/ Les biomolécules protéiques.....	103

### **Chapitre 3 - Utilisation de sondes moléculaires pour la mesure d'espèces de la radiolyse de l'eau.....109**

Abstract.....	110
A/ Determination of a scavenging probe suitable to investigate dose-rate effects on HO•	111
1/ Quantification of HO• with molecular probes.....	111
2/ Benchmarking of the probes .....	115
3/ Irradiation by 24 MeV protons .....	116
B/ L'eau oxygénée.....	124
1/ Etat de l'art .....	124
2/ Discussion sur l'usage des sondes méthanol et KBr .....	126
C/ Toward a new measurement of the solvated electron by an indirect method.....	129
1/ Context and principle .....	129

2/ First results.....	131
Conclusion partielle .....	134
<b>Chapitre 4 - Les effets de TEL.....</b>	<b>135</b>
Abstract.....	136
A/ Les effets de TEL sur la radiolyse de l'eau .....	137
1/ L'eau oxygénée - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	137
2/ Le radical hydroxyle – HO• .....	142
B/ Les effets de TEL sur les biomolécules protéiques .....	148
1/ La méthionine.....	148
2/ Le tryptophane.....	151
3/ De l'acide aminé au peptide : L'aspartame .....	159
Conclusion partielle .....	161
<b>Chapitre 5 - Evolution des rendements le long de la courbe de Bragg - Etude de la fragmentation des faisceaux d'ions.....</b>	<b>163</b>
Abstract.....	164
A/ Etat de l'art sur la fragmentation des ions.....	165
B/ Radiolyse de l'eau dans la trace .....	166
1/ Dépôt de dose mesuré et simulé .....	166
2/ L'eau oxygénée – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	168
3/ Le radical hydroxyle – HO• .....	171
4/ Vision globale de la radiolyse de l'eau.....	177
C/ Radiolyse de biomolécules le long de la trace d'ions – Cas du tryptophane .....	181
D/ Fragmentation sur une cible mince.....	183
1/ Fragments et radical hydroxyle en fonction de l'angle .....	184
1/ Fragments et phénylalanine .....	186
Conclusion partielle .....	189
<b>Chapitre 6 - Effets de débit de dose .....</b>	<b>190</b>
Abstract.....	191
A/ Etat de l'art sur les effets de débit de dose.....	192
1/ Radiolyse de l'eau .....	192
2/ Biomolécules.....	194
B/ Effet du débit de dose sur la radiolyse de l'eau .....	195

1/ L'eau oxygénée - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	195
2/ Le radical hydroxyle - HO• .....	197
3/ S'affranchir des effets sur les sondes organiques .....	202
C/ Effets du débit de dose sur la radiolyse de biomolécules .....	206
1/ La méthionine .....	206
2/ La phénylalanine .....	208
3/ Le tryptophane.....	211
Conclusion partielle .....	215
<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>217</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>221</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>243</b>

---

## **Introduction Générale**

---

Wilhelm Röntgen, en 1895, fut très certainement l'instigateur de la recherche et de la compréhension actuelle de la radioactivité et des rayonnements ionisants. Au cours de ses expériences sur des tubes à vide, où il étudiait la fluorescence de ceux-ci après application d'un courant, il observa pour la première fois un rayonnement capable de traverser une épaisse couche de papier noir recouvrant ces tubes (Röntgen, 1895, 1896). Ce rayonnement, alors totalement mystérieux, fut nommé "Rayons-X", la lettre x signifiant l'inconnu (Röntgen, 1897).

A travers d'autres expériences, il réalisa également que ces mêmes rayonnements pouvaient passer à travers les tissus du corps humain, laissant ainsi visibles les os (Röntgen, 1897). C'est ainsi qu'il fut capable de réaliser une photographie de la main de sa femme, Bertha, qui devint alors la toute première radiographie de l'Histoire (*Figure 0-1*). (Caramelo et al., 2018)

Cette découverte fut à l'origine d'une série d'expériences menées par Henri Becquerel, alors spécialiste de la luminescence et intrigué par les résultats de Röntgen. Ces expériences menèrent en 1896 à la découverte de la radioactivité émise par un sel d'uranium (Becquerel, 1896c, 1896d, 1896b, 1896e). Ces rayonnements furent alors nommés "rayons Uraniques", différents des phénomènes de luminescence car ne nécessitant pas d'exposition à la lumière et ayant une durée bien plus élevée (Becquerel, 1896a). La suite des travaux sur cette thématique a alors été confiée à l'étudiante en thèse de Becquerel, Marie Skłodowska (qui deviendra plus tard Marie Skłodowska-Curie)(Radvanyi & Villain, 2017). C'est elle qui nomma ce phénomène, radioactivité, en réalisant que l'Uranium n'était pas le seul élément capable d'émettre ces rayonnements car c'était également le cas du Thorium (M. Curie, 1898). Avec Pierre



*Figure 0-1 Radiographie de la main de Bertha Röntgen (Caramelo et al., 2018)*

Curie, ils découvrirent deux nouveaux éléments radioactifs : le polonium et le radium (P. Curie et al., 1898; P. Curie & Curie-Sklodowska, 1898). S'ensuivirent alors de nombreuses autres découvertes dans ce domaine, que ce soit par Marie et Pierre Curie ou d'autres chercheurs.

C'est également à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle qu'un autre rayonnement ionisant fut découvert : les électrons, en 1897 par Joseph John Thomson (Thomson, 1897). Ceux-ci avaient déjà été observés depuis plusieurs dizaines d'années, ils étaient alors appelés rayons cathodiques, mais c'est bien Thomson qui les a caractérisés et qui a réalisé qu'il s'agissait de corpuscules provenant des atomes des électrodes.

A l'aube du XX<sup>e</sup> siècle, les avancées et découvertes sur la radioactivité et les rayonnements ionisants se succèdent, permettant ainsi à la radioactivité de trouver des nombreux champs d'applications et de révolutionner plusieurs disciplines et d'en créer même de nouvelles : la radiochimie ou la radiobiologie.

Les propriétés impressionnantes des rayonnements de hautes énergies permirent le développement de plusieurs techniques médicales, notamment en utilisant les rayons X comme outils de diagnostic

sur les champs de bataille durant la Première Guerre Mondiale (*The History of Radiation*, s. d.). La radioactivité a également révolutionné le domaine de l'énergie en 1938 avec la découverte de la fission de l'Uranium par Otto Hahn, Fritz Strassmann et Lise Meitner (Hahn & Strassmann, 1939; Meitner & Frisch, 1939).

Cette découverte fut aussi malheureusement à l'origine du projet Manhattan en 1939 et donc du développement et de l'apparition des premières armes nucléaires, les bombes atomiques.

Le début du XX<sup>e</sup> siècle est aussi la période où fut réalisée la toute première expérience de radiolyse de l'eau (Ferradini & Jay-Gerin, 2011). Friedrich Giesel, en 1902, observa la décomposition de l'eau sous l'influence des rayonnements ionisants émis par un sel de radium (Giesel, 1902). Cette décomposition menait à un dégagement gazeux constitué de dioxygène et de dihydrogène. Cette expérience permit également de détecter de l'hélium dans ces dégagements gazeux, provenant de la désintégration du radium : les particules  $\alpha$ . Ces dernières n'étaient pas encore connues à l'époque, c'est seulement en 1909 que Rutherford démontra que ces dernières étaient des atomes d'hélium totalement ionisés (Rutherford & Royds, 1908). De nombreuses expériences ont été entreprises afin de déterminer l'origine de cette décomposition - les rayonnements  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  issus de la filiation radioactive du radium - et également quelles étaient toutes les espèces qui étaient formées au cours de celle-ci. Cette discipline est donc étudiée depuis plus d'une centaine d'années, et pourtant la compréhension de celle-ci ne cesse d'évoluer et d'être remise en question tant il s'agit d'un phénomène complexe.

Les premières hypothèses concernant les espèces formées au cours de la radiolyse de l'eau datent de 1914, lorsque Debiere supposa, à juste titre, que les molécules d'eau soumises aux rayonnements ionisants se dissociaient pour former  $H\cdot$  et  $HO\cdot$  (Debiere, 1914b). Ce n'est pourtant que plusieurs années plus tard que cette hypothèse fut reconnue suite à sa validation par d'autres scientifiques.

Les premières différences entre les effets des rayonnements ont par la suite rapidement été démontrées. Lorsque l'eau n'est soumise qu'à des rayons X, aucun dégagement gazeux n'est observé, et ce dégagement est bien moins important pour les particules  $\beta$  que pour les  $\alpha$ . Il s'agit bien évidemment ici de l'influence du Transfert d'Énergie Linéique (TEL) des différents rayonnements, grandeur bien connue aujourd'hui et qui sera discutée plus loin dans ce manuscrit (TEL). La compréhension des différents phénomènes mis en jeu lors de l'action de ces rayonnements s'améliore constamment, entre autres poussée par l'apparition et le développement de la radiobiologie. Cette discipline naquit en 1896 suite à l'expérience de Leopold Freund qui traita une enfant souffrant de *naevus pigmentosus*<sup>1</sup> avec les rayons X découverts l'année précédente par Röntgen (Birkenhake & Sauer, 1995).

Les propriétés néfastes des rayonnements ionisants, issus de la radioactivité ou non, ont aussi rapidement été mises en lumière, que ce soit sur des cas isolés, comme Henri Becquerel ou Pierre Curie qui subirent des brûlures, ou à plus grande échelle avec les "*radium girls*" ou les premiers mineurs d'uranium. Ce fut la découverte des premières tumeurs radio-induites.

---

<sup>1</sup> Malformation de la peau stable de forme circulaire (grain de beauté)

Avec les décès prématurés de plusieurs chercheurs travaillant sur la radioactivité et le nucléaire au début des années 1900, il devint alors critique d'étudier ces rayonnements, mais cette fois pour comprendre leurs effets sur le vivant et comment s'en protéger. La radioprotection apparut donc, afin d'établir les principes qui régiront l'utilisation des rayonnements ionisants et des corps radioactifs, et la radiobiologie connut un essor considérable, avec le développement des premières techniques de radiothérapie et de radiographie entre autres.

La radiobiologie jouait donc un rôle majeur dans ces avancées, car traitant justement des effets des rayonnements sur le vivant. Ces avancées permirent notamment à la radiobiologie de rencontrer le domaine de la génétique, avec les travaux de Hermann Joseph Muller sur les rayons X (Muller, 1928).

La recherche dans les différents champs d'applications des rayonnements ionisants, comme la radiobiologie ou la chimie sous rayonnement, a énormément progressé suite à l'essor conjoint de différents types d'accélérateurs de particules. Dans la période l'entre-deux guerres, plus précisément au début des années 1930, des accélérateurs de différentes natures sont apparus, permettant d'accéder à différents types de rayonnements, comme les protons, à des fluences plus importantes et à des énergies nettement plus élevées (de l'ordre de plusieurs MeV) que ce qui était alors disponible avec les sources radioactives naturelles (E. J. N. Wilson, 2001). Les accélérateurs s'étant le plus développés durant ces années sont ceux de type électrostatique, avec le générateur Cockcroft-Walton en 1932 (Bryant, s. d.) ou encore l'accélérateur de type Van De Graaff en 1931 (Van de Graaff *et al.*, 1933). Malgré leur relative simplicité et leur robustesse, raisons de leur essor si important à leur découverte, ils étaient limités en termes d'énergie atteignables de par la limitation imposée par les tensions maximales accessibles. Le cyclotron, proposé à la même période par E.O. Lawrence et N.E. Edlfsen (Lawrence *et al.*, 1930; Lawrence & Livingston, 1931, 1932), permet de pallier cette limite en donnant accès à des énergies plus élevées, mais mit cependant plus de temps à se démocratiser (E. J. N. Wilson, 2001). Ces révolutions technologiques furent ainsi le point de départ de nombreuses découvertes concernant les applications des rayonnements ionisants, pour la caractérisation/modification de matériaux ou encore pour la stérilisation. Toutefois, il fallut attendre la proposition du principe du synchrotron en 1943 par Mark Oliphant (Rotblat, 2000) pour disposer de faisceaux d'ions, dans un premier temps de protons, ayant une énergie suffisante pour être des candidats utilisables en radiothérapie, ce qui mènera par la suite à la naissance de l'hadronthérapie.

La radiothérapie utilisant les rayons X et  $\gamma$  s'est fortement développée et répandue, accompagnant les nombreux travaux de recherche sur ces rayonnements. On trouve dans la littérature de très nombreux travaux concernant la chimie sous rayonnement et la radiobiologie par des rayons X,  $\gamma$  ou électrons accélérés, par rapport aux études avec des ions, généralement plus récentes.

Bien que le principe de la thérapie par des ions accélérés ait été décrit dès 1946 (R. R. Wilson, 1946) c'est seulement à partir de la fin des années 80 que ces derniers ont commencé à être exploités comme traitement contre le cancer, au même titre que la radiothérapie par des photons ou électrons.



Présentant de nombreux avantages sur les photons, le traitement par des ions, désormais connu sous le nom de hadronthérapie, se développe conjointement à la radiothérapie « classique », utilisant principalement des rayons X.

Tandis que les photons déposent la majorité de leur énergie à l'entrée des tissus avec une dose qui décroît ensuite progressivement, les ions possèdent une propriété très intéressante symbolisée par le pic de Bragg : Ils déposent une faible dose en début de parcours puis atteignent un point spécifique où la dose déposée augmente brutalement, avant d'être complètement stoppés (Soltani-Nabipour, s. d.) (Figure 0-2). Le pic de Bragg est une zone de très fort TEL, dont la position dépend de l'énergie et de la nature des ions. De manière générale, les ions ont des TEL plus élevés que les électrons ou que les TEL équivalents des RX, qui sont donc considérés comme des rayonnements de « faible TEL ».

Cette propriété des ions est fondamentale en hadronthérapie, car elle permet de cibler plus efficacement des tumeurs localisées profondément dans le corps mais surtout de limiter les effets secondaires sur les tissus sains (Fokas *et al.*, 2009a). A côté de cet avantage « balistique » des ions, il

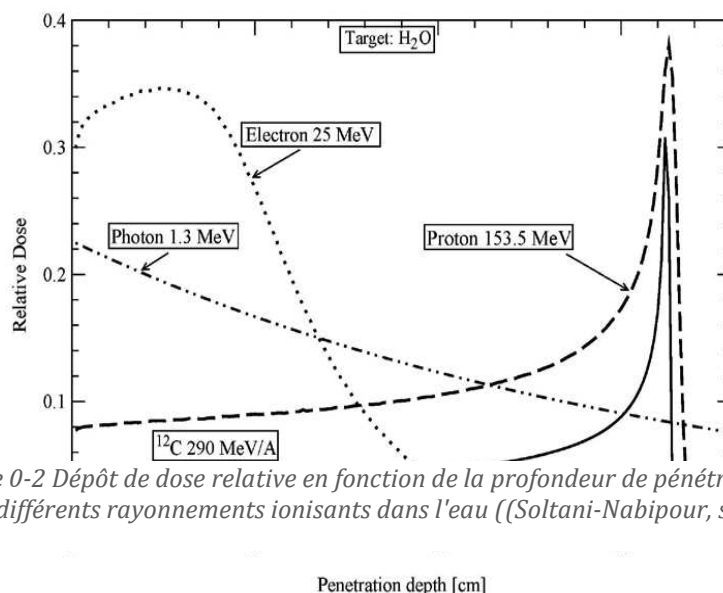


Figure 0-2 Dépôt de dose relative en fonction de la profondeur de pénétration pour différents rayonnements ionisants dans l'eau ((Soltani-Nabipour, s. d.))

a été démontré que des ions lourds, comme les ions carbone utilisés en thérapie, présentent une meilleure efficacité biologique, ou RBE (« *Relative Biological Effectiveness* »), pour détruire les tumeurs que les rayons X, à dose équivalente. Cette RBE est particulièrement importante dans le cas de tumeurs anoxiques.

L'hadronthérapie est largement étudiée à ce jour car beaucoup de phénomènes restent à comprendre, notamment à l'échelle moléculaire. L'enjeu principal de la recherche en radiothérapie, et la raison pour laquelle l'hadronthérapie est si intéressante, est la préservation des tissus sains au cours d'un traitement. La meilleure balistique des ions permet ainsi de réduire les dégâts sur les tissus en amont de la tumeur, où le dépôt de dose est faible et en aval, où aucune dose n'est déposée, si l'on ne tient pas compte des fragments engendrés.

De nombreux développements ont été menés en thérapie conventionnelle avec des rayons X ou des électrons pour améliorer également la préservation des tissus sains, comme la radiothérapie conformationnelle et l'étalement et fractionnement de la dose. Plus récemment, et encore à un stade de recherche, la thérapie FLASH est une modalité prometteuse pour améliorer la préservation des tissus sains. Celle-ci repose sur l'utilisation de débits de doses dits « ultra-élevés », au-delà de 40 Gray par secondes contre quelques Gray par minutes en thérapie conventionnelle (Favaudon *et al.*, 2014).

En réalisant des traitements à de tels débits de dose, les dommages sur les tissus sains sont considérablement réduits tout en maintenant l'efficacité de la destruction des tissus tumoraux (Vozenin, Hendry, *et al.*, 2019). Cette observation est appelée **effet FLASH**, dont les mécanismes biologiques, physiques ou chimiques sont encore mal compris. Cette modalité, bien qu'ayant déjà été utilisée pour traiter un être humain, n'est donc pas encore exploitée pour un usage en clinique.

Lorsqu'ils pénètrent dans l'organisme, les ions vont, comme précisé précédemment, progressivement déposer leur énergie en interagissant avec le milieu traversé. Ce dépôt va entraîner une excitation et une ionisation de la matière. Cette ionisation pourra être à l'origine d'un *effet direct* aux composants cellulaires, lorsque le rayonnement interagit directement avec ces molécules, ou pourra entraîner des dégâts par *effets indirects*. Ces derniers proviennent de la décomposition chimique de l'eau sous l'influence du rayonnement, appelée radiolyse de l'eau, qui mène à la formation d'espèces réactives pouvant réagir avec les biomolécules.

La compréhension de la radiolyse de l'eau et des phénomènes qui en découlent est donc nécessaire pour appréhender et expliquer les effets des ions sur les biomolécules, du moins en milieu assez dilué ( $< 1 \text{ M}$ ). Le dépôt d'énergie d'un rayonnement ionisant dans l'eau, quelle qu'en soit la nature, va conduire à la formation dans un premier temps d'eau excitée et ionisée ( $\text{H}_2\text{O}^*$  et  $\text{H}_2\text{O}^+$ ) puis à différentes espèces radicalaires (ex :  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{H}^\bullet$ ), moléculaires (ex :  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ), ou encore des électrons hydratés ( $e^-_{\text{aq}}$ ) (LaVerne, 1989; Tomita *et al.*, 1997). Ces espèces pourront alors réagir avec les différents constituants du matériel génétique de la cellule ou d'autres biomolécules via des réactions d'oxydation ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou de réduction ( $e^-_{\text{aq}}$ ). L'eau représentant 70% de la masse d'une cellule, ces effets sont donc particulièrement importants, estimés à près de 90% sous irradiations par des rayons-X (Korystov, 1992) pour expliquer les dégâts sur les cellules induits par un rayonnement. La mort de la cellule est généralement liée aux dégâts non réparés de l'ADN. Cependant, il a été montré que la cellule pouvait déclencher son apoptose (mécanisme d'autodestruction cellulaire), même lorsque l'ADN n'était pas touché directement (Fokas *et al.*, 2009a). Les protéines, qui représentent 20% de la masse de la cellule (soit les deux tiers du matériel restant en faisant abstraction de l'eau) sont statistiquement parmi les cibles majoritaires des dégâts, notamment par *effets indirects*. Elles sont d'ailleurs plus sensibles à l'oxydation, et donc aux réactions avec les radicaux, que l'ADN, et peuvent avoir un effet protecteur vis-à-vis du matériel génétique (Houée-Levin & Bobrowski, 2013).

Les effets de la radiolyse sur des biomolécules ont été fortement étudiés à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, mais ces études ont quasi-exclusivement toutes été menées avec des irradiations par des photons X ou  $\gamma$ , certaines avec des électrons mais très peu avec des ions.

L'étude et la compréhension des mécanismes mis en jeu à la suite de l'irradiation par des ions accélérés est donc encore un secteur très peu exploré et qui doit nécessairement l'être afin de progresser dans le domaine de la thérapie contre le cancer. De la même façon, les effets de débit de dose seront étudiés avec attention durant ce travail car ils sont eux aussi potentiellement responsables de différences majeures sur les mécanismes découlant de l'action d'un rayonnement et ce aux différentes étapes suivant cette interaction (*Figure 0-3*).

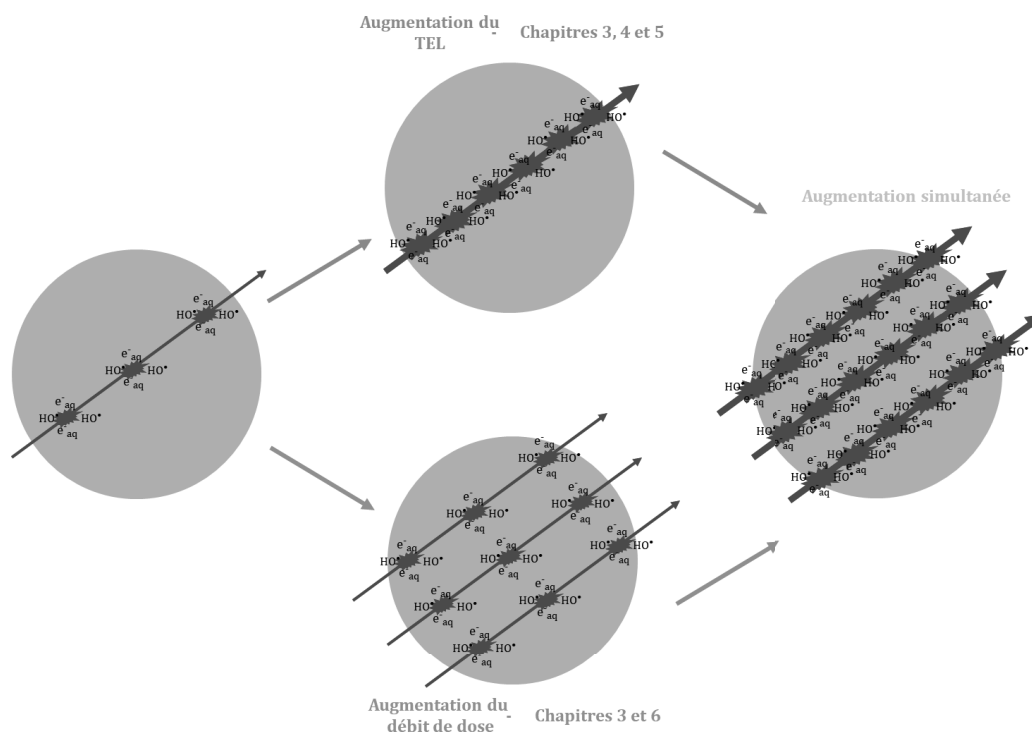


Figure 0-3 Schéma des effets du TEL et du débit de dose sur la densité de formation des espèces issues de la radiolyse de l'eau.

C'est dans ce cadre de radiothérapie externe, et plus précisément d'hadronthérapie et de thérapie FLASH que s'inscrit cette thèse, intitulée « Effets du TEL et du débit de dose sur la radiolyse de l'eau et de biomolécules protéiques ». L'objectif de ce travail est ainsi d'étudier les mécanismes moléculaires de radiolyse de petites molécules protéiques, en passant par une étude avancée de la radiolyse de l'eau, première étape physico-chimique de l'interaction rayonnement matière en milieu aqueux dilué. Les mesures de radiolyse de l'eau et de biomolécules seront réalisées systématiquement dans les mêmes conditions, afin d'identifier d'éventuelles spécificités des effets du TEL ou du débit de dose sur les mécanismes moléculaires de ces biomolécules. L'acquisition de ces données concernant la radiolyse de l'eau permettront également d'agrémenter les codes de simulations, notamment dans le cadre de la collaboration Geant4-DNA.

Le premier chapitre de cette thèse sera dédié à la contextualisation du travail de thèse dans le thème thérapeutique ainsi qu'aux principes de la chimie sous rayonnement. Les premières étapes de l'interaction rayonnement-matière y seront ainsi décrites, jusqu'aux effets des rayonnements ionisants sur le vivant dans un contexte thérapeutique. La radiolyse de l'eau y sera discutée à travers les différentes étapes du dépôt d'énergie dans l'eau et des dégâts indirects liés à cette radiolyse sur différentes biomolécules.

Le second chapitre portera sur la présentation de la partie technique. Les dispositifs expérimentaux d'irradiation, les installations, ainsi que les mesures chimiques et les protocoles analytiques y seront présentés en détail.

Le troisième chapitre portera sur les effets du débit de dose, plus particulièrement sur l'usage de sondes moléculaires pour la mesure des espèces de radiolyse de l'eau à différents débits de dose. L'essentiel de la discussion portera sur la détermination d'une sonde du radical hydroxyle indépendante des effets de débit de dose, et donc utilisable pour mesurer l'effet de ce paramètre sur les rendements en HO<sup>•</sup>. La validation de ces mesures nous permettra alors d'étudier plus spécifiquement la radiolyse de biomolécules protéiques dans les mêmes conditions.

Le chapitre 4 portera sur les études en fonction du TEL sur la radiolyse de l'eau (HO<sup>•</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des biomolécules (méthionine, tryptophane, aspartame). Comme pour les effets liés au débit de dose, la mesure de la radiolyse de l'eau et de la radiolyse des biomolécules est effectuée dans des conditions aussi identiques que possible. Plusieurs faisceaux de natures différentes ont été utilisés, et une part importante de la discussion portera sur la différenciation complexe des effets de TEL et de débit de dose.

Le chapitre 5 portera spécifiquement sur l'étude de l'évolution des rendements et des mécanismes le long de la trace d'ions C 400 MeV/nu et He 230 MeV/nu, du plateau jusqu'au-delà du pic de Bragg. Le long de cette trace, les ions voient leur TEL augmenter et se fragmentent simultanément, particulièrement les ions carbone. Il s'agira ainsi d'une étude plus proche encore de la thérapie, avec des ions et énergies du type de ceux utilisés pour les traitements. Les effets chimiques de la fragmentation d'ions alpha sur une cible fine ont également été étudiés, en fonction de l'angle par rapport au faisceau d'ions.

La mesure du radical hydroxyle à différents débits de dose ayant été validée dans le chapitre 3, le chapitre 6 portera sur l'étude des effets du débit de dose sur la radiolyse de l'eau et d'acides aminés sous différents faisceaux. La mesure systématique de la radiolyse de l'eau et des biomolécules permettra d'identifier des effets spécifiques sur la radiolyse des acides aminés. Les résultats concernant la méthionine, la phénylalanine et le tryptophane seront détaillés.

---

**Chapitre 1 - Contexte de l'étude : de  
l'interaction rayonnement matière à la  
radiolyse de biomolécules en contexte  
thérapeutique**

---

Ce premier chapitre de thèse sera consacré à présenter les principes de l'interaction rayonnement ionisant –matière, des interactions primaires jusqu'aux effets chimiques observés sur les biomolécules protéiques. Les interactions primaires des différents rayonnements ionisants seront discutées en fonction de leur nature, permettant de mettre en avant leurs spécificités. Cette thèse s'inscrivant dans un contexte radiothérapeutique, ce dernier sera également passé en revue afin de mieux contextualiser ces travaux de thèse.

## A/ Interactions rayonnement-matière

Tout phénomène chimique ou encore biologique lié à l'action d'un rayonnement ionisant est précédé par l'interaction primaire entre le rayonnement et la matière, pendant laquelle le rayonnement ionisant va déposer son énergie.

Le terme de *rayonnement ionisant* (RI) se réfère à toute particule d'énergie supérieur à 100 électrons volts (eV), quelle que soit la nature du rayonnement considéré (Choppin *et al.*, 2013a). L'énergie nécessaire à la réalisation d'une ionisation étant inférieure à 15 eV, un rayonnement ionisant se définit donc comme un rayonnement capable de causer plusieurs ionisations lors de son passage à travers la matière. Un rayonnement massif termine son parcours par une *thermalisation*, lorsque son énergie cinétique devient équivalente à celle des constituants du matériau traversé.

### 1/ Types de rayonnements

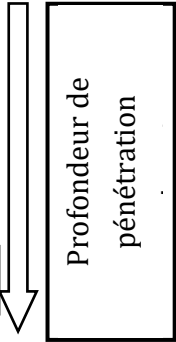
Les rayonnements ionisants peuvent être classés de différentes manières. L'une des classifications les plus évidentes se base sur la charge des particules. On distinguera alors les rayonnements chargés, constitués des ions et des électrons, des rayonnements neutres, constitués des photons et des neutrons. Cette distinction est importante car neutrons et photons peuvent être considérés comme des rayonnements *indirectement ionisants*. L'ionisation de la matière découlant de leur traversée du matériau irradié provient en effet plutôt d'émissions de rayonnements secondaires (Dertinger & Jung, 1970a). Les photons vont transmettre une part de leur énergie aux électrons des molécules cibles, qui seront éjectés avec une énergie cinétique variable, tandis que les neutrons réagissent uniquement par interaction nucléaire, en étant capturés par les noyaux des atomes cibles ou en entraînant l'émission de protons de recul.

On peut aussi distinguer d'une part les rayonnements massifs, ions, électrons et neutrons qui possèdent une masse, et de l'autre les rayonnements de nature électromagnétique, photons X et  $\gamma$ . Enfin, les rayonnements ionisants sont parfois considérés différemment selon leur mode d'interaction avec la matière. Les neutrons, qui interagissent avec le noyau des éléments seront alors considérés à part des autres rayonnements qui interagissent avec les nuages électroniques de la matière traversée. Une classification mélangeant ces différents critères de sélection est présentée dans le Tableau 1-1. Au final, toutes ces considérations sont à prendre en compte car tous ces critères auront un impact sur l'interaction rayonnement-matière des différents RI.

Les neutrons sont ainsi généralement considérés à part, en raison de leur mode d'interaction nucléaire et de leur nature massive non chargée.

Tableau 1-1 Tableau récapitulatif des rayonnements ionisants classés selon leur profondeur de pénétration dans la matière

	Rayonnement	Désintégration associée	Charge	
Chargé	Protons H <sup>+</sup>	/	1	Ions
	Ions He / $\alpha$	$\alpha$	2	
	Ions C	/	6	
Neutre	Électrons	$\beta$	-1	Photons
	Rayons $\gamma$	$\gamma$	0	
	Rayons X	/	0	
	Neutrons	/	0	



La séparation entre les RI restants se fait ensuite selon la nature corpusculaire, avec d'un côté les photons X et  $\gamma$  et de l'autre côté les électrons et les ions. Les rayons X et les rayons  $\gamma$  sont très souvent distingués les uns des autres malgré leur nature identique, les rayons  $\gamma$  provenant de désexcitations nucléaires, et les rayons X d'interactions électroniques.

On distingue également électrons et ions, essentiellement en raison des fortes différences de densité de dépôt d'énergie, ou TEL.

Avant d'expliquer en détail les différentes interactions des rayonnements ionisants avec la matière, plusieurs grandeurs caractéristiques sont à définir.

## 2/ Grandeurs caractéristiques

La première grandeur qui nous intéressera ici est celle qui permettra de déterminer la probabilité d'une interaction : la section efficace.

### Section efficace

La section efficace, notée  $\sigma$ , décrit la probabilité pour qu'une interaction entre particules ait lieu. Il s'agit d'une grandeur assimilée et homogène à une surface, exprimée en m<sup>2</sup> en unité du système international (USI) mais que l'on retrouvera plus généralement exprimée en *barn*, où 1b = 10<sup>-28</sup> m<sup>2</sup>. Cette valeur provient de la surface d'un noyau utilisée lors des estimations des sections efficaces. En effet, en considérant  $6 \times 10^{-15}$  m comme étant la valeur moyenne du rayon d'un noyau, la surface à considérer pour l'interaction avec un rayonnement (correspondant à la surface d'une tranche de la sphère qu'est un noyau) sera donc  $\pi r^2$  soit 10<sup>-28</sup> m<sup>2</sup>.

Au final, la probabilité d'une interaction (notée  $w$ ) correspondra ainsi à la section efficace d'un événement multiplié par le nombre de cibles potentielles pour cet événement (noté  $N_{\text{cible}}$ ), divisé par la surface totale de la cible (Equation 1-1).

Equation 1-1

$$w = \frac{\sigma \times N_{\text{cible}}}{S_{\text{totale}}}$$

Cependant, il n'est ici considéré qu'une surface exposée à un rayonnement, alors qu'en réalité c'est bien un volume qui sera à prendre en compte. Nous utiliserons alors la notion de section efficace macroscopique, notée  $\Sigma$  et homogène à l'inverse d'une distance ( $m^{-1}$ ). En considérant le volume comme une succession de plans d'épaisseur correspondant à celle d'une cible, il est possible d'exprimer  $\Sigma$ , la section efficace macroscopique en fonction de  $\sigma$  (alors appelée section efficace microscopique) selon l'Equation 1-2

$$\text{Equation 1-2} \quad \Sigma = \sigma \times N_v$$

Où  $N_v$  correspond à la densité volumique de cible pour l'interaction considérée.

La section efficace dépend de la particule considérée, de son énergie (la section efficace diminuant avec l'énergie de la particule incidente) et de la nature de l'interaction considérée. La température peut également avoir un impact sur certaines sections efficaces (O'Brien, 1996). Enfin, le TEL d'une particule pourra également modifier la section efficace d'une interaction. (Liu *et al.*, 2014).

### TEL

Le TEL, ou Transfert d'Énergie Linéique, est une grandeur propre aux rayonnements ionisants chargés et se définit comme l'énergie absorbée par la matière par unité de distance traversée par une particule du rayonnement ionisant (Equation 1-3).

$$\text{Equation 1-3} \quad TEL = \frac{dE_{abs}}{dx}$$

Où  $E_{abs}$  correspond à l'énergie absorbée par le matériau traversé.

Cette grandeur est souvent assimilée au pouvoir d'arrêt, qui correspond quant à lui à l'énergie déposée ou perdue par la particule lorsqu'elle traverse le matériau considéré. Bien que ces deux concepts soient très proches, ils peuvent être différenciés selon l'Equation 1-4.

$$\text{Equation 1-4} \quad TEL = \frac{dE_{abs}}{dx} = \frac{dE_{loss}}{dx} + E_x$$

Où  $dE_{loss}/dx$  correspond au pouvoir d'arrêt et  $E_x$  est lié à l'énergie perdue par émission de rayonnement électromagnétique (Bremsstrahlung) ou par émission d'électrons secondaires. Ainsi, en chimie sous rayonnement et particulièrement dans le cas de l'étude de solutions aqueuses et de liquides, TEL et pouvoir d'arrêt sont souvent assimilés l'un à l'autre.

L'emploi du terme TEL dans la suite de ce manuscrit notamment dans le cas de l'étude de l'effet de ce dernier sur les rendements radiolytiques mesurés fera en réalité référence au pouvoir d'arrêt.

Ce pouvoir d'arrêt, aussi appelé perte d'énergie différentielle, peut être calculé selon l'équation de Bethe-Bloch (Equation 1-5) :



$$\text{Equation 1-5} \quad -\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^2 (ze)^2}{m_e v^2} n Z \left[ \ln \frac{2m_e v^2}{I} - \ln(1 - \beta^2) - \beta^2 \right]$$

(Dertinger & Jung, 1970c)

Où :

- $m_e$  est la masse au repos de l'électron
- $v$  la vitesse de la particule incidente
- $ze$  la charge de la particule ( $z$  étant le nombre de charge et  $e$  la charge élémentaire,  $1.602 \times 10^{-19}$  C)
- $n$  le nombre d'atomes par  $\text{cm}^2$
- $Z$  le numéro atomique ou nombre de charge effectif de la cible
- $I$  le potentiel d'ionisation moyen
- $\beta = v/c$  avec  $c$  la vitesse de la lumière, soit la vitesse relativiste de la particule

Il apparaît ainsi que le pouvoir d'arrêt dépend du milieu traversé de par sa densité atomique et donc électronique, et également fortement de la vitesse et de la charge de la particule incidente. La perte d'énergie sera ainsi d'autant plus élevée que la particule aura une vitesse faible et une charge importante. La masse de la particule incidente n'a donc pas d'influence sur son pouvoir d'arrêt.

Cette expression nécessite toutefois l'apport d'un terme supplémentaire. En effet, avec une vitesse de particule incidente tendant vers 0 en fin de parcours, le pouvoir d'arrêt tendrait vers l'infini ( $\lim_{x \rightarrow 0} \frac{1}{x} = +\infty$ ). Cette incohérence aux faibles vitesses provient du fait qu'une charge constante est considérée pour la particule incidente, ce qui n'est en réalité pas le cas. En effet, à mesure que sa vitesse décroît, la particule ionisante chargée verra sa probabilité de capturer un électron de la cible croître, réduisant ainsi sa charge et donc la charge moyenne effective du rayonnement ionisant global. L'ajout d'un terme décrivant la charge « effective » de la particule selon sa vitesse permet ainsi de préciser la première version de l'équation de Bethe-Bloch :

$$\text{Equation 1-6} \quad z_{eff} = z [1 - \exp(-125 \beta z^{-2/3})]$$

L'Equation 1-6, théorisée par Barkas, permet ainsi à l'équation entière, en remplaçant  $z$  par  $z_{eff}$ , d'avoir un pouvoir d'arrêt qui tend vers 0 lorsque la vitesse tend elle aussi vers 0 ((Barkas *et al.*, 1963)). Cela permet de préciser mathématiquement l'existence du **Pic de Bragg** car  $-dE/dx$  atteint un maximum en fin du parcours des particules, avant de tendre vers 0.

Le TEL est un paramètre intrinsèque aux rayonnements chargés particulièrement important vis-à-vis des espèces formées durant la radiolyse.

Dans le cas des photons, ces derniers n'ont pas de TEL à proprement parler et sont caractérisés par un TEL équivalent, correspondant au TEL moyen des électrons secondaires émis.

Toutefois, tel qu'il est défini, le TEL est un paramètre unidimensionnel et ne tient donc pas compte de la distribution radiale du dépôt d'énergie de la particule ionisante incidente par les électrons secondaires émis (

Étape physique).

La différence dans le dépôt d'énergie des rayonnements les rendra plus ou moins pénétrant. Pour une même énergie, les ions de par leur TEL élevé auront un parcours très limité dans la matière, parcours qui sera plus long pour les électrons de par leur TEL faible. Les photons, ne possédant pas de TEL à proprement parler mais étant plutôt caractérisés par le TEL des électrons secondaires qu'ils créent, auront une profondeur de pénétration beaucoup plus importante, tout comme les neutrons, qui ont des probabilités d'interaction avec la matière beaucoup plus faibles (*Figure 1-1*)

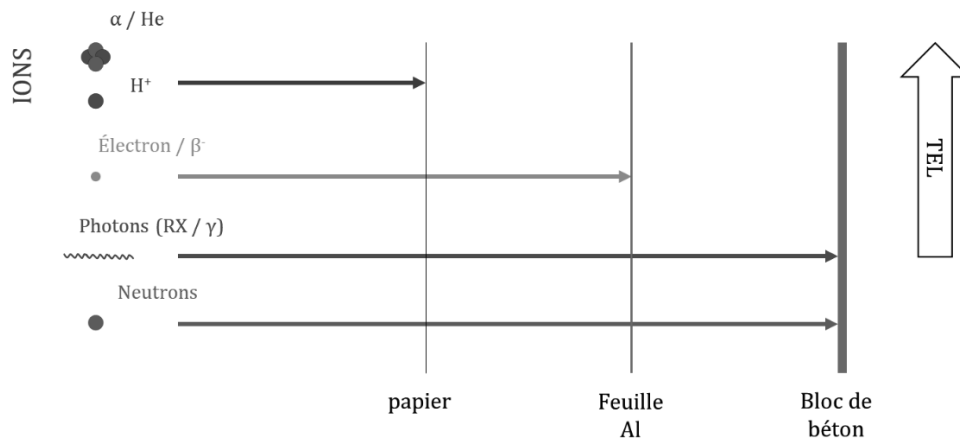


Figure 1-1 Pénétration des différents rayonnements ionisants

$$Z_{eff}^2/\beta^2$$

Pour pallier l'absence de représentation des électrons secondaires émis lors du dépôt d'énergie tout autour de la trace du rayonnement incident dans le TEL et le pouvoir d'arrêt, Katz proposa en 1970 le paramètre  $Z_{eff}^2/\beta^2$  (Katz, 1970). En effet, une grande partie de l'énergie étant déposée par les électrons secondaires et non par la particule incidente elle-même, le pouvoir d'arrêt ne tient pas compte d'une part importante du dépôt d'énergie. Des ions lourds de très haute énergie et ayant un TEL équivalent à des protons d'énergie plus faible formeront ainsi des électrons beaucoup plus énergétiques, et dont le parcours sera plus important. La densité de dépôt autour de la trace sera donc au final nettement plus faible.

Le premier terme,  $Z_{eff}$  est relié à la densité de dépôt d'énergie dans la trace du rayonnement incident tandis que  $\beta$ , en lien avec la vitesse et donc l'énergie cinétique, représente l'énergie des électrons secondaires (Yamashita *et al.*, 2010). Ce paramètre corrige ainsi partiellement l'écart souvent observé entre des ions de même TEL mais n'ayant pas la même énergie (Appleby & Christman, 1985).

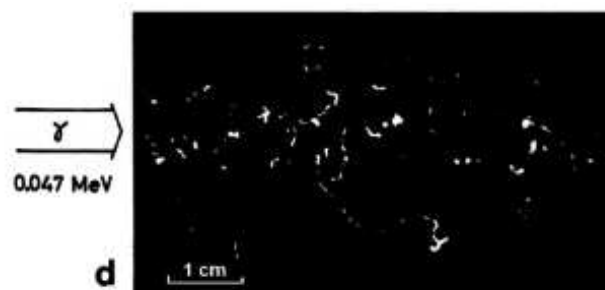
### 3/ Types d'interactions

Comme évoqué précédemment, la nature du rayonnement ionisant est au cœur de la détermination de l'interaction qui découlera de sa rencontre avec la matière. Ce n'est toutefois pas le seul critère, car plusieurs types d'interactions sont possibles pour un rayonnement de nature définie.

#### Photons

Lors de leur pénétration dans la matière, les photons (X ou  $\gamma$ ) vont interagir avec la matière de différentes façons. Les rayonnements ne pénétreront pas dans la matière avec un flux constant et une énergie individuelle décroissante, certaines particules étant complètement stoppées après quelques nm là où d'autres parcourent plusieurs cm sans réaliser d'interaction. Ces faisceaux seront donc **atténués** lors de leur traversée de la matière et non pas **dégradés** comme c'est le cas pour les rayonnements chargés.

Ces interactions seront souvent à l'origine de la formation d'électrons secondaires de haute énergie. En raison de leur absence de masse, les photons ne créeront que peu d'événements d'interactions au cours de leur passage et la grande majorité des interactions se feront via les électrons secondaires émis lors des interactions primaires des photons avec la matière. Leur dépôt d'énergie aura ainsi une densité très faible et sera très diffus (*Figure 1-2*).



*Figure 1-2 Trace de rayons  $\gamma$  dans une chambre à brouillard remplie de méthane (Gentner et al., 1940)*

Quatre modes d'interaction sont possibles pour les photons, qui entraînent leur atténuation.

La première interaction est la diffusion élastique, impliquant une conservation de l'énergie du photon, aussi appelée diffusion de Bragg ou de Rayleigh (*Figure 1-3-a.*). Durant cette diffusion, le photon incident est transitoirement absorbé par la cible et immédiatement réémis par cette même cible. Le photon ainsi émis possède exactement l'énergie du photon incident, mais sa direction est aléatoire. La probabilité de réalisation de cette diffusion dépend de l'énergie du rayonnement et de la nature de l'atome cible. Elle va diminuer avec l'énergie du photon et augmenter avec le numéro atomique du matériau traversé.

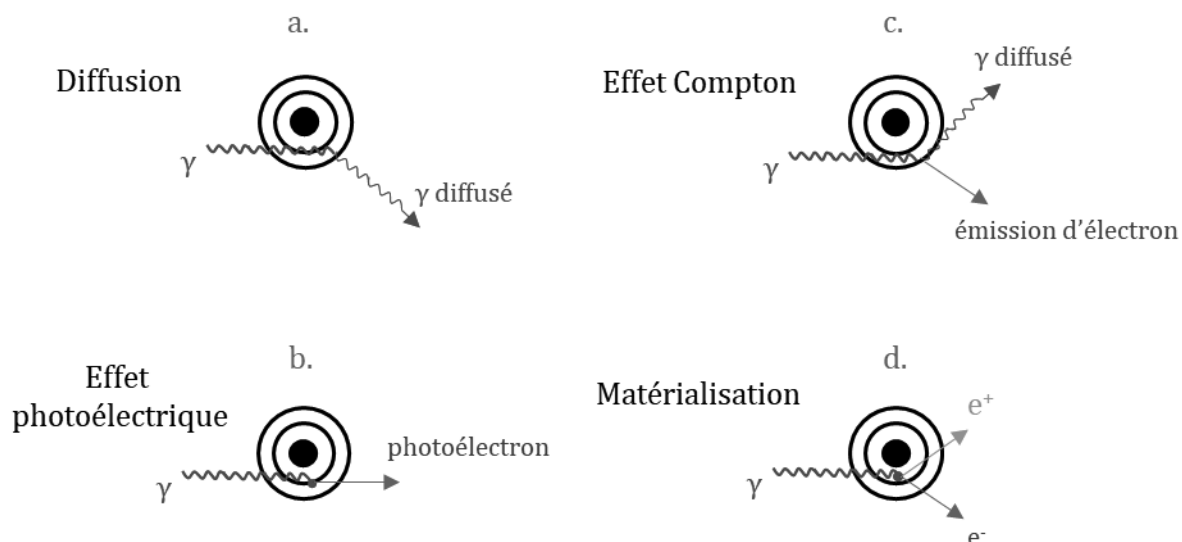


Figure 1-3 Interactions entre un photon (ici  $\gamma$ ) avec la matière (Choppin et al., 2013a).

La seconde interaction est l'effet photoélectrique (Figure 1-3-b.)). L'effet photoélectrique est à l'origine de la caractérisation des ondes électromagnétiques comme des particules (photons) en plus d'être des ondes, et sa découverte a valu son prix Nobel de Physique à Albert Einstein en 1905. Lorsqu'un photon d'énergie suffisante interagit avec la matière, il pourra être complètement absorbé par un électron du matériau traversé. Lorsque l'énergie est supérieure à l'énergie d'ionisation, l'électron en question sera éjecté des niveaux atomiques.

L'énergie de l'électron émis, appelé photoélectron, est liée à l'énergie du photon incident (noté  $E_{h\nu}$ ) et à l'énergie de liaison de son orbitale ( $E_{\text{liaison}}$ ) (Equation 1-7).

$$\text{Equation 1-7} \quad E_{\text{photoélectron}} = E_{h\nu} - E_{\text{liaison}}$$

Ce procédé résultera en la création d'une paire d'ions car un électron (chargé négativement) est éjecté et l'atome sera alors chargé positivement.

Des ionisations secondaires pourront également survenir à travers l'électron émis. De plus, si le photoélectron émis est originaire d'une orbitale de cœur, un électron d'une orbitale supérieure viendra combler la lacune électronique formée, ce qui induira l'émission de rayons X et d'électrons Auger à partir des couches de valence.

L'effet Compton, quant à lui, se produit avec des photons d'énergie supérieure à ceux induisant un effet photoélectrique. Ce mode correspond à l'interaction du photon avec le champ d'un seul électron d'un atome cible, résultant en l'éjection de l'électron avec une perte d'énergie et un changement dans la trajectoire du photon incident. Les énergies des différentes particules intervenant dans ce mode d'interaction sont liées suivant l'Equation 1-8 où  $E'_{h\nu}$  est l'énergie du photon diffusé et  $E_{e^-}$  l'énergie cinétique de l'électron émis.

$$\text{Equation 1-8} \quad E'_{h\nu} = E_{h\nu} - E_{e^-}$$

Ici, l'énergie de liaison n'est pas prise en compte car négligeable. En effet, l'effet Compton ne survenant qu'avec des photons d'énergies élevée et ne concernant que les électrons faiblement liés aux atomes (électrons de valence), sa valeur sera très faible comparée aux autres énergies mises en jeu. Avec ce mode d'interaction, le photon diffusé dispose d'assez d'énergie pour provoquer d'autres ionisations, par effet Compton ou photoélectrique. Le photoélectron induira également des ionisations et excitations.

La matérialisation, ou création de paire, résulte en la conversion du photon incident en un électron et un positron, antiparticule de l'électron. Ce procédé peut être vu comme la formation d'une paire d'électrons, l'un positif et l'autre négatif.

La masse au repos d'un électron correspondant à une énergie de 511 keV, l'énergie minimale pour qu'une matérialisation ait lieu est donc de 1022 keV. Ce mode d'interaction résulte en l'absorption de la totalité de l'énergie du photon incident, l'énergie excédant la valeur de 1022 keV étant alors convertie en énergie cinétique pour l'électron et le positron formés (*Equation 1-9*)

$$\text{Equation 1-9} \quad E_{h\nu}(\text{keV}) = 1022 + E_{e^-} + E_{e^+}$$

Si le photon est totalement absorbé dans ce processus, l'électron et le positon émis déposeront à leur tour de l'énergie dans le milieu. D'autre part, l'annihilation du positon avec un électron aboutit à la formation d'une paire de photons gamma de 511 keV, également rayonnements ionisants.

Finalement, chaque interaction mène à une cascade d'autres interactions, rendant ces processus extrêmement complexes. Les sections efficaces, et donc les probabilités, de ces différents effets sont liés à l'énergie du rayonnement et au numéro atomique du matériau cible, si bien qu'il est possible de tracer un diagramme de dominance pour les trois modes d'interactions inélastiques (*Figure 1-4*). Ainsi, l'interaction primaire qui prédominera lors d'un traitement en radiothérapie par rayons X (ici avec l'exemple des rayons X d'énergie maximale 6 MeV de l'ICANS) sera l'effet Compton.

Ces effets mènent tous à la formation d'électrons énergétiques, ce qui montre pourquoi l'interaction entre des photons ionisants et la matière est très proche de celle entre des électrons accélérés et la matière, et les phénomènes de radiolyse en découlant très similaires.

Les photons peuvent également exciter les molécules d'eau, formant ainsi  $\text{H}_2\text{O}^*$ , qui est aussi un précurseur de plusieurs espèces de radiolyse de l'eau qui nous intéresseront par la suite.

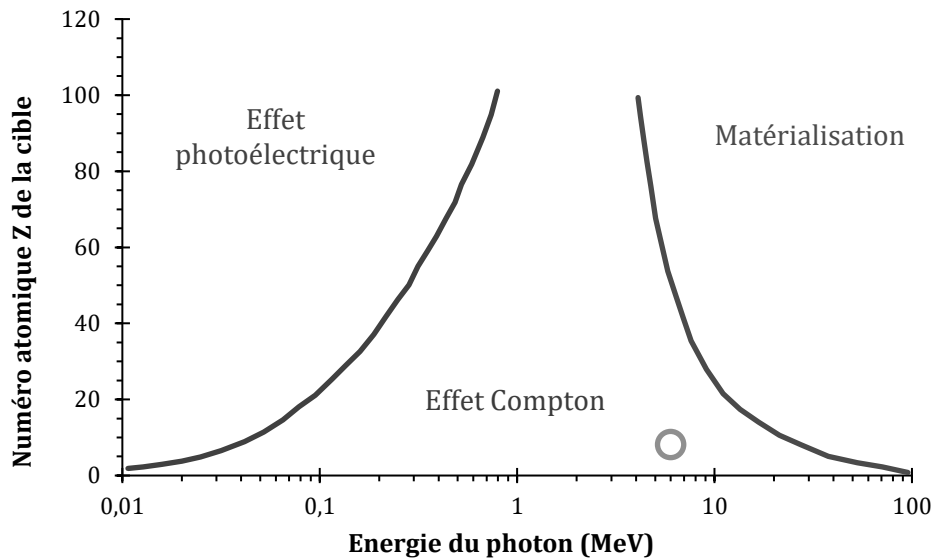


Figure 1-4 Diagramme de dominance des différentes interactions photon-matière selon le Z de la cible et l'énergie du photon. Le cercle bleu correspond à l'interaction photon-matière lors d'un traitement par radiothérapie par rayons X (Énergie de l'ICANS et Z = 8 car l'eau est utilisée comme modèle) (Choppin et al., 2013a).

### Électrons

Les électrons, à la différence des photons, possèdent une masse et vont donc directement interagir avec les électrons des cibles qu'ils vont rencontrer. Ils seront également capables de causer plus d'ionisations via un nombre plus important d'interactions que les photons. Bien que les électrons possèdent un TEL, les collisions et interactions se feront avec une densité relativement faible, plus proche des photons que des ions. De plus, les faisceaux d'électrons ne seront pas atténués lors de la pénétration dans la matière mais bien **dégradés** : les électrons déposeront leur énergie tout au long de leur traversée de la matière, sans être absorbés. Le faisceau maintiendra ainsi sa fluence, bien que de la diffusion soit à prendre en compte si un diamètre fixe le long de la trajectoire du faisceau est considéré, mais avec une énergie décroissante avec la profondeur de pénétration.

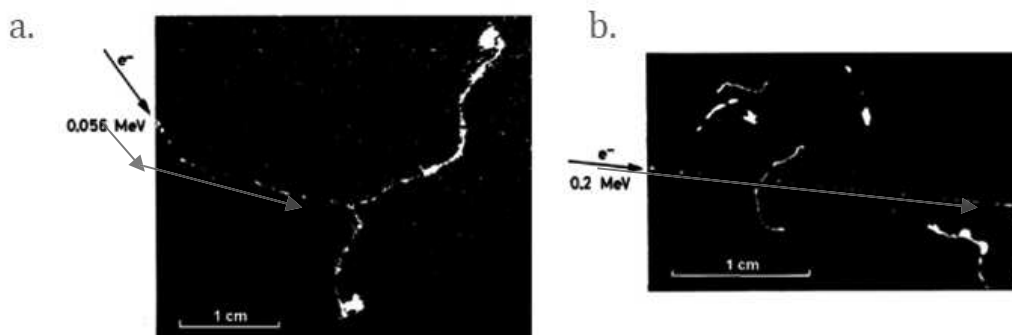


Figure 1-5 Trace d'un électron lent (a.) et d'un électron rapide (b.) dans une chambre à brouillard remplie d'air, d'après (Gentner et al., 1940)

L'énergie des électrons incidents sera importante non seulement pour leur pouvoir d'arrêt, mais aussi pour la structure de leur trace.

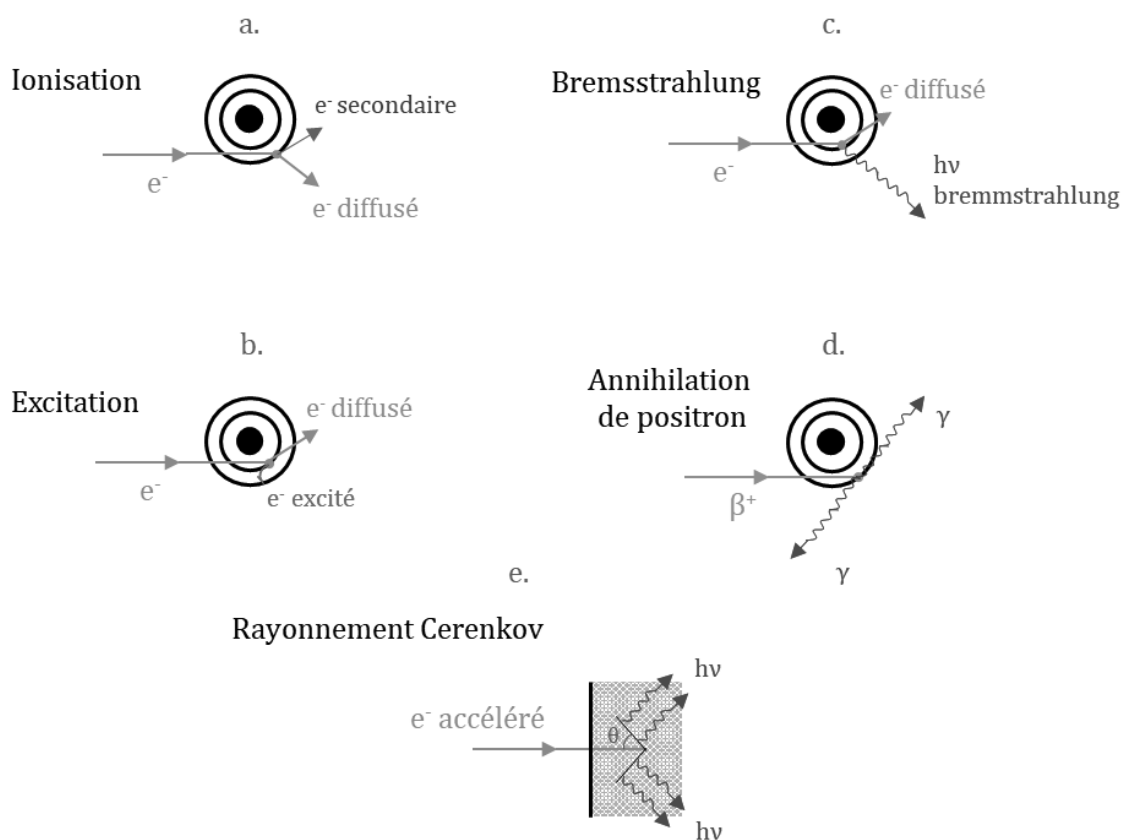
En effet, des électrons lents auront une trajectoire très aléatoire, étant fortement déviés lors de leurs collisions avec d'autres électrons (*Figure 1-5-a.*). Des électrons rapides, à partir de la centaine de keV, auront une trajectoire beaucoup plus rectiligne de par leur énergie nettement supérieure à celle des électrons avec lesquels ils interagissent (*Figure 1-5-b.*).

Ces interactions avec la matière peuvent se faire selon plusieurs modes, comme pour les photons.

Le premier mode est l'ionisation. L'électron accéléré / la particule  $\beta$  incident(e) entre en collision avec un électron de la cible ce qui cause une éjection de l'électron rencontré et une réduction de l'énergie de l'électron incident initial, formant au passage une paire d'ions (*Figure 1-6-a.*). Les électrons secondaires ainsi émis peuvent créer leurs propres traces et interactions, qui sont appelées *traces  $\delta$* . Ces électrons secondaires sont extrêmement importants car produits en grand nombre, l'ionisation étant le mode d'interaction principal des électrons avec la matière. Ils pourront ainsi être responsables de jusqu'à 80% des ionisations totales (Choppin *et al.*, 2013a).

Le second mode d'interaction est l'excitation, lorsque l'énergie transmise à un électron cible n'est pas suffisante pour permettre une ionisation. Cette excitation induit une transition vers une orbitale d'énergie supérieure (*Figure 1-6-b.*).

Ces deux modes d'interactions résultant d'une rencontre directe entre électron incident et électron de la cible forment au final l'interaction la plus probable d'un électron avec la matière, avec une section efficace de  $10^2$  barns.



*Figure 1-6 Modes d'interactions possibles entre un électron incident (ou particule  $\beta^-$ ) et la matière (Choppin *et al.*, 2013a).*

L'interaction suivante est le rayonnement de freinage, aussi dénommé *Bremsstrahlung*. Ici, l'interaction ne se fera pas avec les électrons de la cible mais avec le noyau, avec une section efficace bien plus faible ( $\sigma_{\text{Brems}} > 1$  barn). La charge positive du noyau de la cible attire l'électron incident, aboutissant à une déviation de sa trajectoire (*Figure 1-6-c.*). Cette déviation est également à l'origine d'une perte de vitesse et donc d'énergie cinétique de l'électron incident, ce qui conduit à l'émission d'un photon. L'énergie du photon émis est d'autant plus importante que l'électron est énergétique et que le Z de la cible, donc la charge du noyau, est élevé.

Le ratio entre la perte d'énergie provenant du rayonnement de freinage et celle provenant d'une collision (regroupant ainsi ionisation et excitation) peut être approximé selon l'*Equation 1-10* où  $E_e$  correspond à l'énergie cinétique de l'électron incident. Il apparaît ainsi clairement que pour les matériaux de Z faible, comme l'eau, que le Bremsstrahlung ne représentera qu'une faible part de la perte d'énergie des électrons.

*Equation 1-10*

$$\frac{\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{brem}}}{\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{coll}}} = \frac{E_e \times Z}{800}$$

Le quatrième mode d'interaction ne concerne pas les électrons mais les positons, il s'agit de l'annihilation. Lors de la rencontre en un positon et un électron, le phénomène d'annihilation se produit, résultant en la conversion de l'électron et du positron en deux photons  $\gamma$  d'énergie de 511 keV chacun et émis avec un angle totalement opposé.

Enfin, le dernier mode est l'effet Cerenkov (ou Tcherenkoy). Il survient lorsqu'un électron se déplace dans un milieu plus rapidement que la lumière dans le même milieu (vitesse inférieure à la vitesse de la lumière dans le vide). Dans le cas des électrons, la vitesse des particules dépasse celle de la lumière pour des énergies supérieures à 6 MeV. Lorsque c'est le cas, des photons sont émis de façon continue dans un cône autour de la trajectoire de l'électron incident. Cet effet ne représente au maximum que 0,1 % de la perte d'énergie des électrons traversant la matière.

### *Ions accélérés*

Dotés d'une masse nettement plus importante que les électrons ( $1.673 \times 10^{-27}$  kg pour un proton contre  $9.110 \times 10^{-31}$  kg pour un électron), les ions auront une trajectoire encore plus rectiligne que les électrons rapides car très peu déviés lors de leur interaction avec la matière. Bien que la masse de la particule n'intervienne pas dans l'équation de Bethe-Bloch, celle-ci a un impact sur la vitesse de la particule, à énergie cinétique égale. Pour un ion et un électron de même énergie, la vitesse de l'ion sera beaucoup plus faible, et celui-ci aura donc plus de temps pour interagir avec la matière. Ainsi les interactions seront beaucoup plus rapprochées, et la formation de paires d'ions plus dense, induisant un pouvoir d'arrêt nettement plus important. Ceci peut être visualisé en regardant la trace d'une particule  $\alpha$  dans une chambre à brouillard, très dense et parfaitement rectiligne (*Figure 1-7*)



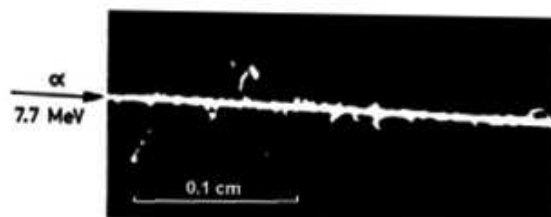


Figure 1-7 Trace d'une particule  $\alpha$  de 7.7 MeV dans une chambre à brouillard remplie d'air (Gentner et al., 1940)

Le mode d'interaction principal des ions avec la matière, de façon analogue aux électrons, est la collision avec un électron des atomes du matériau irradié, menant à une ionisation ou à une excitation de la matière. Ce mode d'interaction est ici encore prédominant, avec une section efficace de l'ordre de  $10^5$  barns. A titre de comparaison, la seconde interaction la plus probable est la diffusion élastique de l'ion incident, pour laquelle la section efficace est généralement inférieure à 10 barns. Le mode d'interaction par collisions est donc généralement l'unique mode considéré pour l'interaction rayonnement-matière des ions.

Ce mode d'interaction induit, comme pour les rayonnements précédents, l'émission d'électrons secondaires pouvant alors créer leur propre trace  $\delta$ . Ceux-ci sont beaucoup plus nombreux qu'avec des électrons, car les ions créent un nombre beaucoup plus important de paires d'ions lors de leur passage dans la matière. Ces électrons secondaires disposent d'un spectre large d'énergies, allant de quelques eV (ils ne sont alors pas considérés comme ionisants car d'énergie trop faible) à plusieurs keV.

Toutefois, la majorité des électrons secondaires auront une énergie moyenne de 100 eV. Les autres modes d'interactions possibles proviendront d'interactions nucléaires avec des atomes de la cible. Pourra s'ensuivre une diffusion élastique, une diffusion inélastique ( $\sigma < 1$  barn) ou encore une capture par le noyau pour former un nouvel élément ( $\sigma < 0.1$  barn).

Les ions thermalisés finissent leur parcours par une neutralisation. Comme évoqué dans la partie concernant le TEL, une diminution de l'énergie des ions entraîne une augmentation de la probabilité de capture d'électrons. Ce qui signifie qu'au-delà du pic de Bragg, lorsque leur énergie est proche de celle des électrons de valence des atomes du milieu, les ions capturent rapidement les électrons ce qui permet leur neutralisation.

### Neutrons

Les neutrons, comme les photons, ne sont pas chargés et n'ont donc pas de pouvoir d'arrêt. Leurs interactions se feront exclusivement avec les noyaux de leurs cibles et non pas avec leurs électrons. Ils pourront être diffusés lors de leur parcours dans la matière et perdre leur énergie, jusqu'à finir par être capturés suite à leur thermalisation par l'un des noyaux de la cible, formant ainsi un isotope généralement radioactif. Les neutrons ont des sections efficaces d'interaction plus importantes avec les éléments légers qu'avec les éléments lourds, ce qui rend particulièrement compliquée leur atténuation à des fins de radioprotection.

Les différents rayonnements ionisants ainsi passés en revue ont donc chacun leurs propres modes d'interactions avec la matière, bien que certains soient communs, et aboutissent tous avec des probabilités différentes à la création de paires d'ions, conséquence de l'ionisation de la matière. Ces ionisations ou excitations évoluent vers des modifications chimiques de la matière, pouvant aller jusqu'à sa décomposition sous l'influence du rayonnement. Ce phénomène est appelé radiolyse, et est la première étape entre le dépôt physique de l'énergie et les phénomènes observés en radiobiologie lors de l'utilisation des rayonnements ionisants pour des traitements.

## **B/ Utilisation en thérapie**

Les conséquences des rayonnements ionisants sur les organismes vivants sont particulièrement néfastes, voir mortelles en cas d'exposition trop importante. Toutefois, il a rapidement été montré que si ceux-ci peuvent détruire les cellules saines, ils peuvent également le faire avec les cellules tumorales. Les rayons X étaient d'ailleurs utilisés pour traiter les cancers de la peau en 1899 alors que leur implication sur la formation de ce type de cancer fut découverte plus tard, en 1902. Les rayonnements ionisants sont ainsi très vite devenus des candidats thérapeutiques importants pour le traitement du cancer, et sont toujours aujourd'hui au cœur de l'oncologie et des développements de cette discipline avec l'avènement de nouvelles modalités de thérapie sous rayonnement.

### **1/ Effet au niveau cellulaire et extracellulaire**

Deux types d'effets biologiques sont à distinguer : les effets stochastiques, qui surviennent de façon aléatoire, et dont la probabilité augmente avec la dose reçue, et les effets déterministes, qui apparaissent de manière certaine une fois une certaine dose atteinte.

Les conséquences varient grandement selon le type des cellules considérées, dont le nombre de types dépasse deux cents dans le corps humain. En règle générale, plus les cellules ont tendance à se multiplier par mitose, et plus leur sensibilité aux rayonnements est importante (Pawlik & Keyomarsi, 2004). Les effets des rayonnements, cellulaires ou extracellulaires, peuvent être classés en deux groupes : les effets somatiques, qui se limitent à l'organisme étudié, et les effets génétiques qui apparaîtront ou seront transmis aux générations futures. Ces derniers sont souvent liés à des mutations, des modifications de l'ADN résultant de l'action du rayonnement (Little, 2003).

#### *Effets intracellulaires*

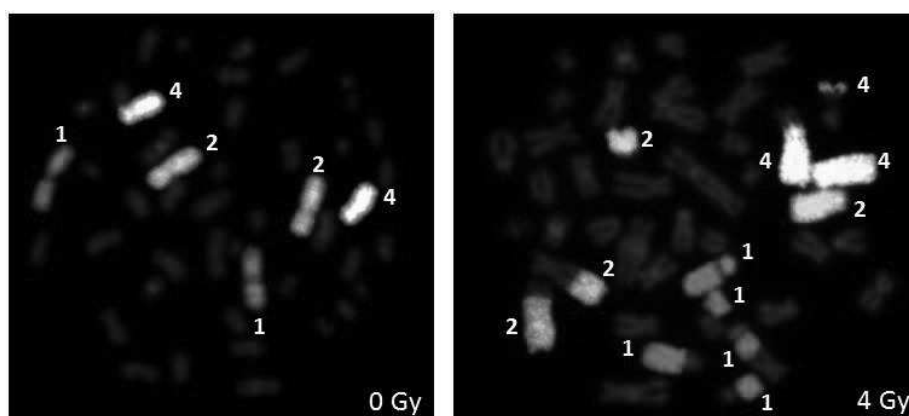
Au niveau cellulaire, une des conséquences de l'irradiation peut être la mort cellulaire. Celle-ci peut survenir selon deux mécanismes. L'apoptose, mort cellulaire programmée, se produit dans les quelques heures suivant l'irradiation (Geske & Gerschenson, 2001). De faibles doses sont suffisantes pour la déclencher et elle est considérée comme étant un mécanisme de protection de l'organisme pour sacrifier des cellules endommagées ou mutées qui pourraient causer plus de dommages en restant en vie.

Cette mutagenèse causée par les radiations, lorsqu'elle n'est pas stoppée par l'apoptose, est responsable d'une partie des effets génétiques. La réponse du nombre de mutations semble être linéaire avec la dose déposée de 0,1 à 10 Gy (Grosovsky & Little, 1985). La dose se définit comme la quantité d'énergie déposée par unité de masse, et s'exprime en Gray (Gy, J/kg en USI).

Les conséquences majeures de ces mutations sont des effets génétiques héréditaires résultants de mutations dans les cellules germinales (Sankaranarayanan, 2001). La perte de contrôle apoptotique participe au développement des tumeurs (Little, 1968). L'apoptose peut survenir suite à des dommages à l'ADN (Radford, 2002), mais aussi suite à des dommages membranaires ou des perturbations des voies de signalisation intra- et extra-cellulaires (Watters, 1999).

Le second mécanisme de mort cellulaire est l'incapacité des cellules à proliférer. Des doses suffisamment importantes peuvent en effet inhiber la mitose, ce qui est la source principale de mort cellulaire chez les mammifères (Little, 1994). Ces effets apparaissent *in vivo* pour des doses corps entier de 150 cGy ou au-delà.

Un autre effet possible, faisant suite à des dommages sur l'ADN, est l'aberration chromosomique. Sous irradiation, des cassures de brins d'ADN peuvent survenir ce qui entraînera une modification dans la structure des chromosomes ou alors dans leur nombre (*Figure 1-8*).



*Figure 1-8 Détection d'aberrations chromosomique suite à une irradiation de 4 Gy (à droite) par Fluorescence. Figure tirée des travaux de (Balajee, 2018). La figure de gauche présente les chromosomes d'une cellule non-irradiée. Les couleurs correspondent à des marqueurs spécifiques des chromosomes 1 (rose), 2 (vert) et 4 (jaune).*

Les conséquences de ces aberrations peuvent modifier l'expression des gènes des cellules touchées, déclencher une réponse immunitaire (Durante & Formenti, 2018) et augmentent la susceptibilité des cellules à devenir cancéreuses (Hlatky *et al.*, 2002). L'ensemble des modifications génétiques aléatoires induites est susceptible d'amener des cellules saines à se convertir en cellules cancéreuses. Les cellules tumorales formées sous irradiation peuvent aboutir à la formation d'un cancer. En effet, les cellules cancéreuses maintiennent leur capacité de mitose, avec généralement un métabolisme exacerbé, et peuvent devenir invasives et former des tumeurs malignes. Une concentration locale importante en cellules mortes, c'est-à-dire pour des irradiations à haute dose, peut aller jusqu'à causer une nécrose des tissus touchés (J. Huang *et al.*, 2021). Enfin, une conséquence à plus grande échelle, bien connue, est *l'effet Bystander*.

Ce dernier se définit comme l'apparition de dommages sur des cellules pourtant non irradiées, identiques à ceux observés sous irradiations (mort cellulaire, aberrations chromosomiques etc) (Marín *et al.*, 2015). Cet effet touche les cellules localisées en périphérie de cellules irradiées et tire son origine d'une modification des signaux cellulaires envoyés par les cellules irradiées (Najafi *et al.*, 2014).

*Paramètres liés aux dégâts biologiques*

L'efficacité biologique relative (RBE pour « *Relative Biological Effectiveness* ») détermine la capacité relative d'un rayonnement à causer des dommages. Elle se définit selon :

$$\text{Equation 1-11} \quad RBE = \frac{D_{RX_{220\text{ keV}}}}{D_{RI}} \quad (\text{Weyrather \& Kraft, 2004})$$

Où :  $D_{RI}$  est la dose nécessaire du rayonnement considéré pour atteindre un certain effet biologique

$D_{RX_{220\text{ keV}}}$  est la dose nécessaire pour atteindre le même effet avec des rayons-X de 220 keV

Ainsi, un rayonnement ayant une RBE supérieure à 1 sera plus efficace que des RX de 220 keV pour arriver au même résultat, généralement la destruction de cellules.

Le TEL impacte fortement cette efficacité biologique, qui augmente avec celui-ci. Les protons ont ainsi une RBE légèrement supérieure aux RX, et elle augmente avec le TEL jusqu'à un maximum, atteint pour des ions carbonés, avant de décroître (*Figure 1-9*). Cette saturation ou décroissance est expliquée par un nombre de dommages causés plus élevés que nécessaire (« overkill effect ») (Fokas *et al.*, 2009b).

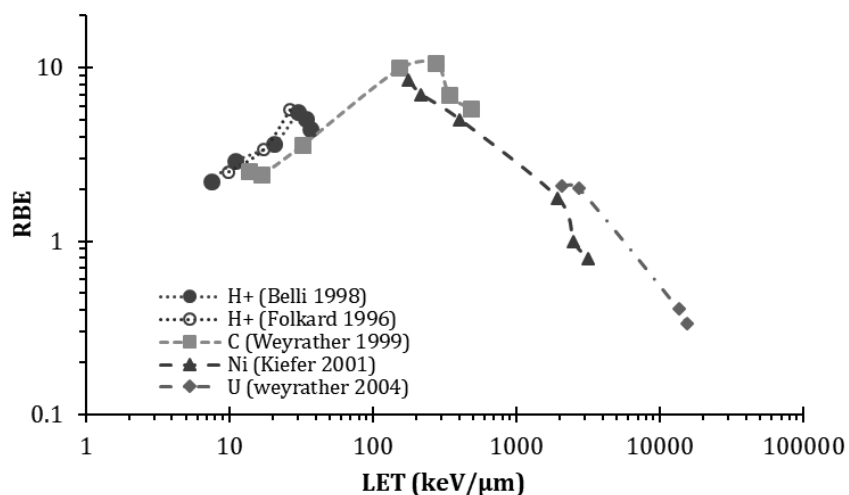


Figure 1-9 Evolution de la RBE obtenue à partir du taux de survies de cellules CHO<sup>2</sup> en fonction du TEL pour différents types d'ions. Figure d'après (Weyrather & Kraft, 2004). Les différents points de données correspondent à des : ●

<sup>2</sup> Type de lignée cellulaire issue d'ovaires de hamster de Chine

Protons (Kiefer et al., 2001) ○ Protons (Folkard et al., 1996) ■ ions carbone (Weyrather et al., 1999) ▲ ions nickel (Kiefer et al., 2001) ◆ ions uranium (Weyrather & Kraft, 2004)

Les rayonnements à RBE plus élevées sont ainsi particulièrement intéressants pour détruire des cellules peu sensibles aux RI, comme c'est le cas pour les tumeurs radiorésistantes.

L'« Oxygen Enhancement Ratio » (OER) est un autre paramètre important en radiothérapie qui mesure l'effet de l'oxygène sur la réponse de tissus à la radiothérapie. Il se définit comme :

$$\text{Equation 1-12} \quad OER = \frac{D_{\emptyset O_2}}{D_{O_2}} \quad (\text{Brahme, 2014})$$

Où :  $D_{\emptyset O_2}$  est la dose requise pour atteindre un certain effet biologique en l'absence d'oxygène

$D_{O_2}$  est la dose requise pour atteindre un certain effet biologique en présence d'oxygène

L'effet biologique mesuré est généralement la mort cellulaire. C'est une grandeur qui dépend à la fois des tissus et de la nature des rayonnements. Ainsi, certaines cellules cancéreuses des tissus humains ont des OER allant de 2.5 à 3 avec des photons, ce qui signifie qu'elles seront 2.5 à 3 fois plus difficiles à détruire en milieu hypoxique<sup>3</sup>. Or, les mêmes cellules irradiées avec des particules  $\alpha$  ont un OER proche de 1 : elles seront nettement moins résistantes en milieu hypoxique sous irradiations par des ions (Barendsen et al., 1963). De manière générale, l'OER diminue avec le TEL (Figure 1-10)

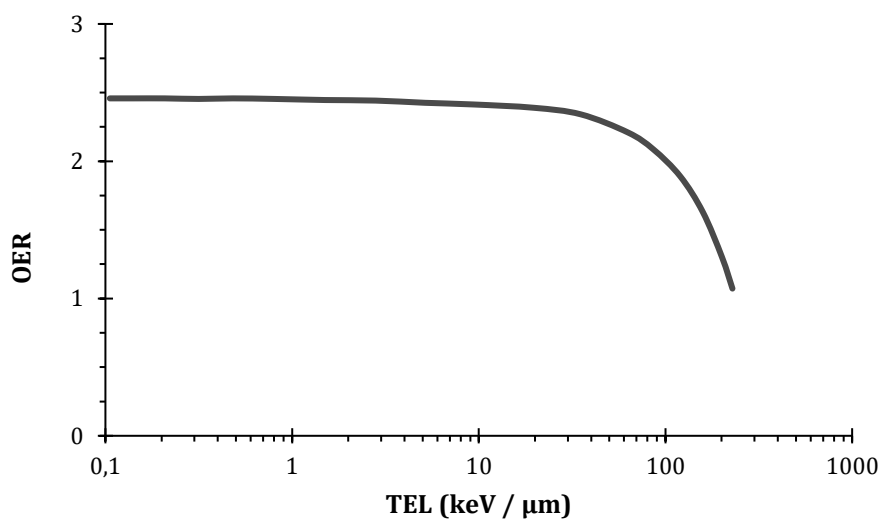


Figure 1-10 Evolution de l'OER en fonction du TEL. Figure de (Desouky & Zhou, 2016) d'après des données de (McParland, 2010)

Ces différents dommages cellulaires et intercellulaires peuvent être à l'origine de cancers radio-induits et peuvent donc survenir après un traitement. Ces derniers sont ainsi optimisés pour les limiter à l'extérieur des tissus cancéreux, et les paramètres tels que la RBE et l'OER sont systématiquement considérés lors de l'élaboration des plans de traitement. La problématique

<sup>3</sup> Pauvre en oxygène

principale en radiothérapie est très claire : comment réduire au maximum les dommages sur les tissus sains lors des traitements, tout en maintenant un fort effet sur les tissus tumoraux.

### 2/ Radiothérapie conventionnelle

La radiothérapie externe (RT) est généralement réalisée avec des rayons X de hautes énergies (Dertinger & Jung, 1970b). Utilisée pour la capacité des rayonnements à limiter la croissance ou détruire les tissus cancéreux, elle est exploitée depuis plus de 100 ans. Il s'agit d'une modalité de thérapie majeure, intervenant dans près de deux tiers des traitements du cancer (Gianfaldoni *et al.*, 2017). La première patiente traitée par RT le fut bien avant une compréhension détaillée des effets des rayons X (Grubbé, 1933).

Des RX de quelques MeV sont utilisés car très pénétrants et limitants en partie les dégâts causés à la peau (Breitkreutz *et al.*, 2020). Certains traitements exploitent des rayons X de plus faible énergie, de l'ordre de la dizaine à la centaine de keV, adaptés pour le traitement des cancers dermatologiques en raison de leur pénétration plus faible. Le dépôt de dose étant important dès l'entrée du RI dans la matière, les techniques d'administration des RX ont été optimisées pour diminuer autant que possible l'irradiation des tissus sains et leur endommagement. Les traitements sont ainsi réalisés en trois dimensions et de plusieurs façons possibles. Une étape d'imagerie est primordiale pour modéliser la tumeur en 3D et réaliser le plan de traitement, soit comment la dose sera administrée, quelle dose par session, et le nombre de sessions. Le fractionnement de la dose a en effet un fort impact sur le contrôle de la tumeur (Clément-Colmou *et al.*, 2020). Le traitement en lui-même peut être administré selon plusieurs techniques. La plus répandue et la plus ancienne des techniques modernes est la radiothérapie conformationnelle 3D, pour laquelle le traitement est réalisé par plusieurs sources fixes irradiant la tumeur depuis plusieurs directions simultanément.

D'autres techniques plus récentes ont permis d'améliorer encore l'efficacité des traitements, la VMAT (« Irradiation avec Modulation d'intensité Volumétrique par ArcThérapie ») et l'IMRT (« Radiothérapie par intensité modulée »), où l'intensité du/des faisceaux est modifiée au cours du traitement avec une rotation à 360° autour du patient. Ces techniques permettent un meilleur contrôle de la zone irradiée et donc une meilleure préservation des tissus sains (van der Veen *et al.*, 2017).

Cette modalité bien que très populaire présente ainsi plusieurs limites. Tout d'abord, la forte pénétration des rayons-X induisant un dépôt de dose inévitable dans les tissus sains périphériques la rend non exploitable pour les cancers dans des zones « critiques », typiquement à proximité du cerveau. D'autre part, la dose à la peau reste difficile à estimer, en raison de sa faible épaisseur. Celle-ci est généralement simulée, et trop souvent sous-estimée, ce qui peut causer des inflammations. Du fait du mode de dépôt d'énergie radicalement différent des ions accélérés, l'hadronthérapie est une modalité de radiothérapie qui permet une amélioration des traitements dans de nombreux cas.

### 3/ Hadronthérapie

L'hadronthérapie (HT) repose sur l'utilisation de faisceaux d'ions accélérés pour traiter les tissus cancéreux. Elle fut utilisée pour la première fois en 1954 par Tobias, Lawrence et Larson qui proposèrent et réalisèrent les premiers traitements de patients avec des protons et hélions (Skarsgard, 1998). L'intérêt majeur de l'utilisation des ions pour le traitement des tumeurs repose sur leur profil de dépôt de dose : un TEL relativement faible sur une grande partie de leur parcours suivi d'un maximum abrupt en fin de parcours, le pic de Bragg (*Figure 1-11*). Il est possible de cibler la tumeur en adaptant l'énergie du faisceau pour que le pic de Bragg se situe dans la tumeur, et donc de la détruire efficacement en minimisant la dose déposée dans les tissus sains (Schulz-Ertner *et al.*, 2006; Tobias *et al.*, 1982).

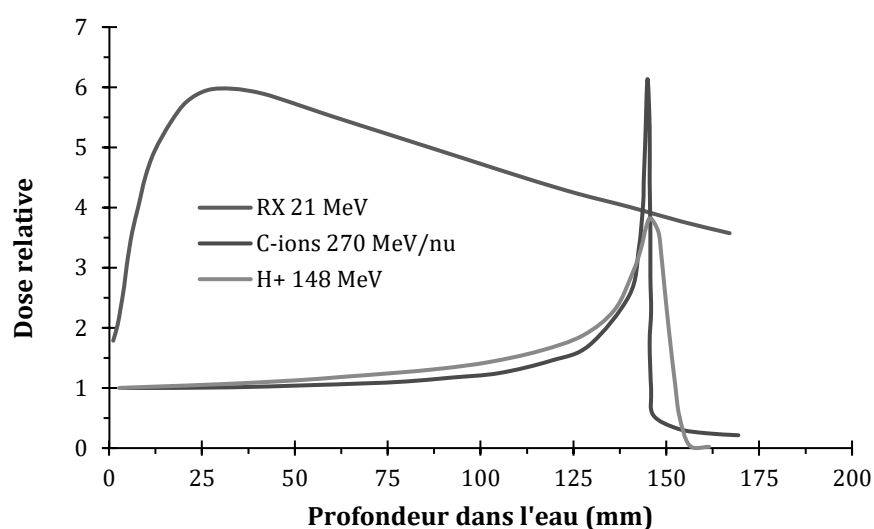


Figure 1-11 Evolution de la dose relative déposée en fonction de la profondeur dans l'eau pour des RX de 21 MeV, des ions carbonés de 270 MeV/nu et des protons de 148 MeV. Figure modifiée d'après (Fokas *et al.*, 2009b)

Le faisceau utilisé en traitement n'est pas mono-énergétique, l'énergie des ions étant adaptée en fonction du scanner réalisé au préalable et du plan de traitement pour « étaler » le pic de Bragg sur tout le volume de la tumeur. Celle-ci est séparée en voxels sur les plans de traitements modélisés, l'énergie et l'orientation du faisceau sont donc adaptées pour toucher chaque voxel de la tumeur. Ce procédé est appelé SOBP, pour « Spread-Out Bragg Peak » (Jette & Chen, 2011). L'hadronthérapie permet ainsi une préservation des tissus sains nettement supérieure par rapport aux RX (*Figure 1-12*), lui permettant d'être utilisée pour des cancers dans des zones critiques, comme les tumeurs oculaires traitées au Centre Antoine Lacassagne (CAL) de Nice ou au Centre de Protonthérapie d'Orsay (CPO) par des faisceaux de protons.

Les ions accélérés étant des rayonnements ayant un TEL élevé, en particulier dans le pic de Bragg, leur impact sera important vis-à-vis de l'OER des tumeurs (*Figure 1-10*) et ils auront également une meilleure RBE, avec un optimum atteint pour des ions carbone, ainsi considérés comme les meilleurs candidats pour ce type de thérapie, comme évoqué précédemment (*Figure 1-9*).

Ces propriétés rendent les ions plus efficaces pour le traitement de tumeurs radiorésistantes car leur OER sera nettement plus faible sous faisceaux d'ions que sous RX (Park *et al.*, 2021).

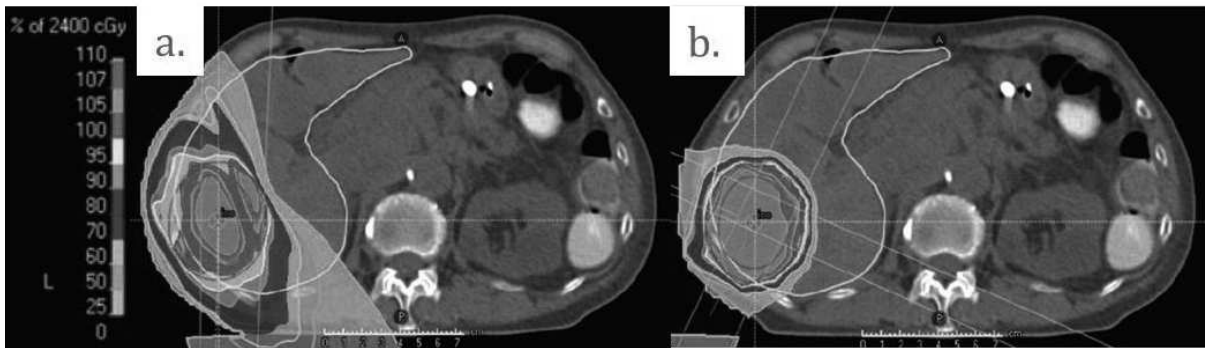


Figure 1-12 Comparaison d'un plan de traitement par radiothérapie X (a.) et par thérapie carbone (b.). D'après (Byun *et al.*, 2021)

A ce jour, la majorité des traitements par hadronthérapie sont réalisés par des protons (290 000 patients traités par cette modalité en 2021), mais la thérapie carbone se développe de plus en plus, avec 40 000 patients traités en 2021 (Durante & Loeffler, 2010; Rossi, 2022). Le nombre de centres d'hadronthérapie est également en expansion, avec 121 centres ouverts de nos jours dans le monde (107 centres de protonthérapie et 14 de thérapie carbone) et 37 centres en cours de construction (36 centres dont 32 de protonthérapie et 5 de thérapie carbone) (PTCOG.site).

Si les ions s'arrêtent totalement dans le pic de Bragg, ils peuvent engendrer des fragments par interaction nucléaire avec les tissus traversés (Jia *et al.*, 2014) et également fragmenter eux-mêmes dans le cas d'ions lourds (Francis *et al.*, 2014). Les particules secondaires énergétiques produites induisent un dépôt de dose non négligeable au-delà du pic de Bragg. L'impact de la fragmentation sur nos systèmes sera discuté au **Chapitre 5** -

#### 4/ Thérapie FLASH

En 2014, Favaudon publia une étude montrant que l'utilisation de faisceaux d'électrons à ultra-haut débit de dose (UHDR, seuil généralement placé à 40 Gy/s) permettait d'éliminer tout aussi efficacement les tissus tumoraux avec un impact bien moindre sur les tissus sains, cet effet fut alors baptisé l'« effet FLASH » (Favaudon *et al.*, 2014). Cette étude marqua les débuts d'une nouvelle modalité de radiothérapie en recherche, la radiothérapie FLASH (FLASH-RT), qui est devenue depuis 2018 un sujet majeur de la recherche en oncologie, avec de nombreuses autres démonstrations de l'effet FLASH (de Kruijff, 2019; Montay-Gruel *et al.*, 2017) et de nombreuses études des effets du débit de dose (Vozenin, Baumann, *et al.*, 2019).

Bien que toujours à un stade de développement et non exploitée en clinique, cette modalité a déjà été utilisée pour le traitement de divers animaux (souris (Montay-Gruel *et al.*, 2019, p.), porc et chat (Vozenin, De Fornel, *et al.*, 2019) et embryons de poisson-zèbre (Kacem, Almeida, *et al.*, 2022)) et a même déjà permis la réalisation avec succès d'un traitement sur un patient humain (Bourhis *et al.*, 2019).

Découvert et principalement étudié avec des faisceaux d'électrons, l'effet FLASH a aussi été observé avec des rayons-X (Montay-Gruel *et al.*, 2018, 2022), des faisceaux de protons (Beyreuther *et al.*, 2019) et également des ions lourds tels que les Hélium (Tessonnier *et al.*, 2021) et même récemment des ions carbone (Tinganelli *et al.*, 2022).



La RT-FLASH permet la réalisation de traitements ultra-courts, de l'ordre de quelques ms, ce qui permettrait avec la préservation des tissus sains d'augmenter la dose délivrée à chaque session et de réduire le nombre de traitements nécessaires par patient. C'est un avantage précieux pour traiter les tumeurs dans des zones sensibles au mouvement, comme dans les poumons, où un traitement de plusieurs dizaines de secondes devient compliqué en raison de la respiration. La possibilité d'une radiothérapie FLASH est ainsi très prometteuse, mais celle-ci est loin d'être parfaitement comprise. Ainsi, Les conditions dans lesquelles l'effet FLASH est observé ne sont pas clairement définies. Le débit de dose dans les impulsions (ou *pulses*) ainsi que les temps entre chaque impulsion et donc le débit de dose moyen ont en effet tous un impact sur le déclenchement ou non de cet effet (Vozenin *et al.*, 2020). Les mécanismes de l'effet FLASH ne sont également pas établis. Il a été démontré que cet effet survenait essentiellement in-vivo, les tests in-vitro ayant montré des résultats assez peu probants (Adrian *et al.*, 2022). L'effet flash est intimement lié à la nature des cellules. Ainsi, les cellules tumorales restent efficacement détruites lorsque les cellules saines sont moins impactées par les RI à haut débit de dose.

Du point de vue de la chimie sous rayonnement, les effets du TEL ont été en partie étudiés mais sont toujours discutés et des études physico-chimiques sur les biomolécules sont nécessaires. La thérapie FLASH n'étant qu'à son début, les études des effets du débit de dose sont particulièrement d'actualité sur l'impact du débit de dose sur les espèces chimiques induites sous irradiation. Le TEL élevé des ions utilisés en hadronthérapie et les débits de dose importants de la thérapie FLASH sont deux paramètres impactant la densité d'espèces radicalaires formées sous irradiation. Cela pourrait alors avoir des répercussions dans les mécanismes mis en jeu, que ce soit en radiolyse de l'eau ou dans les mécanismes de dégradation de biomolécules.

## **C/ Dépôt d'énergie dans l'eau - début de la chimie sous rayonnement**

En raison de son omniprésence dans le corps humain, représentant entre 65 et 70 % de notre masse, l'eau est la cible majoritaire du dépôt d'énergie et des ionisations causées par la pénétration d'un rayonnement ionisant dans le corps. Cette radiolyse fut découverte en 1903, peu de temps après les rayonnements ionisants et la radioactivité, par Giesel, qui observera la décomposition de l'eau par action d'un sel de radium produisant un dégagement gazeux d'oxygène et d'hydrogène (Giesel, 1903). Cette décomposition fut peu après attribuée à l'action des rayonnements par Debieerne (Debieerne, 1908, 1914a).

De plus, avec l'identification des différents rayonnements issus de la radioactivité, Kernbaum montra que les dégagements gazeux provenaient des rayonnements  $\beta$  et  $\alpha$  en démontrant leur absence sous irradiations par des rayons X (Kernbaum, 1910). Ce fut la première mise en évidence des effets de la nature du rayonnement sur les phénomènes observés.

La radiolyse est depuis devenue un domaine de recherche propre, et les connaissances se sont considérablement étoffées (Ferradini & Jay-Gerin, 1999).

Cette partie proposera une présentation des principaux éléments connus, des études primaires suivant le dépôt d'énergie à la caractérisation des espèces formées et leur évolution à travers les échelles temporelles et spatiales.

La radiolyse de l'eau a un impact important sur les biomolécules dans la cellule, de par sa teneur importante en eau, à travers les réactions des espèces formées par des effets dits *indirects* (Figure 1-13). Les effets étudiés durant ce travail de thèse étant ces effets indirects par la radiolyse de l'eau, en milieu dilué, l'accent sera mis sur ces derniers par rapport aux *effets directs*, provenant d'une interaction entre le rayonnement et les biomolécules, et qui ne se produisent significativement qu'à très haute concentration en soluté.

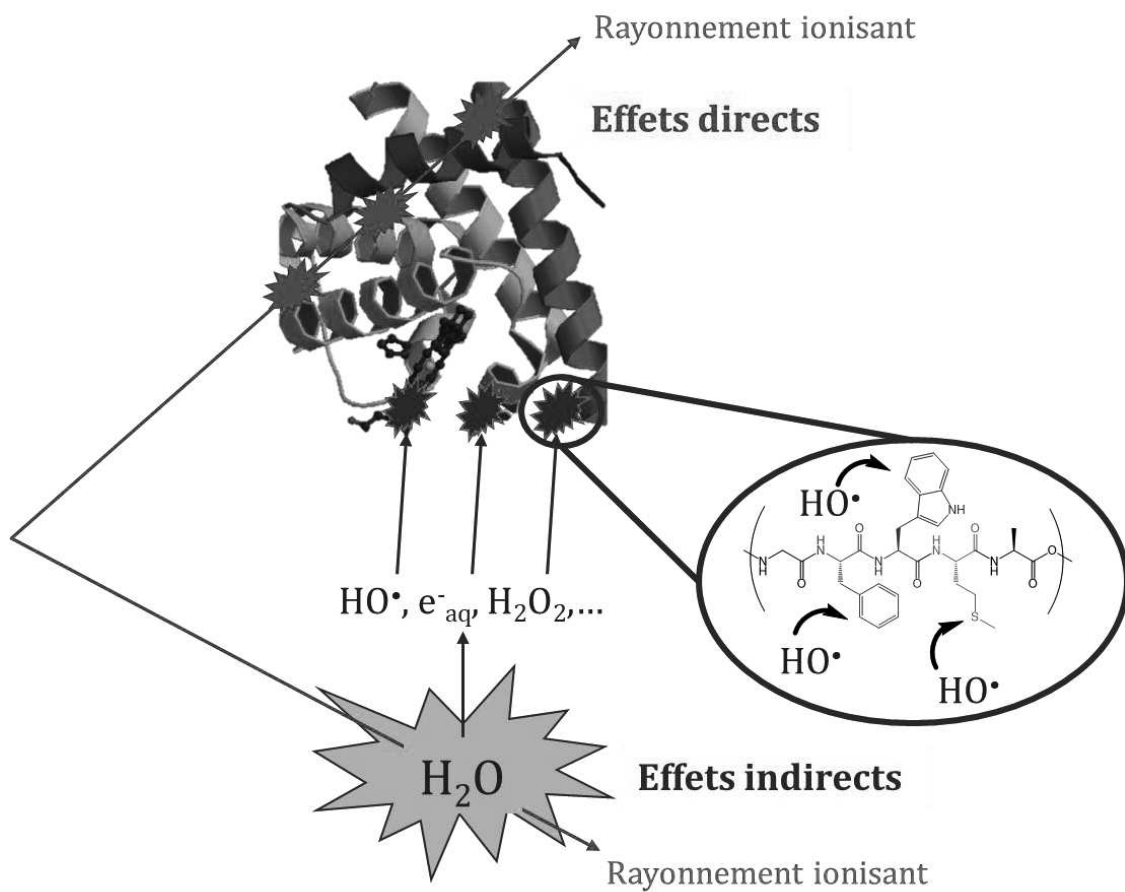


Figure 1-13 Représentation schématique des effets directs et indirects d'un rayonnement ionisant en milieu biologique

## 1/ Étape physique

La première étape, appelée l'étape physique, est le résultat direct du dépôt d'énergie par l'interaction du rayonnement avec l'eau, par les processus explicités **ci-dessus**.

De cette interaction initiale entre le rayonnement et l'eau découlera principalement les modes d'excitation (*Equation 1-13*) et d'ionisation (*Equation 1-14*) de la matière, ici l'eau, avec une large domination du processus d'ionisations (Choppin *et al.*, 2013a).



Ces interactions résulteront ainsi en la formation de paires d'ions, avec l'éjection d'un électron et la formation d'une molécule d'eau ionisée ( $\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$ ). Ces ionisations primaires seront localisées autour de la trace du rayonnement ionisant et se produisent en un temps inférieur à  $10^{-16}$  s. Le dépôt d'énergie étant inhomogène, ces interactions ne seront pas réparties de façon uniforme le long de la trajectoire du rayonnement.

Dans le cas où l'électron émis est d'énergie comprise entre 10 et 100 eV, il aura suffisamment d'énergie pour causer une/des ionisations qui seront situées très proches de la trace primaire du rayonnement. Cela mènera ainsi à la formation de « **grappes** » (ou *spurs*) autour de la trace du rayonnement initial, de taille initiale estimée de 1 à quelques nanomètres (Dyne & Kennedy, 1960; Mozumder & Magee, 1966; Samuel & Magee, 1953).

Si l'électron éjecté dispose d'une énergie supérieure à 100 eV, il pourra alors créer sa propre trace secondaire, et sera alors appelé « **électron  $\delta$**  » ( *$\delta$ -rays*). Lorsque son énergie est suffisamment élevée (le seuil étant souvent placé à 5 keV), il pourra alors avoir ses propres traces secondaires, que l'on pourra appeler traces tertiaires. L'énergie de ces électrons secondaires dépend directement de l'énergie du faisceau incident, plus le faisceau est énergétique et plus les électrons le seront aussi avec donc un parcours plus important (*Figure 1-14*).

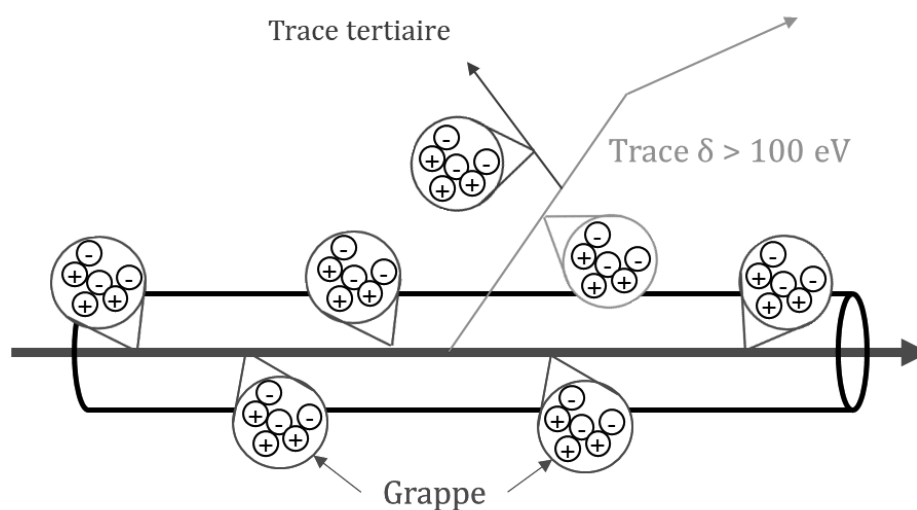


Figure 1-14 Structure spatiale de la trace d'un rayonnement ionisant dans l'eau (Choppin *et al.*, 2013a).

La densité de production des paires d'ions dépend de la nature du rayonnement. Plus le TEL est élevé, plus les ionisations auront lieu à proximité les unes des autres.

Dans le cas des ions, typiquement des particules  $\alpha$  de quelques MeV, la distance entre deux paires d'ions formées est de l'ordre du nm, contre plus de 100 nm pour les électrons accélérés (Tableau 1-2). La trace des ions sera donc extrêmement dense et entourée de nombreuses traces  $\delta$ , menant à partir d'un certain seuil à des recouvrements des grappes. Cette densité est cruciale vis-à-vis des processus impliqués dans les étapes suivantes, et ce dès l'étape physico-chimique.

Tableau 1-2 Distance entre les paires d'ions formées dans la trace selon le rayonnement incident (Choppin et al., 2013a)



Rayonnement	Distance entre paire d'ions
Photons (RX, $\gamma$ )	~ 1000 nm
Électrons accélérés, $\beta^-$	100 – 500 nm
Ions, particules $\alpha$	~ nm

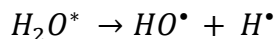
Il est également possible d'observer, avec des particules de TEL élevés, une ionisation double ou multiple significative des molécules d'eau, laquelle sera à l'origine de la formation d'espèces caractéristiques de ces rayonnements durant les étapes ultérieures (Baldacchino *et al.*, 1998; Gervais *et al.*, 2006; LaVerne *et al.*, 1986).

## 2/ Étape physico-chimique

L'étape physico-chimique, aussi dénommée étape pré-chimique, voit la formation des premières espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau.

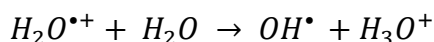
La molécule d'eau excitée, produit minoritaire de l'interaction primaire du rayonnement, peut soit se désexciter en émettant un photon, soit donner lieu à la formation de deux espèces radicalaires par une rupture homolytique (Equation 1-15). Ce phénomène de dissociation se produit sur une échelle de temps de  $10^{-14}$  à  $10^{-13}$  s (Choppin *et al.*, 2013b).

Equation 1-15



La molécule d'eau ionisée pourra quant à elle réagir avec une molécule d'eau en  $10^{-14}$  s selon l'Equation 1-16 et sera la principale contribution à la formation du radical hydroxyle ( $HO^\bullet$ ).

Equation 1-16



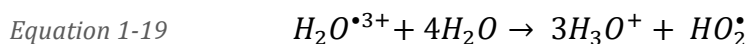
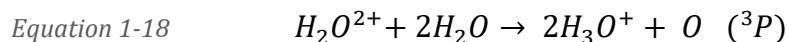
Le second produit de l'ionisation de l'eau, l'électron, va se thermaliser, lorsque son énergie cinétique sera suffisamment faible (soit immédiatement après sa libération soit après avoir causé des ionisations secondaires). En effet, une fois son énergie inférieure à 12,61 eV (seuil d'ionisation de l'eau), ce dernier ne peut plus causer d'ionisations (Choppin et al., 2013a).

Il perdra alors son énergie résiduelle par excitations rotationnelles et vibrationnelles de l'eau et finira par être solvaté par cette dernière (Equation 1-17).

Cette espèce si singulière se nomme électron solvaté et plus précisément électron hydraté (noté  $e_{aq}^-$ ) lorsque le solvant est l'eau (Mostafavi & Lampre, 2008).



Dans le cas particulier d'une ionisation multiple de l'eau à TEL élevé, celle-ci pourra selon le nombre d'ionisations soit former un atome d'oxygène à l'état triplet (Equation 1-18) soit le radical  $HO_2^\bullet$  (Equation 1-19) (Meesungnoen & Jay-Gerin, 2009).



Les espèces ainsi formées atteindront l'équilibre thermique avec l'eau à l'échelle de la picoseconde ( $10^{-12}s$ ) marquant ainsi la fin de l'étape physico-chimique. Les espèces ainsi formées pourront alors entreprendre les premières réactions chimiques lors des étapes chimiques, avec le début de leur diffusion.

### 3/ Étape chimique

#### Le rendement radiolytique

A partir de la fin de l'étape physico-chimique, il est possible de caractériser les espèces formées par radiolyse pulsée à la picoseconde (El Omar et al., 2011b; El Omar, 2013). Les **rendements radiolytiques**, notés **G** des espèces peuvent alors être mesurés, c'est-à-dire la quantité d'espèce formée pondérée par la quantité d'énergie déposée (Equation 1-20).

Ce rendement est généralement exprimé en espèces formées pour 100 eV déposés ou en unités SI (mol/J). Ce type de quantification fut réalisé pour la première fois par Lind en 1961 (Lind & Morrow, 1962). L'unité du système international du rendement radiolytique est le mol/J. Cependant, il est souvent trouvé sous la forme d'espèces formées pour 100 eV déposés (esp/100 eV). Cette unité sera celle utilisée dans ce manuscrit.

Equation 1-20 
$$G(x) = 100 \times \frac{N(x)}{E}$$

Où :  $G(x)$  est le rendement radiolytique exprimé en molécules pour 100 eV déposés ou en mol/J (USI)

$N(x)$  est le nombre d'espèces formées

$E$  est l'énergie déposée en eV

Le rendement à la picoseconde est parfois désigné comme le rendement initial et est alors noté  $g^0(x)$ .

Dans le cas d'irradiations par des faisceaux d'ions, deux types de rendements pourront être distingués : les **rendements intégraux** et les **rendements différentiels**.

Lors de leur parcours dans l'eau, le TEL des ions va considérablement varier, ce qui impactera les rendements des espèces formées. Le **rendement intégral (noté G)** correspond alors à un rendement moyen tout le long de la trace des ions en solution, de l'entrée dans la matière au pic de Bragg. Le **rendement différentiel (noté G')**, aussi dénommé « *track segment yield* » et noté G' correspond à un rendement pour un TEL constant ou de très faible variation (Figure 1-15). Il correspondra donc à un rendement mesuré en un point précis du parcours de l'ion dans l'eau, pour un TEL et une énergie donnée. Il peut être mesuré expérimentalement pour une épaisseur traversée dans laquelle le TEL varie suffisamment peu.

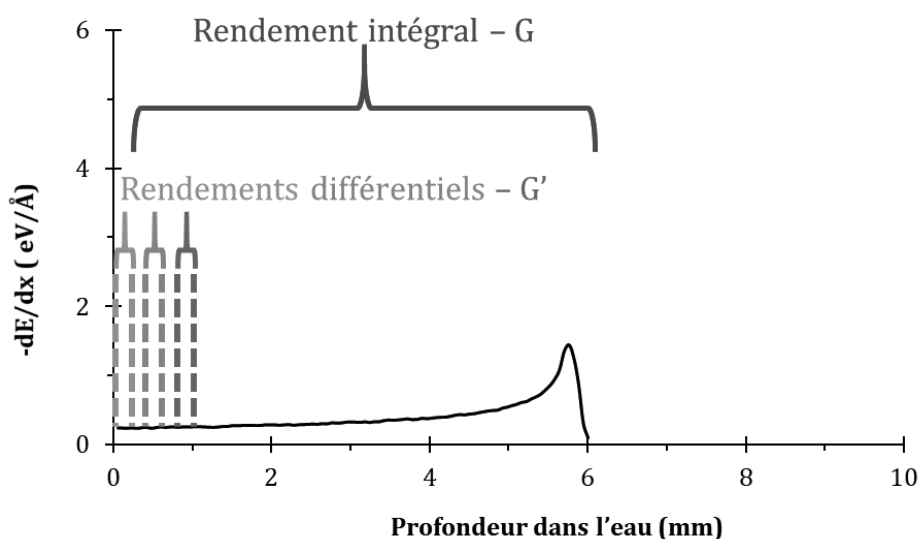
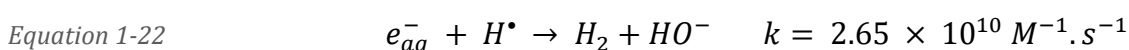
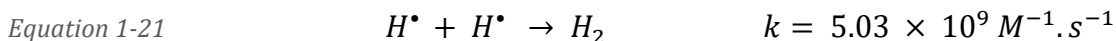


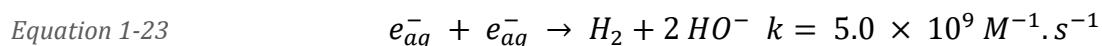
Figure 1-15 Différence entre rendement différentiel et intégral dans la trace d'un faisceau de protons de 24 MeV

### Étape de chimie inhomogène

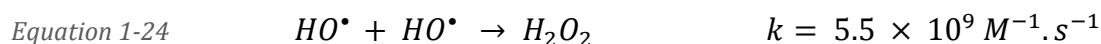
A temps, très court (ps-ns), les espèces formées sont encore dans les zones d'ionisations, témoin du caractère inhomogène du dépôt d'énergie. Les espèces radicalaires, très réactives, vont pouvoir réagir entre elles par des réactions de recombinaison ou de dimérisation, pour former des espèces moléculaires. Ces réactions vont se faire parallèlement à la diffusion des espèces, ce qui entraîne donc une expansion des grappes d'ionisations dans lesquelles se trouvent les radicaux formés. Les rendements en espèces radicalaires vont ainsi décroître avec le temps. Du dihydrogène se forme ainsi selon plusieurs réactions impliquant soit l'électron hydraté et  $H^\bullet$ , forme acide conjuguée de  $e_{aq}^-$  (Equation 1-21 à Equation 1-23).

Ces espèces radicalaires étant extrêmement réactives, leurs constantes de vitesse sont généralement de l'ordre de  $10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$ . On parle alors de réactions « limitées par la diffusion » (Ramos-Méndez *et al.*, 2018).

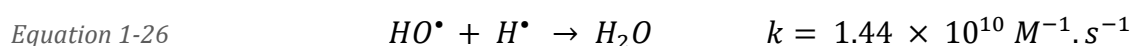
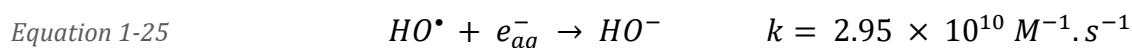




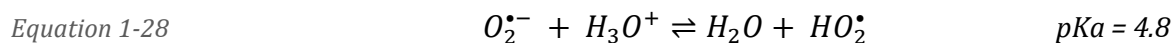
L'eau oxygénée se forme par réaction entre deux radicaux hydroxyles (*Equation 1-24*)



Les rendements des espèces moléculaires vont donc augmenter avec le temps. Certains radicaux vont également réaliser des réactions de recombinaisons avec d'autres espèces (*Equation 1-25 et Equation 1-26*).



Les premiers équilibres acido-basiques des espèces primaires apparaissent durant l'étape de chimie inhomogène (*Equation 1-27 à Equation 1-29*). Les acides et bases conjuguées des espèces primaires de la radiolyse ont ainsi des propriétés similaires et des constantes de vitesse proches pour les réactions de recombinaison, mais le pH pourra donc tout de même avoir un impact sur la radiolyse de l'eau et ses conséquences.



La densité du dépôt d'énergie aura à cette étape des répercussions particulièrement importantes. Tout d'abord, les espèces formées uniquement sous rayonnement à fort pouvoir d'arrêt interviendront également dans les réactions, notamment l'oxygène triplet qui pourra former du dioxygène ou davantage de radical  $HO_2^\bullet$  (*Equation 1-30 & Equation 1-31*)

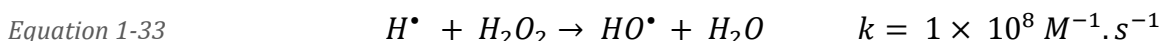
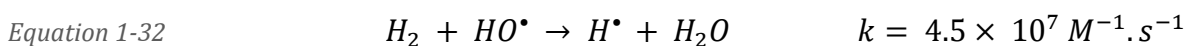


De plus, un TEL plus élevé implique une densité de grappes et de paires d'ions plus importantes et donc une densité de radicaux formés également plus élevée. Ainsi, le rendement radiolytique des espèces radicalaires chute avec le TEL, tandis que le rendement en espèces moléculaires va augmenter. Les quantités d'espèces formées à la fin de l'expansion des traces et donc de l'étape de chimie inhomogène seront donc totalement différentes selon la nature et le TEL du rayonnement. L'étape inhomogène est aussi celle pendant laquelle les réactions avec les solutés très concentrés pourront débiter, généralement à partir de 100ps à 1ns selon la concentration en soluté.

Étape de chimie homogène

A partir d'un temps compris entre 100 ns et 1 µs, qui n'est donc pas clairement établi, l'expansion des traces est terminée et les espèces formées ont suffisamment diffusé dans l'eau pour que leur distribution soit considérée comme homogène.

Le rendement radiolytique observé à ce temps est appelé rendement radiolytique primaire. C'est généralement dans cette échelle de temps que les réactions avec un soluté vont débiter, à l'exception des solutés présents en très fortes concentrations. Les réactions décrites lors de l'étape de chimie inhomogène se produisent encore ici, et des réactions entre les espèces radicalaires et moléculaires peuvent être observées en l'absence de composé en solution (*Equation 1-32 et Equation 1-33*).



Sous rayonnements de haut TEL, les réactions ci-dessus, constituant la réaction en chaîne d'Allen (Allen, 2002), seront plus rares en raison de la diminution des rendements radiolytiques des espèces radicalaires. Cela entraîne ainsi un rendement radiolytique de dissociation de la molécule d'eau plus important.

Les processus ainsi mis en jeu lors de la radiolyse se termineront par une consommation totale des espèces radicalaires primaires, pouvant mener à la formation de dihydrogène et d'eau oxygénée en solution, comme ce fut identifié lors des premières études de la radiolyse de l'eau, à un temps de l'ordre de la milliseconde. Le rendement radiolytique des espèces moléculaires à ce temps est appelé rendement radiolytique global ou apparent qui sera alors noté  $G^\infty(x)$  dans ce manuscrit. La *Figure 1-16* schématise l'évolution de la structure de la trace de l'étape physique jusqu'à l'étape de chimie homogène.

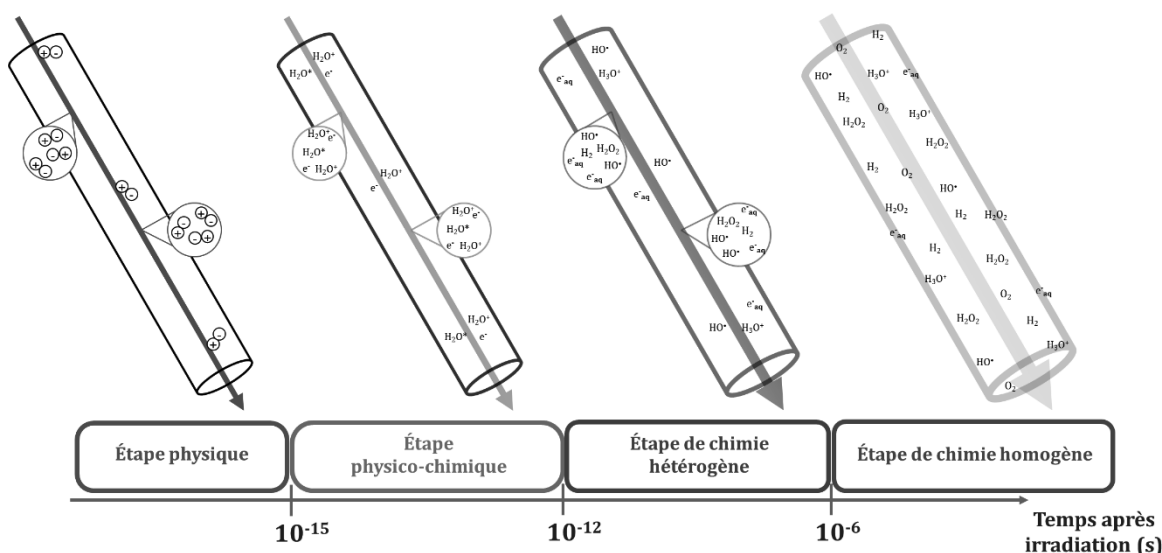


Figure 1-16 Schéma récapitulatif de la structure de la trace du rayonnement ionisant et des espèces formées lors de la radiolyse de l'eau, de l'étape physique jusqu'à l'étape de chimie homogène dans de l'eau pure.



## 4/ Effets de la présence de solutés

Les espèces produites durant la radiolyse de l'eau peuvent réagir avec les solutés présents en solution. La présence d'un soluté va donc modifier les processus mis en jeu dans la radiolyse de l'eau et donc les rendements des différentes espèces.

L'importance de cette modification sera directement liée à la concentration du soluté, cette dernière influençant directement le temps auquel la réaction entre le soluté et l'espèce de radiolyse aura lieu (Equation 1-34). Ce temps caractéristique est appelé **temps de capture** (ou par anglicisme *temps de scavenging*).

$$\text{Equation 1-34} \quad t_{\text{capture}} = \frac{1}{k_S^x \times [S]}$$

Où :  $t_{\text{capture}}$  est le temps de capture en secondes

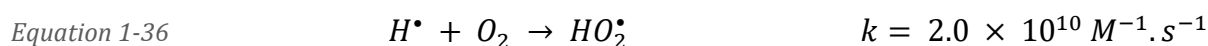
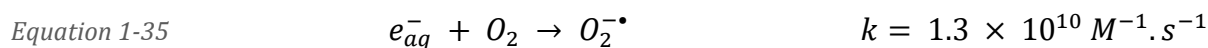
$k_S^x$  Est la constante de vitesse (en  $M^{-1} \cdot s^{-1}$ ) de réaction entre l'espèce x et le soluté S

$[S]$  Est la concentration du soluté S en  $mol \cdot L^{-1}(M)$

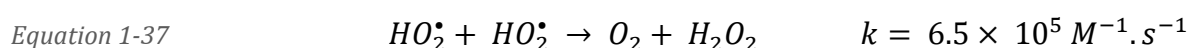
### Influence de l'oxygène

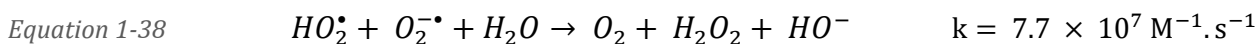
Le dioxygène est quasi-systématiquement présent en solution, et jouera un rôle prépondérant dans les mécanismes de la radiolyse de l'eau. Il pourra intervenir dans les mécanismes réactionnels entre les produits de radiolyse, mais également entre produits de radiolyse et solutés.

La réaction majoritaire, car très rapide, avec les produits de radiolyse de l'eau est celle avec l'électron hydraté, pour former le radical superoxyde (Equation 1-35). Il peut également réagir avec  $H^\bullet$  pour former l'acide conjugué du superoxyde, le radical hydroperoxyde (Equation 1-36). En milieu aéré, la réaction de capture de  $e_{aq}^-$  par  $O_2$  se déroule approximativement 300 ns après action du rayonnement ionisant, la concentration en  $O_2$  dissout étant de 9.1 mg/L (280  $\mu M$ ) à 20°C (Bozorg-Haddad *et al.*, 2021), soit à la frontière entre les étapes de chimie homogène et inhomogène. Les rendements primaires seront donc influencés par l'oxygène.



Les radicaux superoxyde et hydroperoxyde peuvent ensuite former de l'eau oxygénée par dismutation, augmentant le rendement global en  $H_2O_2$  mesuré dans des solutions aérées (Equation 1-37 à Equation 1-39) (B. H. J. Bielski & Allen, 1977). La seconde réaction peut cependant être considérée comme la principale voie de formation de peroxyde d'hydrogène par le radical superoxyde en raison des constantes de vitesse et du pKa du couple  $HO_2^\bullet/O_2^{\bullet -}$  (Rabani & Nielsen, 1969).





$$k = 7.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \text{Equation}$$

L'oxygène joue donc un rôle très important dans les phénomènes sous irradiation dans l'eau, bien qu'il ne réagisse qu'avec deux espèces de la radiolyse de l'eau.

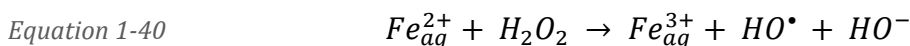
#### *Influence des métaux en solution : exemple du Fer*

Divers métaux sont présents dans le corps humain, oxydés lorsqu'ils sont dissous en solution aqueuse. Parmi ces métaux se trouve le fer, très largement majoritaire en terme de concentration (Zeng *et al.*, 2019). Son exemple sera ainsi utilisé pour illustrer les effets de métaux en solution sur la radiolyse.

Dans le corps humain, le fer est majoritairement présent dans les hèmes de l'hémoglobine et de la myoglobine (Finch, 1958). Sa concentration est alors estimée entre 7 et 29  $\mu\text{mol/L}$  (Sherwood, 2005), majoritairement au degré d'oxydation +II.

L'effet du fer sur la radiolyse de l'eau est donc particulièrement d'intérêt vu sa présence dans le corps humain, ce dernier pourra interférer de façon importante avec les espèces issues de la radiolyse de l'eau.

La **réaction de Fenton** survient en présence de Fe(+II) et d'eau oxygénée. L'action du fer mène ici à la formation d'un radical hydroxyle par dégradation de  $H_2O_2$  ((Winterbourn, 2013)).  $HO^{\bullet}$  étant nettement plus oxydant qu' $H_2O_2$  l'impact de la réaction de Fenton est donc non négligeable en milieu biologique (White *et al.*, 2014).



D'autres métaux peuvent réaliser des réactions similaires, alors appelées **réaction pseudo-Fenton**, comme par exemple le Cuivre I (Burg & Meyerstein, 2012)

Au-delà d'un milieu biologique, les réactions d'ions fer II en solution avec les espèces de la radiolyse de l'eau sont exploitées pour la réalisation du **dosimètre de Fricke**. Son principe de fonctionnement repose sur l'irradiation d'une solution aérée de Fer(II) en milieu acide sulfurique, impliquant donc la réaction de Fenton (Equation 1-40) qui produira du fer III ainsi que la conversion de l'électron hydraté en atome d'hydrogène (Equation 1-27).

Cet atome d'hydrogène pourra réagir avec le dioxygène pour former le radical hydroperoxyde (Equation 1-36). Le fer III sera également formé par l'action d'autres espèces de la radiolyse de l'eau (Equation 1-41 à Equation 1-43)(Pimblott & LaVerne, 2002).

A noter que l'équation 1-40 produit de l'eau oxygénée qui produira à son tour une réaction de Fenton, qui elle-même produit un radical hydroxyle capable de réagir à son tour avec du fer II pour l'oxyder.





Le rendement global en Fer III peut s'écrire :

Equation 1-44 
$$G(Fe_{aq}^{3+}) = G(HO^\bullet) + 2G(H_2O_2) + 3[G(e_{aq}^-) + G(H^\bullet) + G(HO_2^\bullet)]$$

Pour des rayonnements de faible TEL (photons, électrons de plusieurs centaines de keV et au-delà), et à bas débit de dose ( $< 10^6$  Gy/s), ce rendement est estimé à 15,6 espèces/100 eV (Pimblott & LaVerne, 2002).

Le TEL aura un impact fort sur ce système, car impliquant plus de recombinaisons entre les espèces avant que leur réaction avec le fer n'ait lieu, de même que le taux d'oxygène (LaVerne & Schuler, 1987, 1996).

Sachant que le fer peut réagir selon ces réactions même en étant lié à un ligand (Winterbourn, 2013), sa présence ainsi que celle d'autres métaux en milieu biologique complexifie encore plus l'étude de ces systèmes.

## 5/ Étape Biologique

L'action des espèces réactives de radiolyse de l'eau sur les différentes biomolécules (ADN, lipides, protéines) sera discutée ci-après dans une partie dédiée. Les conséquences de ces dégâts sur les biomolécules auront des répercussions à temps long sur le fonctionnement des cellules, qui elles-mêmes pourront impacter les tissus et même l'organisme tout entier, comme cela a été évoqué précédemment.

Au-delà des effets indirects, les rayonnements ionisants peuvent interagir directement avec les biomolécules par *effets directs*, causant eux aussi des altérations. Les premières altérations moléculaires apparaîtront donc plus tôt, avec potentiellement des conséquences biologiques à temps long. L'impact relatif des deux types d'effets sur les dégâts biologiques est grandement discuté et dépend du système étudié. A priori, les effets indirects sont globalement majoritaires (Korystov, 1992).

La *Figure 1-17* schématise les différentes étapes suivant l'interaction d'un rayonnement avec un milieu biologique, allant de l'étape physique à l'étape biologique (d'après (Buxton, 2008; Dertinger & Jung, 1970b).

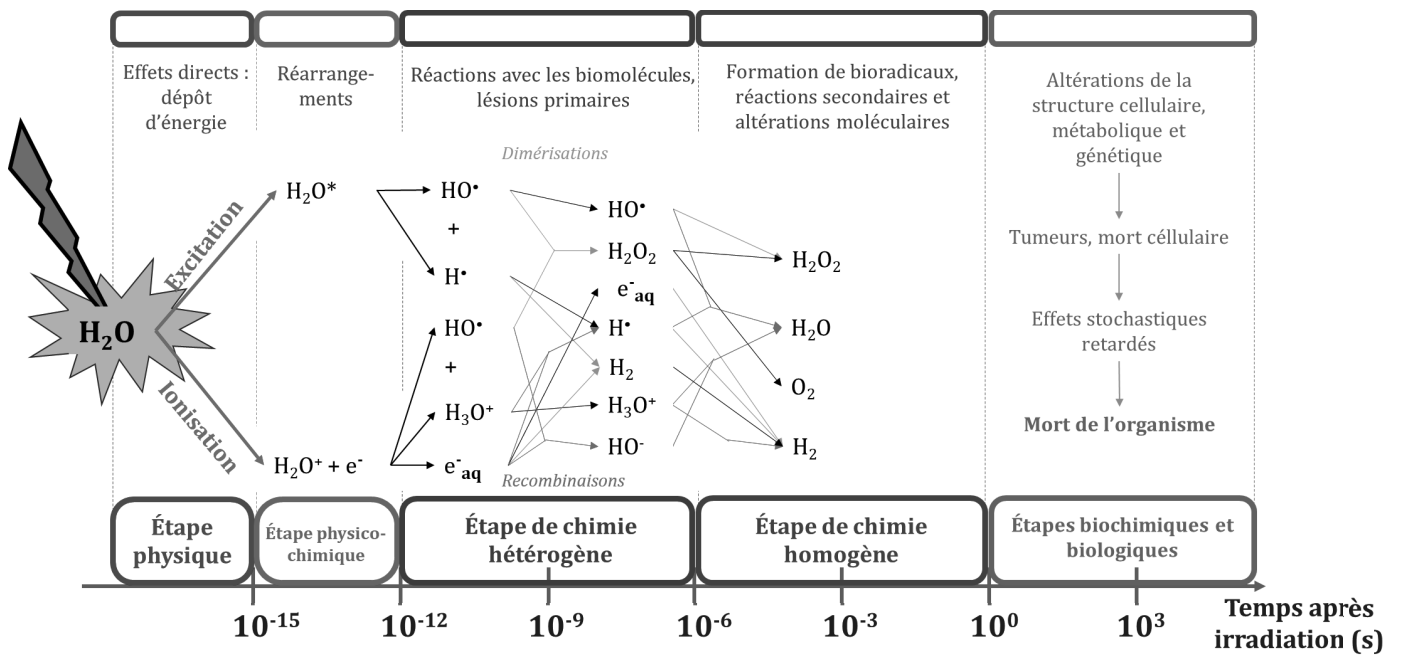


Figure 1-17 Schéma récapitulatif des différentes étapes suivant l'interaction d'un rayonnement ionisant en milieu biologique d'après (Buxton, 2008; Dertinger & Jung, 1970b).

## **D/ Interactions avec le vivant : l'ADN et les lipides**

Biomolécules d'un intérêt particulièrement important, l'ADN et les lipides sont des cibles importantes des effets des rayonnements sur le vivant.

N'étant pas le sujet de cette étude, les effets sur ces deux familles de biomolécules seront rapidement évoqués dans la partie suivante. Ils seront explicités plus en détail en *Annexe 1 &*

*Annexe 2 respectivement.*

### 1/ L'ADN

Biomolécule responsable de l'information génétique dans nos cellules, l'ADN se situe dans le noyau de celles-ci et représente 0.3 % de la masse des cellules (Uzman, 2010). De par son rôle dans le stockage de l'information génétique, les dommages sur l'ADN sont critiques et peuvent entraîner la mort cellulaire ou des mutations.

L'unité de formation de l'ADN est le nucléotide, qui est composé d'une unité phosphate, d'un sucre (ici le désoxyribose) et d'une base azotée. Ces bases sont classées en deux groupes : les purines, Adénine (A) et Guanine (G), et les pyrimidines, Cytosine (C) et Thymines (T). Spatialement, il adopte une structure en forme de double hélice maintenue grâce aux liaisons hydrogène entre les bases (A-T et C-G). A l'échelle supérieure, l'hélice se structure en chromatine grâce à son organisation avec une famille de protéines, les histones.

Les dommages à l'ADN peuvent être causés par effets directs ou indirects, avec une dominance (bien que toujours discutée) des effets indirects (Bernhard & Close, 2003; Sevilla & Bernhard, 2008). Les attaques du radical hydroxyle peuvent se faire sur les bases ou sur le squelette phosphate/sucre, avec une proportion d'attaques de 50/50. Toutefois, des mécanismes de transferts de charge ou de radicaux entraînent au final une localisation des dommages sur les bases à hauteur de 90 % (Shukla *et al.*, 2005).

Du point de vue structurel, les dommages vont entraîner des ruptures simples ou doubles brins. Le deuxième type est le plus dangereux, car beaucoup plus compliqué à réparer efficacement sans erreur. Ainsi, ces ruptures peuvent mener à la mort cellulaire et à des mutations ou aberrations chromosomiques.

Le TEL joue également un rôle important dans les dommages à l'ADN. En effet, la localisation des attaques, ainsi que la quantité de ruptures double-brins sont modifiées selon le TEL du RI utilisé (Becker *et al.*, 1996; Douki *et al.*, 2006)

Il a été démontré par l'utilisation de *micro faisceaux* qu'une irradiation spécifique du cytoplasme pouvait engendrer des dommages sur l'ADN, suggérant que des dommages sur d'autres biomolécules produisent au final des dommages sur l'ADN dans le noyau et ainsi la mort cellulaire ou des mutations (Wu *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2009).

### 2/ Les lipides

Les lipides sont les principaux constituants des membranes cellulaires. Ils représentent 10 % en masse du matériel contenu dans une cellule. Bien que les dommages à l'ADN aient été longtemps considérés comme seuls responsables de la mort cellulaire, il est désormais clair que les membranes, et donc les lipides qui les constituent, sont aussi des cibles critiques des rayonnements ionisants (Benderitter *et al.*, 2003),

Les lipides se structurent autour d'une longue chaîne carbonée apolaire et d'une tête polaire, dont la nature change selon le type de lipide.

Bien que les proportions exactes soient discutées, il semblerait que la majorité des dégâts proviennent des effets indirects et surtout du radical HO• (Gardes-Albert, 2008).

L'altération principale des lipides est une peroxydation, initiée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène par HO• et qui se propage par réaction en chaîne en présence d'O<sub>2</sub>. L'oxydation causée par le radical hydroxyle peut aussi mener à une fragmentation des chaînes lipidiques (Shadyro *et al.*, 2004).

Les lipides étant souvent associés à des protéines, omniprésentes dans les cellules, celles-ci peuvent également jouer un rôle important dans les dommages causés aux membranes. Leur omniprésence, leur mobilité et leurs rôles variés dans les cellules en fait également des candidates majeures pour expliquer les dommages causés à l'ADN et les morts cellulaires observés lors d'irradiations cytoplasmiques (Wu *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2009).

## **E/ Interactions avec le vivant : les protéines**

De par leur représentation importante dans les cellules, à hauteur de 20% en masse soit les deux tiers du matériel biologique, les protéines seront statistiquement parmi les cibles majoritaires des effets des rayonnements ionisants. De plus, leur omniprésence au contact d'autres biomolécules, complexes lipoprotéiques dans les membranes ou avec histones responsables de la structure condensée de l'ADN, en fait des candidates pour des transferts de dommages vers les autres biomolécules présentes en plus faible quantité.

Les protéines sont globalement suffisamment concentrées pour être touchées par les effets directs, et leur concentration en fait une cible majeure des espèces issues de la radiolyse de l'eau (M. J. Davies, 2005). Les constantes de vitesse sont de plus très élevées, les réactions étant souvent limitées par la diffusion, pour des réactions avec les protéines (Buxton *et al.*, 2009).

Bien qu'aucune étude ne discutant de la proportion des deux types d'effets sur les protéines n'ait été réalisée à notre connaissance, tous deux sont attendus comme importants dans une cellule.

Les effets indirects seront majoritairement discutés ici, car ce travail de thèse a porté essentiellement sur la radiolyse d'acides aminés en solutions diluées. Toutefois, une revue rapide des effets directs sera réalisée.

### **1/ Structure des protéines**

Tout comme les biomolécules évoquées précédemment, les protéines ont plusieurs niveaux de structure.

Les peptides et les protéines sont des biomolécules constituées d'un enchaînement d'unités de construction appelées acides aminés. La structure dite primaire de ces biomolécules correspond ainsi à l'enchaînement d'acides aminés liés entre eux. Ces acides aminés sont plus précisément des acides  $\alpha$ -aminés, la fonction amine se trouvant sur le carbone en  $\alpha$  de l'acide carboxylique. Ces derniers, dans les peptides et les protéines, sont liés entre eux par une liaison peptidique, qui correspond à une fonction amide résultant de la réaction entre l'acide carboxylique d'un acide aminé et l'amine d'un autre (Figure 1-18).

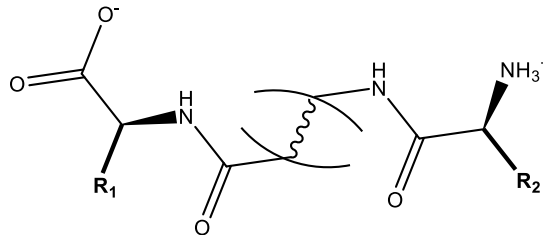


Figure 1-18 Représentation générale de la structure primaire d'une protéine, les acides aminés sont liés entre eux par une liaison amide.  $R_1$  et  $R_2$  correspondent aux chaînes latérales.

Les acides aminés protéinogènes, c'est-à-dire ceux constituant les protéines, sont au nombre de 21 chez les organismes eucaryotes, et 22 chez les bactéries. L'ensemble des acides aminés des eucaryotes est regroupé sur la Figure 1-19 (Buxbaum, 2007a). La sélection de ces 21 - 22 acides aminés protéinogènes serait liée à des raisons de repliement et d'optimisation structurale des protéines (Makarov *et al.*, 2023). Ils se trouvent tous naturellement en configuration L, à l'exception de la glycine qui n'est pas chirale. Leur caractéristique se situe au niveau de leur chaîne latérale, unique pour chaque acide aminé, et leur donnant des propriétés spécifiques. Il est possible de les classer selon celles-ci, certaines étant chargées, polaires ou apolaires (on peut également remarquer l'existence d'acides aminés aromatiques). Parmi ces acides aminés, 9 sont dits essentiels pour les humains : ils ne sont pas synthétisés par le corps et doivent être acquis via l'alimentation afin de garantir la synthèse protéique. A pH physiologique, les acides aminés sont sous leur forme zwitterion : l'amine est protonée et l'acide carboxylique non protoné. La numérotation des acides aminés dans la structure primaire se fait en débutant par le résidu dont la fonction amine est libre, il est appelé N-terminal (N-term). Le résidu dont la fonction acide carboxylique est libre sera donc le dernier, et appelé C-terminal (C-term).



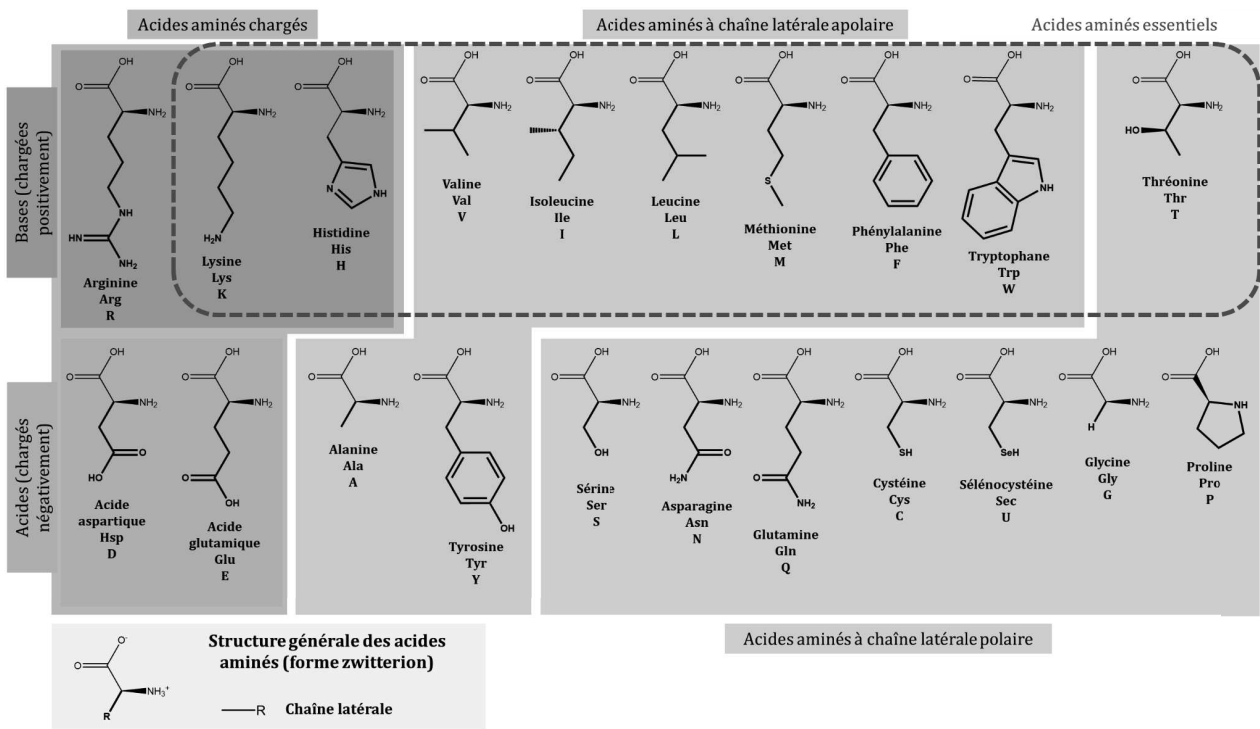


Figure 1-19 Récapitulatif des différents acides aminés classés selon la nature de leur chaîne latérale

## Structure secondaire

Au-delà de la structure primaire se trouve la structure secondaire, correspondant aux interactions inter résidus<sup>4</sup> au sein d'une même chaîne polypeptidique. Ces structures sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre les fonctions amides des acides aminés, plus précisément entre les oxygènes des groupements carbonyles et les hydrogènes des groupements amines de ces fonctions. Bien que ce soit des liaisons faibles, leur nombre conséquent à l'échelle d'une structure entière stabilise grandement celle-ci. Trois motifs structuraux peuvent être distingués :

Les hélices  $\alpha$  correspondent à une chaîne peptidique enroulée sur elle-même ayant un diamètre de 5.4 Å. Dans cette structure les chaînes latérales des acides aminés sont dirigées vers l'extérieur de l'hélice et les liaisons hydrogène sont établies entre un résidu  $x$  et celui se trouvant en  $x+4$  sur la chaîne peptidique. La rotation de l'hélice, se fait dans le sens anti-horaire. Deux types particuliers d'hélices peuvent également être rencontrés, l'hélice  $3_{10}$  où les liaisons H sont entre les résidus  $x$  et  $x+3$  et les hélices  $\pi$  où les liaisons H se font entre les résidus  $x$  et  $x+5$

Les feuillets  $\beta$ , qui peuvent être séparés en deux sous-structures. Premièrement, les brins  $\beta$  ( $\beta$ -Strand), dans lesquels la chaîne peptidique est étendue sur une longueur de trois à dix acides aminés. Les résidus d'un brin isolé ne sont pas liés entre eux par des liaisons hydrogène, mais ils restent des structures relativement stables. Les brins beta peuvent ainsi se lier faiblement par des liaisons hydrogène (deux à trois selon la longueur) à d'autres brins, formant alors les feuillets  $\beta$ . Les brins ne sont pas plans, mais plutôt des structures contenant des torsions, à la manière d'un accordéon. Dans un feuillet, les brins peuvent être dits parallèles ou antiparallèles, c'est-à-dire que les fonctions C-term pointeront soit dans le même sens (parallèle) soit dans le sens opposé entre deux brins successifs (antiparallèle) (Figure 1-20).

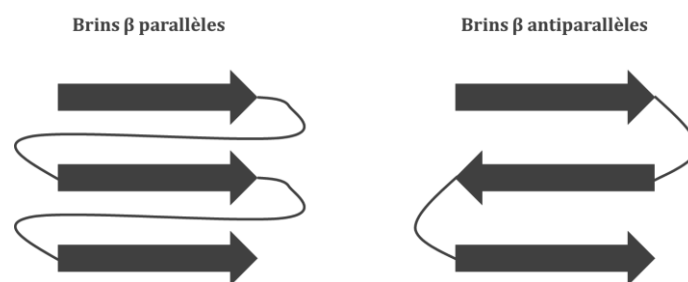


Figure 1-20 Représentation schématique de brins  $\beta$  parallèles et antiparallèles

Ces brins  $\beta$  antiparallèles sont reliés entre eux par des coudes  $\beta$ , de  $180^\circ$ , constitués généralement de 4 acides aminés. Des coudes  $\gamma$  existent également, constitués de 3 résidus, mais sont beaucoup plus rares. Les brins parallèles sont reliés entre par des chaînes trop longues pour être des coudes  $\beta$ , tout comme les tronçons reliant des hélices et des feuillets, ce sont les pelotes.

Les « pelotes » (*coils*) correspondent aux structures autres que celles présentées ci-dessus.

<sup>4</sup> Résidu = Acide aminé impliqué dans un peptide

N'affichant pas de motif particulier, les résidus constituant ces pelotes ont tout de même une position définie et ne sont pas donc pas désordonnés, contrairement à ce que les dénominations « pelotes aléatoires » (*random coils*) laissent sous-entendre.

Ces structures servent à apporter de la flexibilité à la protéine, cruciale lors des processus impliquant un mouvement de celle-ci (Buxbaum, 2007b).

### Structure tertiaire et au-delà

Les différents motifs de structures secondaires vont ainsi également s'organiser dans l'espace, formant ainsi la structure tertiaire des protéines (*Figure 1-21*). Cette organisation spatiale se fait cette fois-ci par les chaînes latérales des résidus selon leurs propriétés. Les acides aminés chargés pourront ainsi former des liaisons ioniques entre eux, les chaînes apolaires hydrophobes auront tendance à se regrouper vers l'intérieur de la protéine tandis que les chaînes hydrophiles iront vers l'extérieur. S'ajouteront à cela des liaisons hydrogène, des interactions de Van Der Waals ou encore du  $\pi$ -stacking<sup>5</sup> pour les chaînes latérales aromatiques. Les cystéines joueront un rôle particulièrement important dans cette structure tertiaire car en milieu suffisamment oxydant, les atomes de soufre de deux cystéines pourront se lier de façon covalente, formant ainsi un pont disulfure. Cette structure tertiaire sera primordiale pour la structure et les propriétés des protéines.

Le terme de structure quaternaire concerne les protéines composées de motifs récurrents ou protomères, qui sont des protéines ayant leurs propres structures tertiaires. Ces protomères peuvent s'organiser entre eux pour former une protéine de taille plus importante, et cette structure sera alors la structure quaternaire. Par exemple, l'hémoglobine qui est un diprotomère.

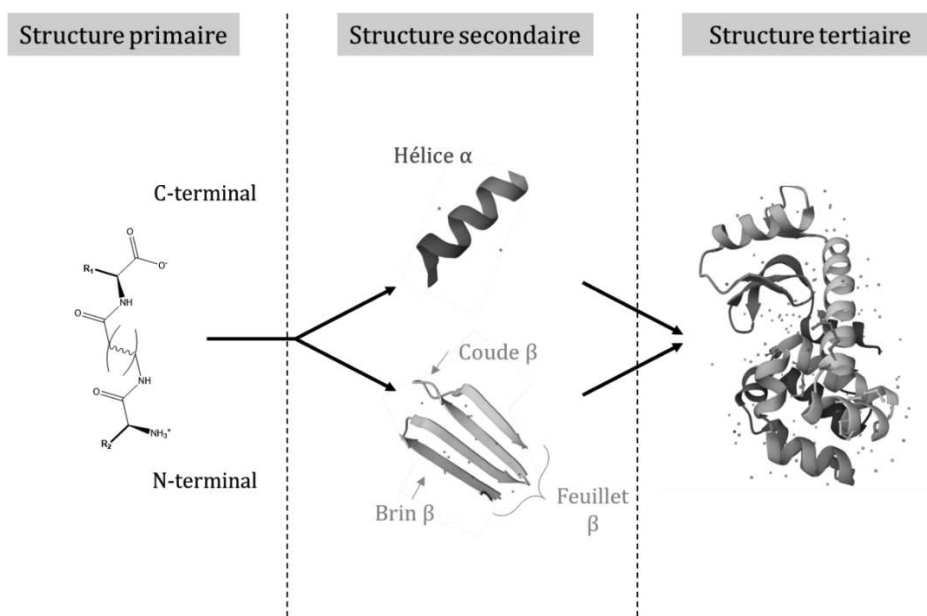


Figure 1-21 De la structure primaire à la structure tertiaire des protéines d'après Greive et al., 2016 et Makabe et al., 2007

<sup>5</sup> Interactions faibles entre les orbitales  $\pi$  de cycles aromatiques proches et parallèles dans l'espace

Dans les cellules, les protéines sont rarement isolées : elles forment des complexes entre elles ou avec d'autres biomolécules, comme les histones qui se lient avec l'ADN ou encore les lipoprotéines dans les membranes qui sont des complexes lipides-protéines. La stabilisation de ces complexes de biomolécules se fait par les mêmes interactions que l'organisation des structures tertiaires et quaternaires. Dans les lipoprotéines, les résidus hydrophiles et hydrophobes s'organisent pour interagir avec les zones hydrophiles/hydrophobes des lipides de façon optimale.

## 2/ Altérations des acides aminés et de la structure primaire – effets indirects

Les dommages aux acides aminés et sur la structure primaire des peptides et protéines, donc sur les résidus impliqués dans des liaisons peptidiques, ont été largement étudiés durant les années 1980. La plupart de ces travaux se sont concentrés sur les irradiations par des photons. Peu d'études sont disponibles sur les effets sous faisceaux d'électrons et presque aucune étude sur ces biomolécules sous irradiations par des ions n'a été réalisée. Le débit de dose est également un paramètre très peu étudié, et souvent non mentionné.

### Généralités

En conditions d'irradiations classiques, les réactions d'oxydations sont de très loin la source principale de dommages aux acides aminés, d'une part en raison de la réactivité plus importante du radical  $\text{HO}\cdot$ , et d'autre part car l'électron hydraté est rapidement capté par l'oxygène pour donner l'oxydant  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les réductions seront donc essentiellement significatives en conditions anoxiques. Sur la chaîne principale, l'unique action possible est un arrachement d'hydrogène sur le  $\text{C}\alpha$  formant ainsi un radical stabilisé par effet captodatif (Viehe *et al.*, 1985), c'est-à-dire par la délocalisation électronique sur les fonctions amines et acide carboxylique. Ce radical peut alors recombinaison avec un autre radical identique, formant ainsi une imine, ou avec le dioxygène pour former une imine qui pourra s'hydrolyser en formant de l'ammoniaque (Figure 1-22).

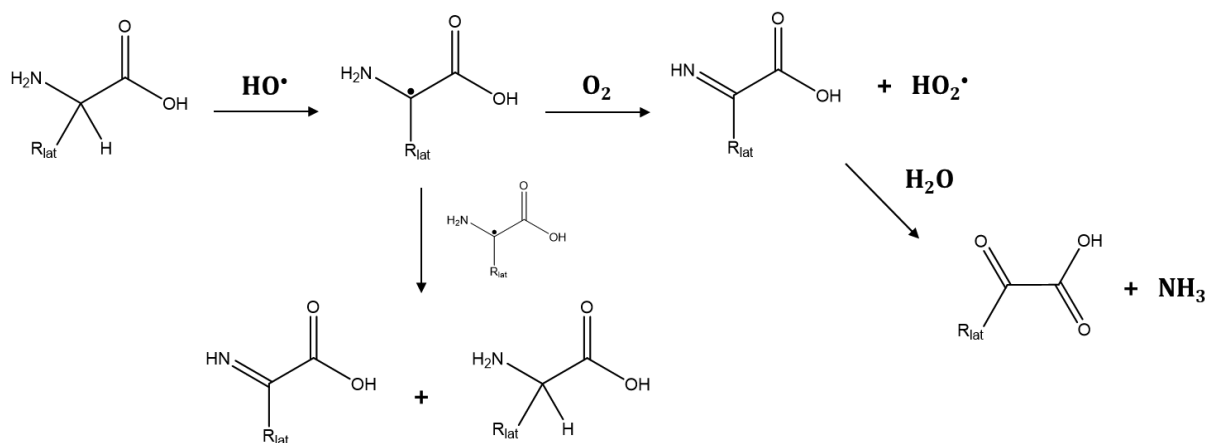


Figure 1-22 Mécanisme réactionnel de l'action de  $\text{HO}\cdot$  sur le  $\text{C}\alpha$  d'un acide aminé (d'après Garrison, 1987)

Plus la chaîne latérale est longue, plus les altérations localisées sur la chaîne principale seront réduites, allant de la totalité dans le cas de la glycine, qui ne possède pas de chaîne latérale, à seulement 10% pour l'isoleucine.

En raison de leurs différentes chaînes latérales, les acides aminés n'ont bien entendu pas la même réactivité avec le radical hydroxyle (Tableau 1-3). De façon générale, les acides aminés aliphatiques subiront une abstraction d'hydrogène dans des proportions dépendant de la longueur de la chaîne. Ceci mènera alors à des hydroxylations ou des carbonylations après réaction avec O<sub>2</sub>. Concernant Asp et Glu, ces altérations seront localisées quasi-exclusivement sur le Cα' de la fonction acide carboxylique de la chaîne latérale. Les acides aminés aromatiques seront oxydés par des additions-éliminations aboutissant à des hydroxylations sur le cycle aromatique, avec presque aucune abstraction d'hydrogène sur la chaîne principale. Ces oxydations seront détaillées pour Phe, Met et Trp.

Tableau 1-3 Récapitulatif des constantes de vitesse avec HO• des différents acides aminés ((Buxton et al., 2009))

Acide aminé	$k_x^{HO\cdot}$ (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
Arginine	$3.5 \times 10^9$
Lysine	$3.4 \times 10^8$
Histidine	$1.3 \times 10^{10}$
Acide aspartique	$7.5 \times 10^7$
Acide glutamique	$2.3 \times 10^8$
Alanine	$7.7 \times 10^7$
Valine	$7.6 \times 10^8$
Leucine	$1.7 \times 10^9$
Isoleucine	$1.8 \times 10^9$
<b>Méthionine</b>	<b><math>8.3 \times 10^9</math></b>
<b>Phénylalanine</b>	<b><math>6.5 \times 10^9</math></b>
<b>Tryptophane</b>	<b><math>1.3 \times 10^{10}</math></b>
Tyrosine	$1.3 \times 10^{10}$
Thréonine	$5.1 \times 10^8$
Sérine	$3.2 \times 10^8$
Asparagine	$4.9 \times 10^7$
Glutamine	$5.4 \times 10^8$
Cystéine	$3.4 \times 10^{10}$
Sélénocystéine	$2.1 \times 10^9$
Glycine	$1.7 \times 10^7$
Proline	$4.8 \times 10^8$

En l'absence d'oxygène, l'électron hydraté réagit avec les acides aminés libres et petits peptides pour former également de l'ammoniaque. Cette réaction est d'ailleurs à la base d'une sonde moléculaire de l'électron hydraté, la glycylglycine (LaVerne et al., 2005).

Ces dégâts observés sur les acides aminés libres peuvent être en majorité directement transposés aux altérations sur la structure primaire des peptides et protéines.

Les dommages causés sur la chaîne principale, ou squelette, seront ainsi minoritaires et dépendants des résidus locaux. Ces réactions seront également des arrachements d'hydrogène sur le C $\alpha$  pour former un radical relativement stable. Il pourra réagir avec un autre radical de même nature, d'une autre molécule ou de la même, comme un acide aminé libre. Ce processus est toutefois supposé minoritaire en milieu biologique. Il pourra également réagir avec O $_2$  pour former cette fois-ci un radical peroxyde (*Figure 1-23-a.*). La finalité de ce radical n'a pas encore été exactement déterminée. Il semblerait que sa voie de réaction principale soit l'élimination de HO $_2^{\bullet}$ , générant ainsi une imine qui pourra s'hydrolyser causant ainsi une rupture de liaison de la chaîne principale (Garrison, 1987). Le radical peroxyde peut également réagir avec une autre chaîne ou un autre résidu pour arracher un hydrogène, formant alors un hydroperoxyde et un nouveau radical carboné. L'hydroperoxyde formé pourra lui aussi mener à une rupture de la chaîne principale.

L'importance des hydroperoxydes, et donc de l'oxygène, est soulignée par la faible proportion des ruptures de liaisons en milieu anoxique.

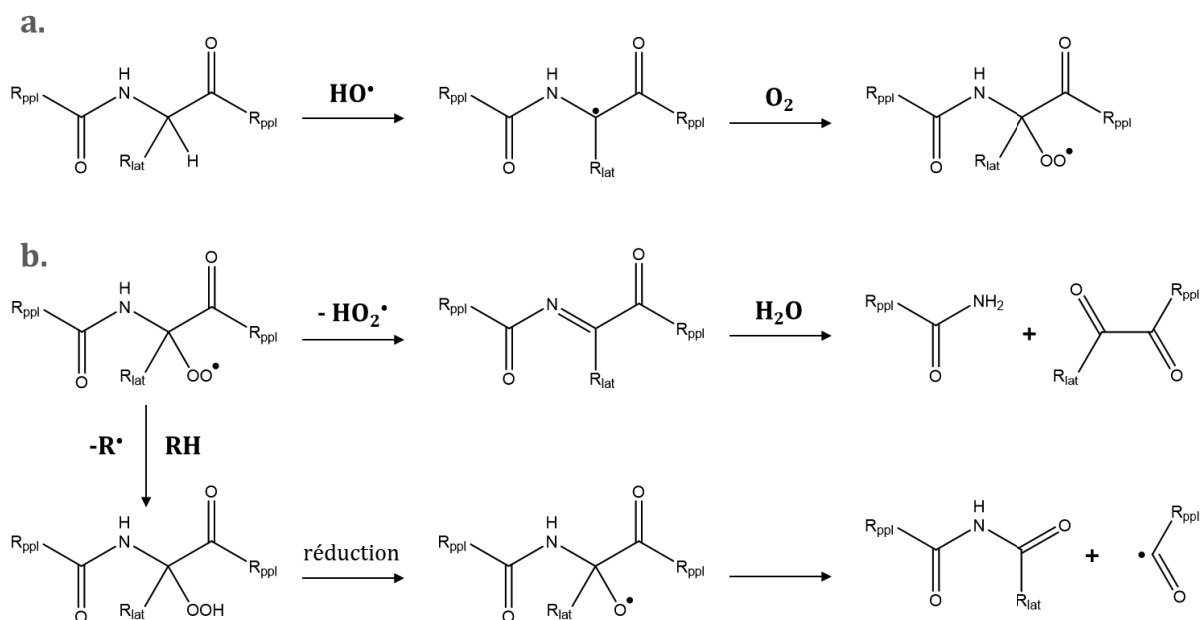


Figure 1-23 Mécanisme réactionnel de l'action de HO $\bullet$  sur le C $\alpha$  d'un résidu sur la chaîne principale d'un peptide ou d'une protéine. Contribution de l'intermédiaire peroxyde (Garrison, 1987).

Sur les chaînes latérales, ces réactions suivent les mêmes principes que celles évoquées dans le cas des acides aminés libres, avec quelques variations liées à la liaison peptidique, comme cela sera détaillé pour les acides aminés d'intérêt pour ce travail de thèse.

Les altérations de Glu sont particulièrement intéressantes car le radical peroxyde intermédiaire peut, en plus de mener à une hydroxylation, mener à une rupture de liaison de la chaîne latérale, formant un alcène en équilibre avec une imine sur le peptide ou la protéine. Cette imine pourra alors être hydrolysée entraînant une rupture de la chaîne principale suite à une réaction située sur la chaîne latérale de Glu (*Figure 1-24*).

La cystéine est aussi d'un intérêt particulier, car en plus d'être le résidu le plus réactif avec HO•, elle est impliquée dans la formation de ponts disulfures particulièrement stabilisants qui seront brisés suite à l'oxydation par le radical.

En l'absence d'oxygène, les radicaux formés par attaque de HO• et de l'électron hydraté peuvent réagir entre eux pour former des dimères, par la chaîne principale ou par les chaînes latérales. Ce type de réaction est également observé en condition oxygénée bien qu'en proportions moindres (Carroll *et al.*, 2017). Des hydroperoxydes peuvent aussi être produits sur les chaînes latérales des résidus, dont la quantité dépendra de la nature du résidu. Val est ainsi le résidu le plus propice à leur formation tandis que la méthionine n'en formera aucun (M. J. Davies, 2016).

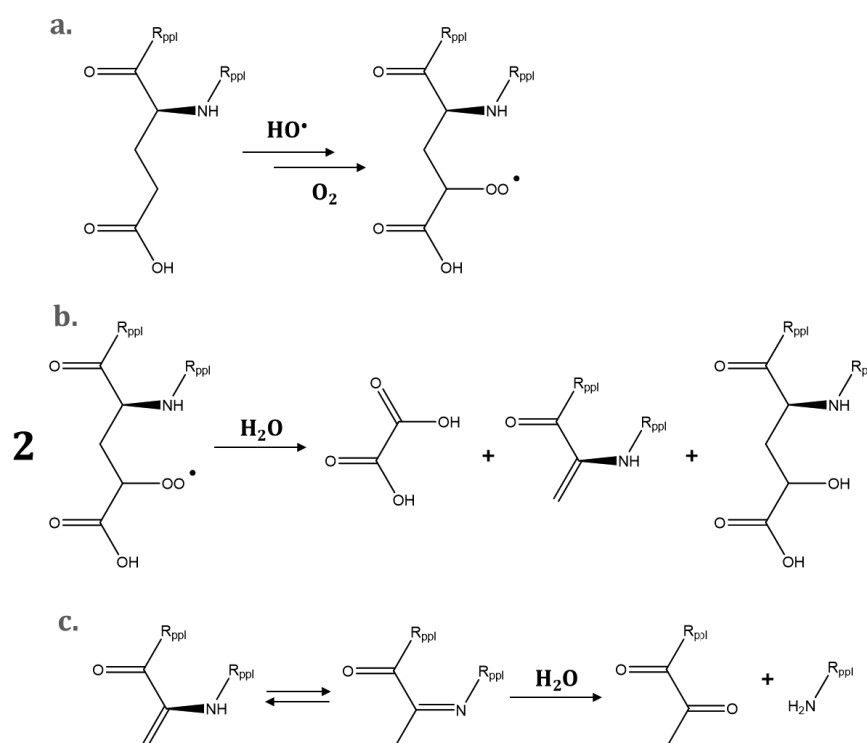


Figure 1-24 Transfert de dommage depuis la chaîne latérale de Glu vers la chaîne principale du peptide ou de la protéine (M. J. Davies, 2016).

### La phénylalanine

La radiolyse de la phénylalanine a été étudiée sous irradiation par des photons dans la littérature et par des protons de 2 MeV dans le cadre de la thèse de Nicolas Ludwig.

Les produits majoritaires de cette radiolyse en solution diluée sont les tyrosines, avec une hydroxylation en positions ortho- meta- ou para- (Solar *et al.*, 1984a). Celles-ci se forment suite à une attaque de HO• sur le cycle aromatique, formant un radical intermédiaire hydroxycyclohexadiényle puis par action de l'oxygène (Figure 1-25b.) ou par une voie de dismutation (e.). Dans le cas des irradiations par les protons de 2 MeV, des dimères hydroxylés ou non sont observés, ainsi qu'une quantité significative de 2,5-DOPA (DiHydroxy-Phénylalanine), qui devient l'un des produits majoritaires (Ludwig *et al.*, 2018).

Les DOPA, aussi formées en positions 3,4 et 2,3 sont à bas TEL des produits de suroxydation, et donc minoritaires en raison de la concentration en tyrosine largement inférieure à la concentration de phénylalanine en solution.

Peu d'études avec des ions sont disponibles et ne font pas mention de la 2,5-DOPA ou des dimères (Taguchi *et al.*, 2001).

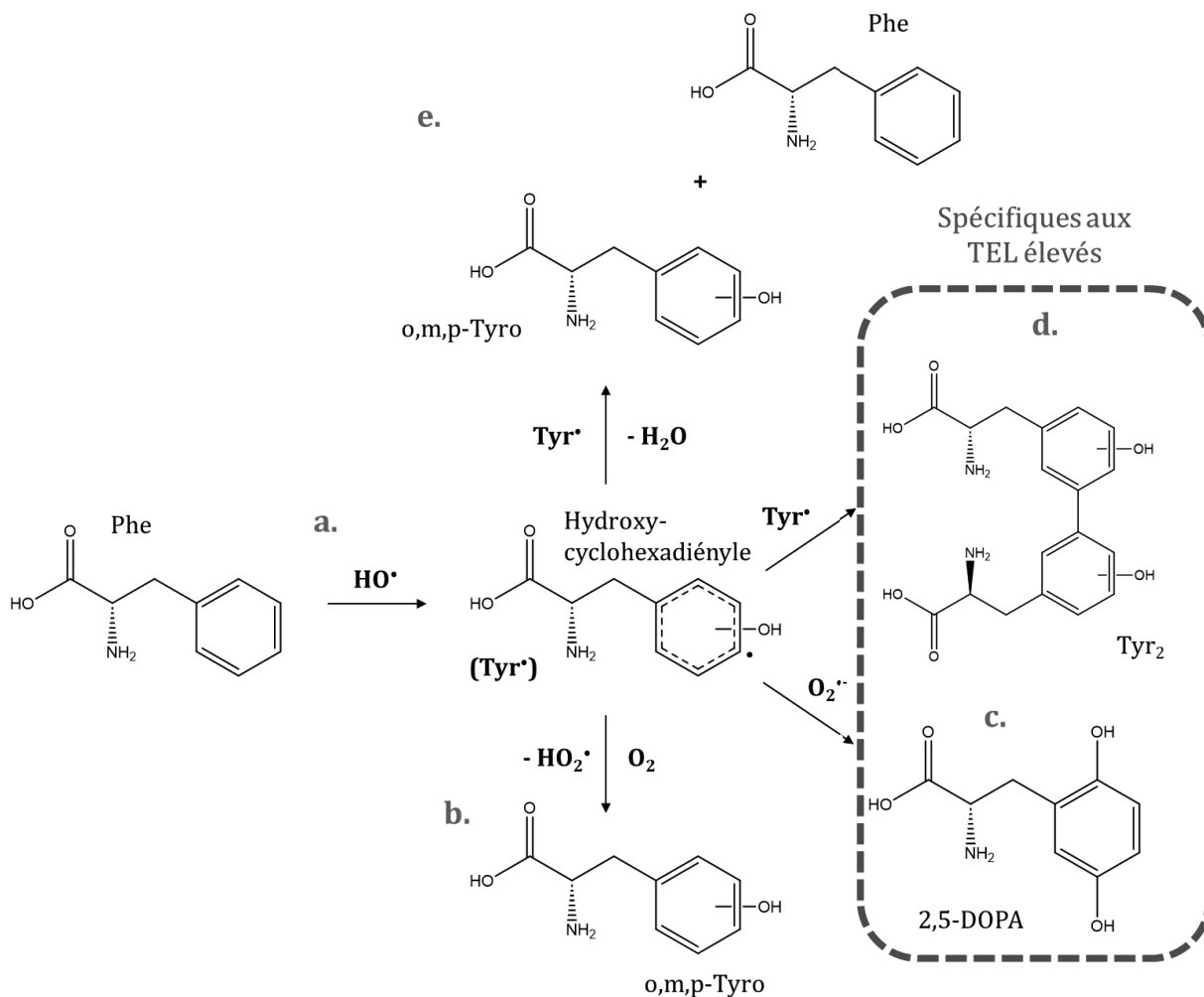


Figure 1-25 Mécanisme réactionnel menant à la formation des produits de radiolyse de Phe avec mise en avant des produits spécifiques aux TEL élevés. D'après Ludwig *et al.*, 2018.

En ce qui concerne la régiosélectivité, 94% des attaques se feraient sur le cycle aromatique de la phénylalanine, avec une préférence selon les positions (ortho > para > meta) (Solar, 1985). Les proportions des différentes tyrosines formées restent toutefois similaires.

La formation de dimères a été reporté à bas TEL mais seulement à dose très élevée ou en conditions hypoxiques (Wheeler & Montalvo, 1969). Dans ces conditions, l'électron hydraté peut réagir avec Phe pour former un radical de type cyclohexadiényle (Phe•) ( $k_{\text{Phe}}^{e_{aq}^-} = 1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). En conditions aérées, la constante de réaction entre l'électron et le dioxygène favorisera largement cette réaction (sauf à haute concentration en Phe), rendant minoritaire la réaction de Phe avec  $e_{aq}^-$ .



En l'absence d'oxygène, les radicaux intermédiaires formés (Tyr• et Phe•) pourront alors beaucoup plus facilement se rencontrer, favorisant alors les réactions bi radicalaires. Ainsi, les tyrosines se forment uniquement par la voie de dismutation, et la rencontre favorisée entre les radicaux permet la formation de dimères (Phe-Tyr ou Phe-Phe), y compris à bas TEL.

### La méthionine

Bien qu'étudiés depuis plusieurs décennies, les mécanismes de dégradation de la méthionine sous irradiation ne sont pas encore clairement établis. Les discussions restent ouvertes quant à la nature des produits formés et surtout des espèces oxygénées responsables de leur formation (Bobrowski et al., 2008; Cataldo et al., 2011; Schöneich, 2012; Schöneich et al., 1993). Le groupement thioéther de la méthionine est très sensible à l'oxydation. Sa transformation en sulfoxyde de méthionine (MetO) est une oxydation très courante dans le monde du vivant. Elle joue d'ailleurs un rôle important dans l'homéostasie redox ou dans le processus de vieillissement des cellules (Houée-Levin & Bobrowski, 2013), ou encore dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Schöneich, 2005). Il existe notamment une enzyme, la méthionine sulfoxyde réductase, qui a pour rôle de régénérer la méthionine (Sreekumar *et al.*, 2011). Cette dernière pourrait alors être utilisée comme antioxydant naturel.

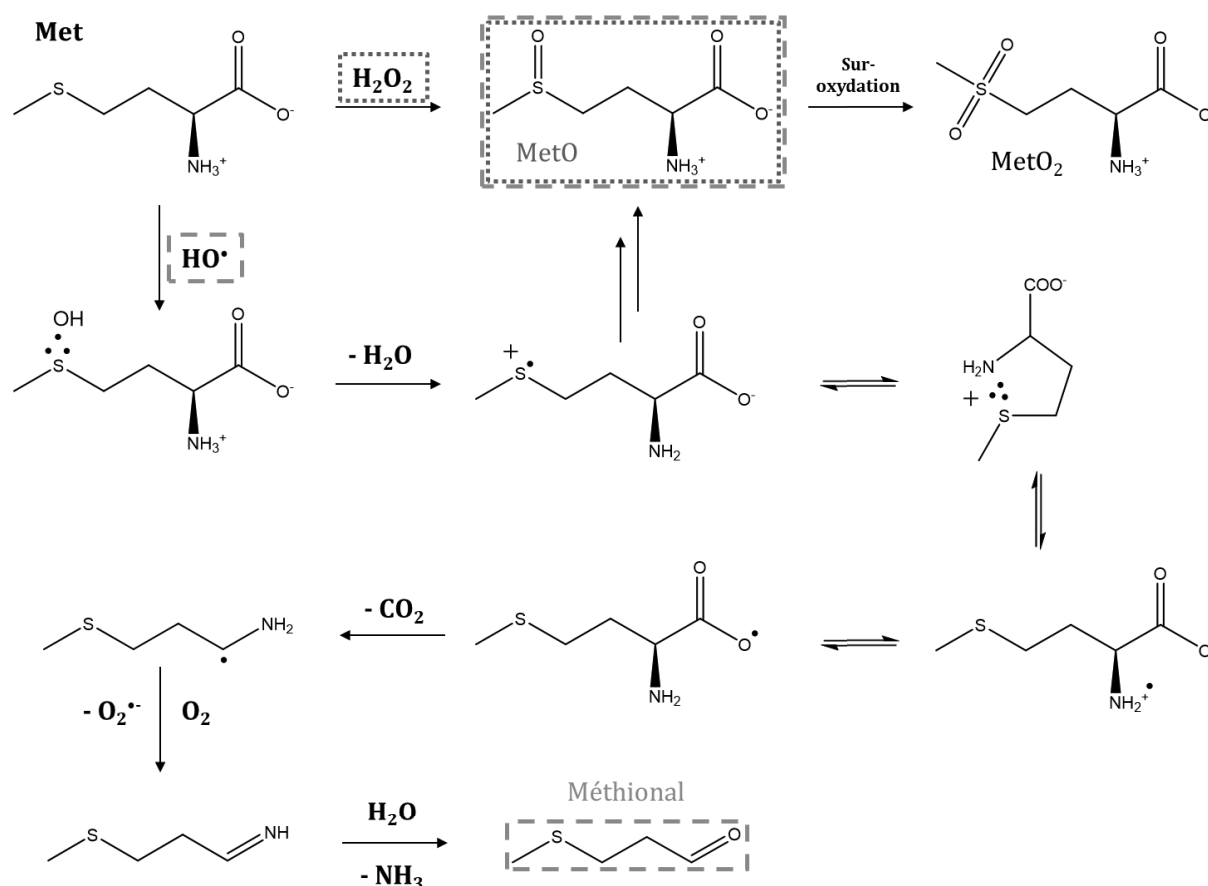


Figure 1-26 Mécanisme réactionnel de l'oxydation de la méthionine libre par  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  d'après (Barata-Vallejo et al., 2010; Ignasiak et al., 2011; Marciniak & Bobrowski, 2022)

Barata-Vallejo *et al.* ont étudié l'altération de la méthionine sous irradiation par des rayonnements gamma et sont arrivés à la conclusion que ce sulfoxyde de méthionine résultait exclusivement de la réaction de la méthionine avec le peroxyde d'hydrogène (Barata-Vallejo *et al.*, 2010). Cette conclusion est toutefois très controversée, et d'autres études plus récentes portant sur la radiolyse de la méthionine libre et dans un dipeptide Lys-Met ont montré l'implication du radical hydroxyle dans la formation du sulfoxyde de méthionine (Ignasiak *et al.*, 2011).

En effet, malgré l'ajout de catalase, une enzyme capable de dégrader l'eau oxygénée, la formation de MetO a tout de même été observée sous irradiation par des rayons  $\gamma$  ( $^{60}\text{Co}$ , à 30 Gy/min).

Le sulfoxyde de méthionine se forme néanmoins dans des quantités bien moindres qu'en absence d'enzyme, soulignant que l'eau oxygénée joue malgré tout un rôle important dans la formation de MetO, mais elle ne serait pas le seul réactif menant à cette oxydation. La formation de MetO en présence de catalase a depuis été mise en évidence à nouveau pour l'irradiation d'autres dipeptides (Ignasiak *et al.*, 2013). D'après les résultats de (M. J. Davies, 2005, 2016), la constante de vitesse de la réaction de l'eau oxygénée avec la méthionine conduisant à la formation de MetO vaut  $k_{\text{Met}}^{\text{H}_2\text{O}_2} = 6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Cette réaction est ainsi très lente par rapport à la réaction entre  $\text{HO}\cdot$  et Met, dont la constante de vitesse vaut  $8.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Le radical superoxyde peut également réagir avec la méthionine pour former du sulfoxyde, générant également un radical hydroxyle dans la réaction (Schöneich *et al.*, 1993). En milieu désoxygéné, l'électron hydraté entraîne un clivage entre la chaîne latérale et le groupement thioéther (Garrison, 1987).

Dans le cas d'oxydations poussées, le sulfoxyde de méthionine peut être suroxydé et former une sulfone (Figure 1-26). Sous irradiation, ce composé n'est cependant attendu qu'en très faibles quantités, car il s'agit d'un produit de suroxydation du sulfoxyde, d'autant que ce dernier serait moins sensible à l'oxydation que la méthionine (Xu & Chance, 2005).

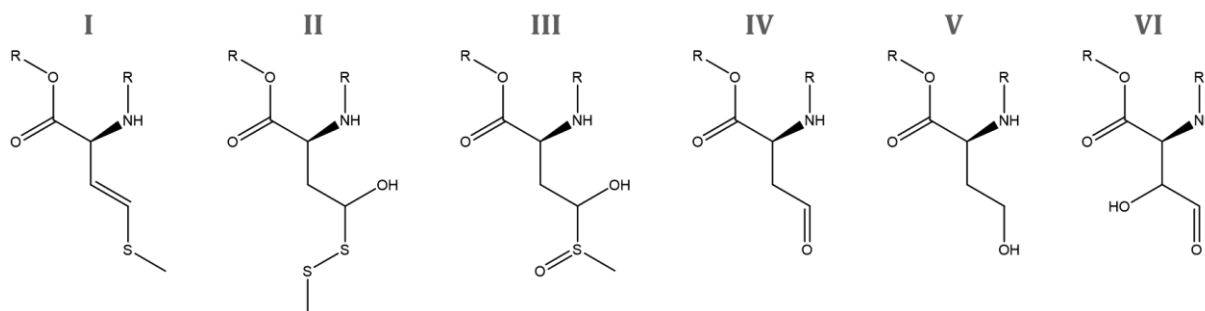
La réaction de  $\text{HO}\cdot$  avec la méthionine est singulière, car elle mène à la formation d'intermédiaires réactionnels présentant une liaison à 3 électrons, où deux électrons sont dans une orbitale  $\sigma$  liante et le troisième dans une orbitale  $\sigma^*$  anti-liante (Bobrowski *et al.*, 2008). Cet intermédiaire peut se former entre deux atomes de soufre, formant donc une liaison intermoléculaire, ou avec les fonctions amines ou acide carboxylique de la méthionine pour former une liaison intramoléculaire. L'intermédiaire le plus stable est celui formant une liaison avec la fonction amine. D'après (Barata-Vallejo *et al.*, 2010), cette action mènera à la formation de méthional (3-méthylthiopropionaldéhyde) comme produit final majoritaire. La formation de ce produit n'a cependant jamais été évoquée lorsque la méthionine est impliquée dans une liaison peptidique.

En revanche, des produits de radiolyse supplémentaires ont été identifiés dans le cas de l'irradiation de la méthionine comprise dans des peptides. En plus de la formation de MetO en présence de catalase, l'étude de (Ignasiak *et al.*, 2013) a montré pour la première fois la formation d'un produit de radiolyse ayant subi une perte de dihydrogène, formant alors un composé possédant une double liaison C=C sur la chaîne latérale de Met (Figure 1-27).

Ce produit se formerait indépendamment de la position de Met dans le dipeptide, mais dont la formation serait tout de même plus importante lorsque Met est en position C-terminale (Ignasiak et al., 2013). Une autre étude portant cette fois-ci sur un tripeptide contenant une méthionine, Gly-Met-Gly, a mis en évidence la formation d'un composé provenant d'une dimérisation intermédiaire et présentant ainsi une liaison S-S (composé II, *Figure 1-27*) (Barata-Vallejo et al., 2016).

D'autres produits ont été observés dans cette étude suite à l'action de HO<sup>•</sup>, et sont représentés dans la *Figure 1-27*.

Parmi tous ces composés, aucun n'a jamais été reporté dans le cas d'études de la méthionine libre, qui fut étudiée durant ces travaux de thèse.



*Figure 1-27 Structure des composés identifiés dans des peptides par (Ignasiak et al., 2013) (composé I) et (Barata-Vallejo et al., 2016) (composés II à VI).*

La réactivité du résidu Met dépendra également de la taille du peptide, la gêne stérique diminuant la réactivité du résidu pour des réactions intermoléculaires. Cela a été montré par une réduction considérable de la quantité de MetO formé lorsque le résidu est inclus dans un tripeptide ou une protéine (Sjöberg *et al.*, 2018). La concentration en méthionine joue également un rôle important, les proportions de produits de radiolyse observées par rapport aux espèces responsables de leur formation changeant avec celle-ci (Schöneich, 2012). Le radical organique initialement formé sur le résidu méthionine peut aussi être transféré via l'intermédiaire à 3 électrons sur le squelette de la protéine, induisant des dégâts sur la chaîne principale (Archirel *et al.*, 2019). La méthionine est ainsi impliquée dans des mécanismes de transferts d'électrons inter et intramoléculaires. Ces transferts peuvent se faire à longue distance, c'est-à-dire via plusieurs résidus, où la méthionine agit comme donneur ou accepteur d'électrons. Elle pourra être réceptrice de dommages, intervenir comme intermédiaire pour poursuivre ce transfert ou encore à l'inverse transférer ces dommages vers d'autres résidus (Bergès *et al.*, 2012). Ce type de transfert a été observé au sein de la Met-enképhaline (de séquence Tyr-Gly-Gly-Phe-Met), où les additions de HO<sup>•</sup> sur la méthionine sont au final réparées par formation de radicaux tyrosiles puis de dimères par formation de di-tyrosines (Mozziconacci et al., 2012).

Avec la tyrosine, le tryptophane est un résidu récurrent de ces échanges avec la méthionine (Bobrowski *et al.*, 1990). Une étude sur des dipeptides inverses Trp-Met et Met-Trp réalisée par (Scuderi et al., 2015) montre des résultats très différents pour les deux dipeptides. Pour l'irradiation de solutions de Trp-Met, un seul produit de radiolyse est observé, correspondant à la formation de MetO, ce qui montre que le tryptophane ne subit aucun dégât. En revanche, lors de la radiolyse de Met-Trp, trois produits sont observés. Ils correspondent au MetO, mais aussi à des hydroxylations sur Trp et à la formation de N-Formyl-Kynurénine (NFK) (voir ci-dessous).

Pour les dipeptides Met-Val et Val-Met, étudiés par (Archirel et al., 2019), ici encore le nombre de produits formés n'est pas le même : un seul produit a été observé pour Met-Val et trois pour Val-Met. Le résidu voisin de la méthionine joue alors également un rôle prépondérant sur le comportement de Met dans le peptide. La position de cette dernière dans la séquence peptidique est également cruciale.

Il apparaît de ces diverses études que les mécanismes de radiolyse de Met diffèrent selon que la méthionine est libre ou que ses groupements amino et/ou carboxylate sont impliqués dans une liaison peptidique.

Enfin, il est important de souligner que toutes les études précitées ont été menées sous irradiations par des rayonnements de faible TEL et aucune donnée n'est disponible dans la littérature sous irradiation par des ions.

### *Le tryptophane*

Le tryptophane (Trp) est un acide aminé très étudié en biologie. Il s'agit d'un précurseur de la sérotonine (Marsh, 2007) ainsi que de la mélatonine (Bellmaine *et al.*, 2020) et il est présent dans beaucoup d'enzymes où il possède un rôle important. Par exemple, la substitution d'un Trp dans le site actif du lysozyme joue un rôle crucial dans l'appariement du substrat, et a un impact important sur l'activité de l'enzyme (Muraki *et al.*, 1987).

Le cycle indole de cet acide aminé est très sensible aux oxydations par HO•, le plus parmi les composés aromatiques, comme en atteste sa constante de vitesse avec ce radical (Tableau 1-3) et présente de nombreuses positions différentes d'attaques et donc de nombreux produits potentiels. Le radical hydroxyle, sur le cycle indole de Trp, peut soit s'additionner sur un atome de C soit arracher un hydrogène sur en position 2 du cycle indole, sur l'azote (Carroll *et al.*, 2018).

Des études de radiolyse pulsée sous faisceaux d'électrons de 3 MeV sous N<sub>2</sub>O, permettant de convertir  $e_{aq}^-$  en HO•, ont montré que 60% des intermédiaires réactionnels issus de l'action de HO• présentaient un radical sur le cycle pyrrole (py-OH-Trp•) tandis que seulement 40% seraient situées sur le cycle benzénique (b-OH-Trp•). (Solar *et al.*, 1984b). Ces intermédiaires pourront mener à la formation de différents produits stables dans le cas du tryptophane libre (*Figure 1-28*).

L'action de HO• sur le cycle benzénique pourra mener à la formation d'hydroxy-tryptophanes en position 4, 5, 6 ou 7 par réaction avec l'oxygène ou par dismutation. L'intermédiaire formé sur le cycle pyrrole pourra quant à lui mener à des produits plus singuliers. Le premier résulte d'une hydroxylation en position 2 (2-OH-Trp), existant en équilibre céto-énolique avec l'oxyindolalanine (OIA). Les mentions du 2-OH-Trp dans la suite de ce manuscrit feront donc référence à ces deux composés. Le produit majoritaire issu de cet intermédiaire est la N-formyle-kynurénine (NFK), provenant de la réaction avec un Trp libre et générant une ouverture de cycle. La NFK peut s'hydrolyser pour former de la kynurénine.

Enfin, ce radical intermédiaire peut entraîner une cyclisation supplémentaire avec la fonction amine de l'acide aminé pour former du 3a-hydroxy-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indole-2-carboxylic acid (PIC) existant en configurations cis et trans. Ce composé n'est cependant évoqué que dans peu d'études (Bellmaine *et al.*, 2020; Carroll *et al.*, 2018).

Des multi-hydroxylations sont également possibles, mais très difficiles à identifier clairement en raison de la multitude de combinaisons de sites d'hydroxylation possibles. Des dimères évoqués dans le cas d'irradiations sous atmosphère privée d'oxygène suivant des mécanismes similaires à ceux observés pour la phénylalanine (Armstrong & Swallow, 1969).

Des expériences réalisées sous irradiation  $\gamma$  (source  $^{60}\text{Co}$ ) montrent que la NFK est très largement majoritaire, représentant à elle seule près de 60% du Trp dégradé (Jovanovid & Kidri, 1983). Les autres produits de radiolyse du tryptophane n'ont pas été quantifiés dans cette étude, mais l'eau oxygénée l'a été, aboutissant à des rendements inférieurs à ce qui était attendu.

Les auteurs en ont conclu que l'eau oxygénée ou le radical superoxyde pouvaient réagir avec les intermédiaires réactionnels. Cette même étude a montré que la proportion de NFK formée augmentait avec la concentration en Trp.

Une autre étude réalisée sur la quantification des produits de radiolyse du tryptophane, à l'échelle de l'acide aminé et du tripeptide, donne les mêmes proportions, avec un total en produits présentant une dégradation au niveau du cycle pyrrolique ici quantifié à plus de 80% des produits de dégradations identifiés<sup>6</sup> (van Wickern *et al.*, 1997).

Ce résultat n'est pas tout à fait en accord avec les proportions d'intermédiaires réactionnels observées par (Solar *et al.*, 1984b) et suggère que la localisation de l'intermédiaire radicalaire ne détermine pas forcément le produit final obtenu.

Une fois impliqué dans une liaison peptidique, la réactivité du tryptophane semble rester similaire, à quelques exceptions près. Parmi les différences se trouve le PIC, qui se forme suite à une cyclisation avec la fonction amine libre du tryptophane, qui n'est plus possible une fois celui-ci impliqué dans une liaison peptidique. Ce composé n'est jamais évoqué dans les études du tryptophane dans un peptide ou une protéine (Carroll *et al.*, 2018).

La dimérisation du tryptophane au sein des protéines a été identifiée, et ce y compris en condition oxygénée (Hawkins & Davies, 2019). Ce processus serait d'ailleurs à l'origine d'une réticulation intra ou intermoléculaire des protéines (Carroll *et al.*, 2017).

---

<sup>6</sup> Les produits multi-hydroxylés ne sont pas mentionnés dans cette étude.

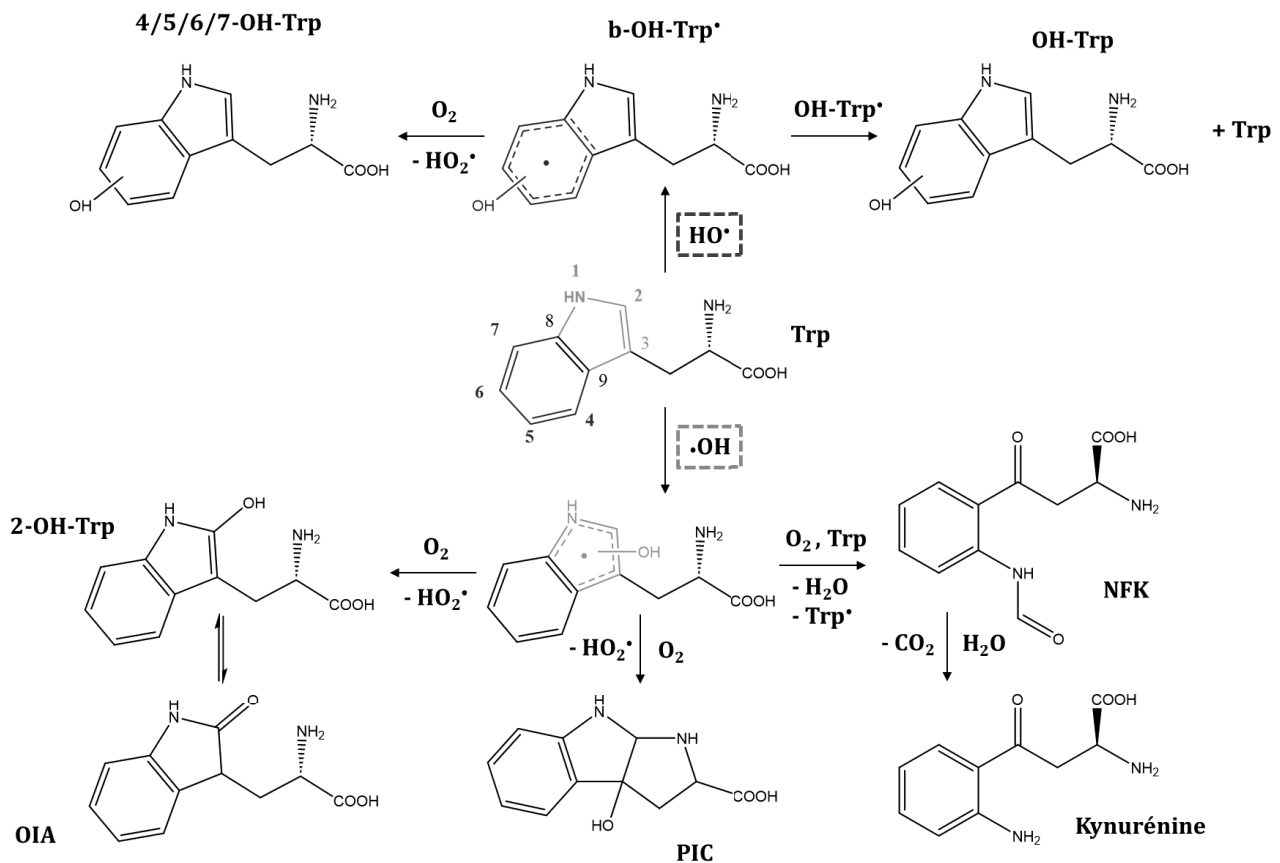


Figure 1-28 Formation des produits de radiolyse de Trp par action de  $\text{HO}\cdot$  d'après (Bellmaine et al., 2020; Carroll et al., 2018) et (Garrison, 1987)

Tous les autres produits décrits plus haut ont été observés, et la NFK reste de très loin le produit majoritaire de la radiolyse du tryptophane, représentant jusqu'à 95% de ses produits de radiolyse quantifiés dans le lysozyme (van Wickern et al., 1997).

### 3/ Effets sur les structures secondaires et au-delà

#### Effets indirects

Les altérations issues des effets indirects, à savoir les oxydations par hydroxylations, ou les carbonylations sont déstabilisantes pour la structure secondaire car la polarité des résidus est modifiée et donc leurs interactions également. Les ruptures de liaisons sur les chaînes latérales résultant de ces oxydations le sont tout autant, en particulier dans le cas des ruptures de ponts disulfures qui sont parmi les liaisons les plus stabilisantes des structures tertiaires. De même, les ruptures de la chaîne principale entraîneront des modifications de toutes les structures, de la primaire à la quaternaire. Un autre phénomène observé issu des effets indirects est la dimérisation de certains résidus, à la fois au sein même d'une protéine ou entre plusieurs entités, entraînant ainsi la formation d'agrégats (M. J. Davies, 2012). Ces modifications peuvent également être à l'origine d'une dénaturation des protéines et également agir sur ses propriétés telles que sa solubilité ou son hydrophobicité (K. J. Davies & Delsignore, 1987).

Les dommages provoqués sur les protéines sont généralement irréparables une fois qu'ils ont touché la structure. Comme évoqué précédemment, la structure d'une protéine est responsable de son activité biologique, que ce soit en tant qu'enzyme ou pour former des complexes avec d'autres biomolécules. L'altération de celles-ci par action des rayonnements peut donc être responsable d'une diminution importante de l'activité des protéines en milieu biologique.

Les effets indirects ne sont cependant pas les seuls responsables de modifications structurelles des protéines.

### *Effets directs*

La principale conséquence observée des suites des effets directs des RI est la rupture de liaisons, sans localisation particulière ou presque (Kempner, 2001).

En effet, bien qu'on puisse considérer que tous les résidus auront une sensibilité similaire aux effets directs, les cystéines se sont montrées être des cibles particulièrement touchées par ceux-ci entraînant donc de nombreuses ruptures de ponts disulfure (Kempner, 2011). Des réticulations sont observées, mais de façon minoritaire. Ces effets directs sont directement impactés par la température et semblent diminuer avec celle-ci (Kempner *et al.*, 1986).

Les ruptures de liaisons se situent majoritairement sur les chaînes latérales, causant donc des modifications structurelles en perturbant les liaisons faibles, mais sont tout de même importantes sur la chaîne principale sur laquelle elles se situeront sur le C $\alpha$ , comme pour les effets indirects.

Les effets directs ont été majoritairement étudiés sur des protéines lyophilisées ou à très basse température, les effets couplés directs et indirects et leurs interactions sont donc peu connus. Cependant, il est à noter que lors d'une irradiation à très basse température suivie d'une remontée de celle-ci et d'une hydratation les altérations observées diminuent en quantité et ne sont plus les mêmes (Kempner, 1993). L'étude des dégâts aux protéines dans des états intermédiaires de très haute concentration mais natives et en milieu hydraté est une des thématiques de l'équipe. Elle n'a cependant pas été abordée dans le cadre de cette thèse, dont les travaux sur les biomolécules ont porté sur des acides aminés et un petit peptide.





---

## **Chapitre 2 - Plateformes et dispositifs d'irradiations et méthodes analytiques**

---

## Abstract

As experiments conducted during these three years of thesis were performed with different chemical systems on various facilities, this chapter aims to explain the methods we used and the irradiation setups developed to perform such experiments.

Innovative setups were developed, such as an irradiation cell dedicated to medium and low energy ion irradiations or a multi-sample holder for large beams of high-energy ions. An automated and remotely controlled system was also developed that allowed optimizing experiments time and reducing manipulation of samples activated after irradiation.

Different kinds of dosimetry were performed, adapted to each irradiation condition. Dose measurement is crucial for determination of radiolytic yields. Chemical dosimeters, like Fricke liquid dosimeter, and alanine solid dosimeter, were used. Physical dosimeters were also used on several facilities such as Faraday cups to measure beam currents then converted to dose by SRIM calculations, or ionization chamber which provided absolute doses.

Experiments were performed on various installations with different ionizing radiations. Low-LET irradiations were performed at ICANS and Aerial-CRT with 6 MeV X-rays and 1 or 10 MeV accelerated electrons, respectively. Medium LET irradiations were conducted on a 4 MV Van De Graaff accelerator at Icube (2 MeV protons) and on the IPHC CYRCé cyclotron (24 MeV protons). Finally, heavy-ion irradiations were performed at HIMAC in Chiba, with high-energy carbon ions (400 MeV/nu), Helium ions (230 MeV/nu) and medium energy of the same ions (6 MeV/nu).

Irradiations were performed on aqueous solutions of molecular probes in order to measure two important oxidative species of water radiolysis. measurements were done with three different scavenging probes, C3CA, TA and KBr/formate probe system. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yields were determined using methanol or KBr as HO• scavengers to study the temporal impact of the radical on the production of hydrogen peroxide.

Finally, the radiolysis in aqueous solutions of small biomolecules was also studied. We irradiated solutions containing amino-acids: phenylalanine, tryptophan and methionine, and a small peptide containing a phenylalanine unit, aspartame. Analysis methods used for all the irradiated samples will also be presented in this chapter.

Les expériences menées durant ces trois années de thèse ont permis l'obtention d'un nombre conséquent des données sur la radiolyse de l'eau, plus précisément sur la formation du radical hydroxyle et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que sur la radiolyse de plusieurs acides aminés. Ces expériences ont été menées sur différents accélérateurs, donnant accès à des rayonnements ionisants de natures variées, nous permettant d'étudier l'effet de différentes grandeurs physiques sur les résultats de radiolyses, comme le TEL ou le débit de dose.

Le présent chapitre détaille la réalisation de ces expériences, allant des systèmes d'irradiations utilisés jusqu'aux méthodes analytiques permettant d'extraire de nos solutions irradiées les informations désirées, en passant par la préparation des échantillons et la détermination de la dose déposée, mesure nécessaire pour obtenir des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs.

## **A/ Les dispositifs d'irradiations sous faisceaux d'ions**

Durant ce travail de thèse, les expériences d'irradiations ont été réalisées dans un total de cinq centres différents et sur huit installations distinctes. La nature des rayonnements, leurs caractéristiques et les spécificités des installations, comme une irradiation verticale ou horizontale, varient d'un centre à l'autre, menant notamment à des profondeurs de pénétration radicalement différentes. Ces spécificités ont nécessité le développement de dispositifs expérimentaux inédits et dédiés à ces irradiations. Ces systèmes seront expliqués en détail ici.

### **1/ Dispositifs d'irradiations en milieu aéré**

#### *La cellule en PEEK*

Le système d'irradiation original le plus utilisé dans ce travail a été une cellule en PEEK (PolyEtherEtherKetone), matériau choisi pour son inertie chimique et vis-à-vis de la radiolyse. Il s'agit d'une cellule à circulation dotée d'une chambre d'irradiation d'une épaisseur de 10 mm, ayant un diamètre interne de 15 mm. Ainsi, les rayonnements ionisants ayant un pouvoir de pénétration inférieur à 1 cm (dans notre cas, des ions de moyenne et faible énergie) s'arrêtent totalement en solution. Cette cellule est d'ailleurs particulièrement pensée pour les irradiations avec des ions. En effet, la cellule est scellée par deux flasques : La première en PEEK ayant également un trou de 15 mm de diamètre permet de fermer la cellule avec une fenêtre de mylar aluminisé d'épaisseur 12  $\mu\text{m}$ . Cette fenêtre sera placée face au faisceau, la fenêtre de mylar étant suffisamment fine pour limiter la perte d'énergie des ions avant d'arriver en solution. La seconde est une flasque en plexiglas transparente, afin de visualiser la présence d'éventuels problèmes, le problème le plus courant étant la présence de bulles d'air trop nombreuses dans la cellule (*Figure 2-1*).

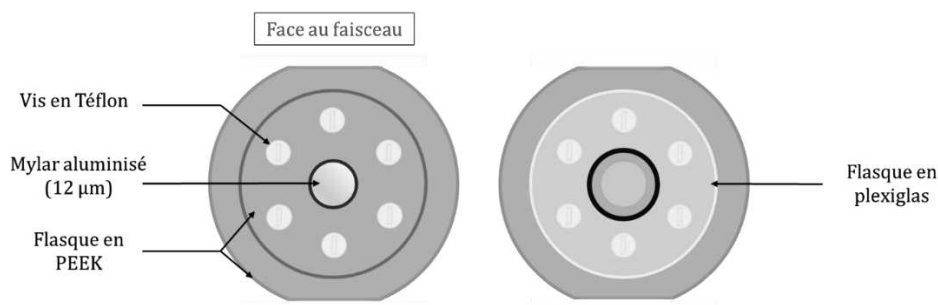


Figure 2-1 Faces avant et arrière de la cellule d'irradiations

Cette cellule permet une circulation de la solution entre la zone irradiée et un réservoir par des tubulures en PEEK (Figure 2-2). La circulation est ici gérée à l'aide d'une pompe péristaltique *Watson Marlow 120S* avec un débit légèrement modifié selon l'installation, entre 20 et 30 mL/min, et le plus souvent à 25 mL/min. La pompe péristaltique est utilisée en mode aspiration, la circulation en sens inverse par pression est utilisée pour vider complètement le circuit.

L'intérêt de ce montage est double : il permet de renouveler la solution dans la cellule et donc le volume irradié tout au long des irradiations et de maintenir une bonne oxygénation de la solution tout au long de l'expérience.

Le volume mort de cette configuration (cellule et tubes en PEEK) était en conditions standards de 8.2 mL, déterminé par trois pesées concordantes. Quant au volume dans le réservoir, il était usuellement de 3 mL, soit un volume irradié total de 11.2 mL au début des expériences.

Ainsi, avec les débits utilisés, cela correspond à un renouvellement total des solutions en circulation en un peu moins de 30 secondes dans les conditions les plus standards.

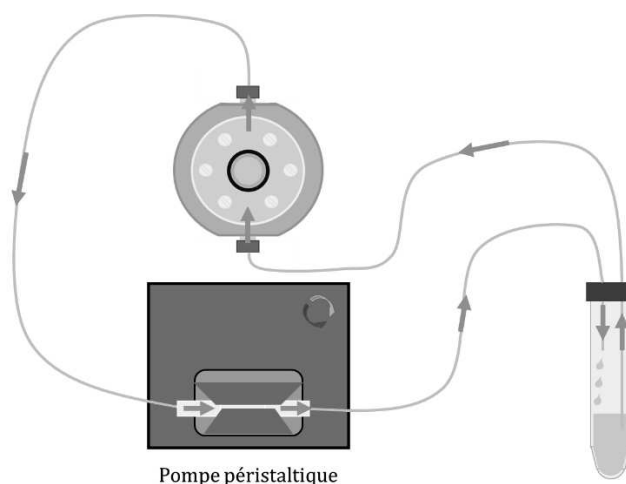


Figure 2-2 Schéma de la configuration en circulation de la cellule d'irradiation

Le volume irradié important avec ce montage permet de réaliser des prélèvements à plusieurs doses successives durant l'irradiation d'une même solution. Ces prélèvements étaient réalisés manuellement, en stoppant l'irradiation et la circulation, ou de manière automatisée.

Sur certaines installations, comme au HIMAC ou encore à CYRCé, les temps d'accès à la salle d'irradiation sont longs et les risques liés à l'activation des solutions (notamment après irradiation par des ions de hautes énergies) rendent ces prélèvements intermédiaires difficiles. Ainsi, pour des questions de sécurité et également d'optimisation du temps, un système de prélèvements automatisés et pilotable à distance depuis les salles de contrôle des accélérateurs a été développé par les ingénieurs en électronique et instrumentation du groupe de Radiochimie.

Ce dispositif, appelé BRETSEL (*Bras de Récupération d'Echantillons Télécommandé à Supervision Electronique*) (Figure 2-3) a fait l'objet d'un processus d'amélioration continue pour le rendre de plus en plus fiable et polyvalent sur les conditions de prélèvements, volumes ou nombres de prélèvements.

La cellule d'irradiation a aussi été utilisée ponctuellement dans une configuration statique, sans circulation, pour les irradiations en milieu aéré, mais courtes, à savoir d'une durée inférieure au temps de renouvellement complet de la solution avec le montage à circulation. Cette configuration permet d'irradier un volume de 2.3 mL de solution, volume contrôlé avant et après irradiation par pesée de la cellule. Ici, il n'est pas possible de réaliser de doses intermédiaires, mais les temps d'irradiation sont considérablement diminués, du fait du faible volume irradié.

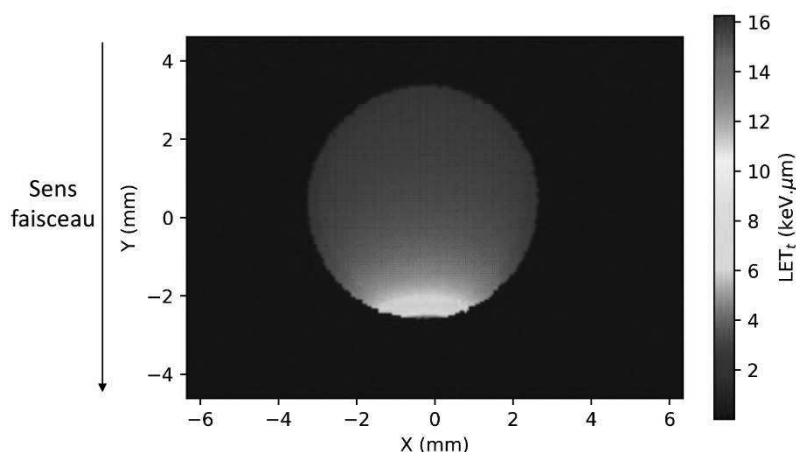


Figure 2-3 Photo du BRETSEL en conditions expérimentales

### Les tubes eppendorfs

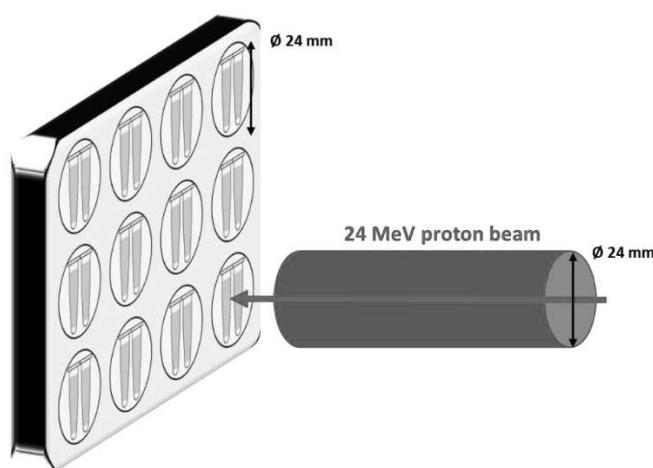
Du fait de la profondeur relativement importante de la cellule, les ions de basse énergie ou de TEL élevé s'arrêtent complètement, ce qui ne permet qu'une mesure de rendements intégraux. Pour la mesure de rendements différentiels, c'est-à-dire avec un TEL qui varie peu, l'utilisation de cellules ultrafines a été envisagée, mais les contraintes de volume nécessaire pour réaliser nos analyses post-irradiations étaient trop importantes pour les retenir. Ainsi, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de petits tubes fins de type « eppendorf », de volume maximal 250  $\mu\text{L}$  et de diamètre interne de 5mm.

Ces derniers ont un volume suffisant pour réaliser nos analyses post-irradiations, et leur épaisseur suffisamment faible nous permet d'obtenir directement expérimentalement des rendements différentiels avec les protons de 24 MeV de La plateforme CYRCé. Dans ce cas, la variation de TEL est importante d'un point de vue relatif, mais reste suffisamment faible d'un point de vue absolu pour ne pas avoir un impact important sur les rendements radiolytiques, avec un TEL moyen de 3 eV/nm (*Figure 2-4*). Ainsi, même si les rendements mesurés ne sont pas rigoureusement des rendements différentiels, ils en sont très proches dans ces conditions.



*Figure 2-4 Simulation GATE (réalisée par Gaël Simonin) du dépôt de dose dans les ependorfs de 200  $\mu$ L par des protons de 24 MeV vu de dessus*

Ces ependorfs ont ici été irradiés sur une plaque 12 puits de la plateforme CYRCé, et de par leur petite taille il était possible de les placer deux par deux dans les puits de la plaque (dimension d'un puits = 24mm de diamètre) (*Figure 2-5*).

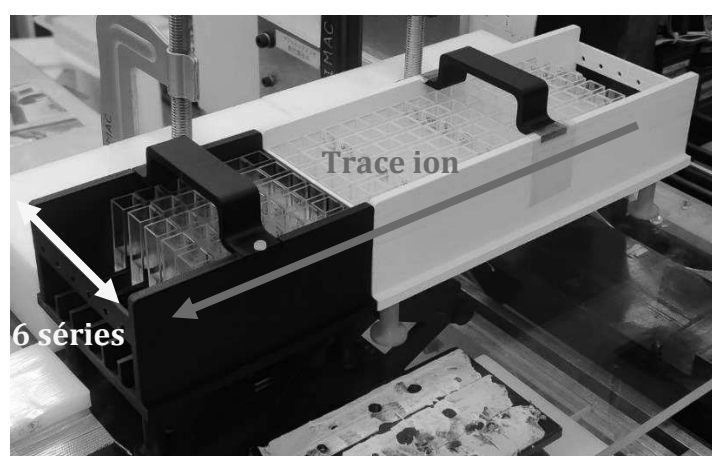


*Figure 2-5 Schéma d'une irradiation du set-up ependorfs sur plaque 12 puits par un faisceau de protons de 24 MeV à CYRCé*

*Le PEIGNE*

Pour les irradiations réalisées avec des ions de hautes énergies au HIMAC, nous avons développé des moyens d'irradier des échantillons le long de la trace des ions, de plusieurs dizaines de centimètres dans l'eau. De plus, le faisceau large délivré dans la BioRoom du HIMAC mesure 10 cm de diamètre, permettant ainsi d'irradier plusieurs séries en simultanément. La conception d'un système permettant d'irradier un nombre très important d'échantillons, et permettant un placement répétable de ces derniers fut donc nécessaire. Le contenant des solutions à irradier dû également être adapté en conséquence pour simplifier le plus possible les opérations. Le contenant finalement choisi fut des cuves optiques de PMMA, pour analyses UV-Visible. Les dimensions de ces cuves (1cm de trajet optique, 12mm d'épaisseur au total pour 45mm de hauteur) sont idéales et leur section carrée (donc surface irradiée plane) simplifie les calculs de dose. Elles sont également faciles à manipuler et peuvent être fermées de façon étanche avec les bouchons adaptés pour des irradiations sous atmosphère contrôlée.

Un portoir adapté à ce cahier des charges fut alors modélisé et réalisé par impression 3D. Ce dernier permet l'irradiation d'un maximum de 6 séries de cuves, sur des longueurs variables et adaptables en alignant plusieurs de ces portoirs, appelés PEIGNE (Portoir Essentiel pour l'Irradiation d'un Grand Nombre d'Echantillons) (*Figure 2-6*).



*Figure 2-6 portoir PEIGNE rempli de 6 séries de cuves*

Ce portoir permet ainsi d'étudier l'évolution des rendements des espèces considérées le long de la courbe de Bragg d'ions de haute énergie avec une résolution de 1 cm. Il permet également, par l'ajout de cuves au-delà du pic de Bragg, de mesurer les effets des fragments formés par les ions.

Les cuves contenaient un volume de 1,5 mL de solution, soit 15 mm de hauteur de liquide, afin de garantir une irradiation homogène de la totalité du volume. Les solutions nécessitant des analyses en UV-Visible ont été analysées directement dans ces cuves.

## 2/ Irradiations sous atmosphère contrôlée

Pour les irradiations sous atmosphère contrôlée, la cellule d'irradiation en PEEK décrite au paragraphe précédent a été utilisée dans une configuration statique et fermée afin de permettre un dégazage au niveau de la zone irradiée. Les solutions ont été dégazées directement dans la cellule d'irradiation, grâce à un bouchon percé équipé d'un septum permettant une bonne étanchéité, avant les irradiations pendant une durée de 15 minutes. De plus, lorsque cela était possible, un flux d'argon a été maintenu lors de l'irradiation afin de garantir une atmosphère parfaitement contrôlée (*Figure 2-7*), mais sans bullage. Ce fut le cas pour les irradiations sur la plateforme ACACIA d'ICube ou encore dans la « *medium energy room* » du HIMAC (ions C et He d'énergie 6 MeV/nu).

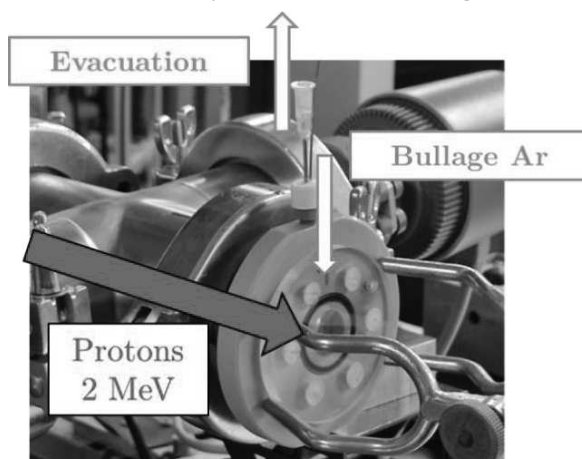


Figure 2-7 Mise en place du flux d'argon maintenu pendant l'irradiation d'une solution nécessitant une atmosphère contrôlée sur la plateforme ACACIA

Le volume faible de cette configuration permet de limiter le temps d'irradiation des solutions placées sous atmosphère inerte, ce qui réduit le risque d'une entrée d'oxygène dans la cellule et donc dans la solution.

Pour les autres dispositifs, les échantillons ont été placés sous atmosphère inerte à l'aide d'une tente étanche à l'air (*Figure 2-8*).

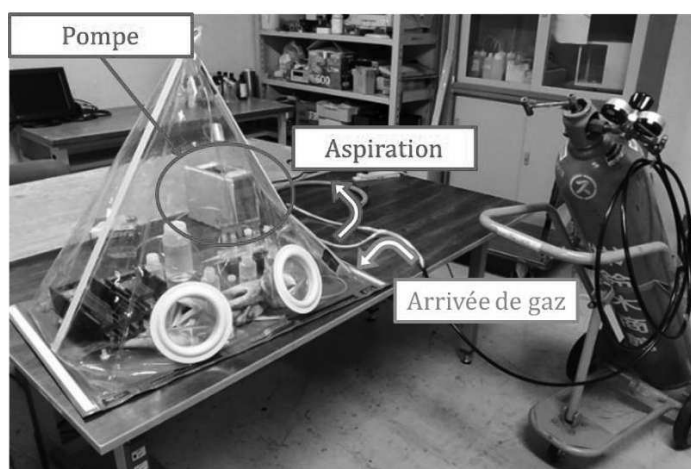


Figure 2-8 Préparation des échantillons sous tente, ici sous atmosphère d'Argon.



Cette dernière était vidée grâce à une pompe à membrane et remplie d'argon en deux cycles à minima. Les solutions contenues dans des flacons en PEHD étaient dégazées dans cette enceinte sous l'atmosphère souhaitée, pendant une durée de 15 minutes, avant d'être transférées dans les contenants d'irradiation (cuves PMMA ou tubes « corning »). Ces derniers étaient fermés et étanchéifiés sous la tente, avant son ouverture.

## **B/ Plateformes d'irradiations**

### **1/ Rayonnements de faible TEL : photons et électrons**

#### *ICANS – Rayons X de 6MeV*

L'ICANS (Institut de Cancérologie de Strasbourg-Europe) est un pôle de santé spécialisé en oncologie, mais également de recherche et d'enseignement regroupant l'expertise de 900 professionnels de santé sur un seul site. Ce regroupement de compétences permet à cet institut de disposer d'un large panel de thérapies cancer pour accompagner leurs patients, allant de la chirurgie à l'oncologie médicale<sup>7</sup>. Au total, pas moins de 10 types de cancers sont traités dans les locaux de l'ICANS, comme les cancers gynécologiques ou les tumeurs cérébrales.

Cette spécialisation dans le traitement du cancer par différents types de thérapie a inévitablement conduit le développement d'une expertise autour de la radiothérapie, notamment pour les traitements des cancers chez les enfants ou pour le cancer du sein. L'ICANS est aujourd'hui doté d'un total de 6 machines de traitements par rayons X de radiothérapie externe.

Cette présence marquée dans le domaine de l'enseignement et de la recherche a permis la mise en place de collaborations avec des instituts de recherche comme l'IPHC. Une collaboration a débuté avec l'équipe de Radiochimie sur le développement de gels dosimétriques fins pour la détermination de la dose à la peau lors d'un traitement par rayons X des cancers du sein. Cette collaboration fut l'occasion d'en établir une nouvelle, permettant ainsi d'étendre les expériences réalisées là-bas à la radiolyse de l'eau et la radiolyse de biomolécules protéiques. Cette coopération nous a ainsi permis d'avoir accès à des irradiations par rayons X, soit un rayonnement ionisant de faible TEL très documenté dans la littérature, directement sur des machines de traitement et donc à débit de dose conventionnel utilisé en thérapie, à savoir 0.1 Gy/s.

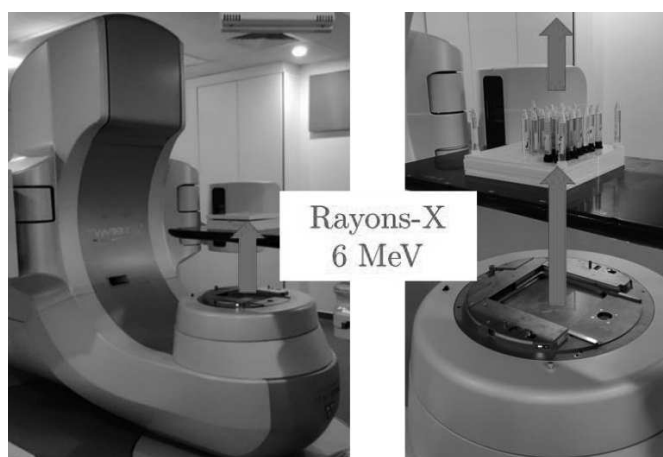
Cela nous a ainsi donné la possibilité de tester et de valider nos méthodes d'expériences et de mesures dans ces conditions de références avant de les appliquer à nos études : les effets de TEL et les effets de débit de dose.

---

<sup>7</sup> Prise en charge médicamenteuse des cancers (chimiothérapie, immunothérapie ...)

Du point de vue expérimental, l'installation sur laquelle les expériences ont été réalisées à l'ICANS est un appareil utilisé pour le traitement en radiothérapie par rayons X. Il s'agit d'un irradiateur X TRUEbeam<sub>stx</sub> du fournisseur VARIAN, délivrant un flux de rayons X d'une énergie de 6 MeV à un débit de dose conventionnel de 0.1 Gy/s.

Cet appareil dispose d'un champ d'irradiation très large, allant jusqu'à 40 x 40 cm, des irradiations simultanées de plusieurs échantillons ont pu être réalisées (*Figure 2-9*). Celles-ci ont été réalisées avec le bras d'irradiation positionné à 180°, correspondant à des irradiations du bas vers le haut. La grande profondeur de pénétration des rayons X de 6 MeV permet une grande liberté quant au choix du contenant des solutions utilisé. Ainsi, les solutions ont été irradiées directement dans des tubes « Cornings » en polyéthylène. Associés à du parafilm, ceux-ci sont suffisamment étanches pour des irradiations sous atmosphère non aérée, et contiennent un espace de tête conséquent permettant un bon échange avec l'air contenu au contraire en conditions aérées. Les volumes irradiés allaient de 5 mL pour les solutions aérées à 15 mL pour les solutions sous atmosphère contrôlée (O<sub>2</sub> ou Ar).



*Figure 2-9* dispositif expérimental lors des irradiations à l'ICANS

La dosimétrie était ici réalisée par deux mesures. La première par les opérateurs de l'irradiateur, en appliquant une dose exprimée en unités moniteurs (u.m.), calibrée pour connaître précisément la correspondance en Gy. Dans nos conditions, 4813 um équivalent à 50 Gy pour une épaisseur d'échantillons de quelques mm. La seconde était réalisée par nos soins via la dosimétrie de Fricke (cf *Dosimètre de Fricke*), permettant une détermination plus adaptée, car réalisée dans des conditions d'échantillons identiques (mêmes volumes et placements). Elle permet de tenir compte du fait que la dose peut être légèrement différente selon le volume irradié, menant à un gradient de dose déposée linéairement le long de la solution.

### *Aerial-CRT – Electrons de 1 et 10 MeV*

Aerial est un Centre de Ressources Technologique (CRT) fondé en 1985, basé à Illkirch-Graffenstaden et spécialisé dans la R&D, dans l'expertise et la formation dans les domaines de l'irradiation, de la dosimétrie et de la chimie-physique (liste non-exhaustive).

Leur expertise portant sur des domaines adjacents à plusieurs recherches réalisées à l'IPHC a mené à de nombreuses collaborations entre les deux organismes, donnant ainsi accès aux chercheurs aux installations du centre, et a abouti en 2022 à la création d'un laboratoire commun.

Une de leurs applications majeures est la radio-stérilisation pour les industries agro-alimentaires. Ils disposent à ce titre de plusieurs plateformes d'irradiation, par des rayonnements à bas TEL afin de disposer de rayonnements ionisants suffisamment pénétrants, soit des rayons X et des électrons. Lors de nos travaux en collaboration avec Aerial, nous avons pu travailler sur deux de ces installations.

Le premier irradiateur est un accélérateur de type Van De Graaff capable de fonctionner sous des tensions allant de 0.5 à 2.5 MV et délivrant **des faisceaux continus** d'électrons accélérés. Dans notre cas, nous n'avons utilisé cette installation qu'avec des électrons de 1 MeV. Le faisceau est délivré de façon continue par balayage et convoyage des échantillons sur une surface de 80 cm<sup>2</sup> sur un convoyeur de dimensions 40 x 50 cm (*Figure 2-10*).

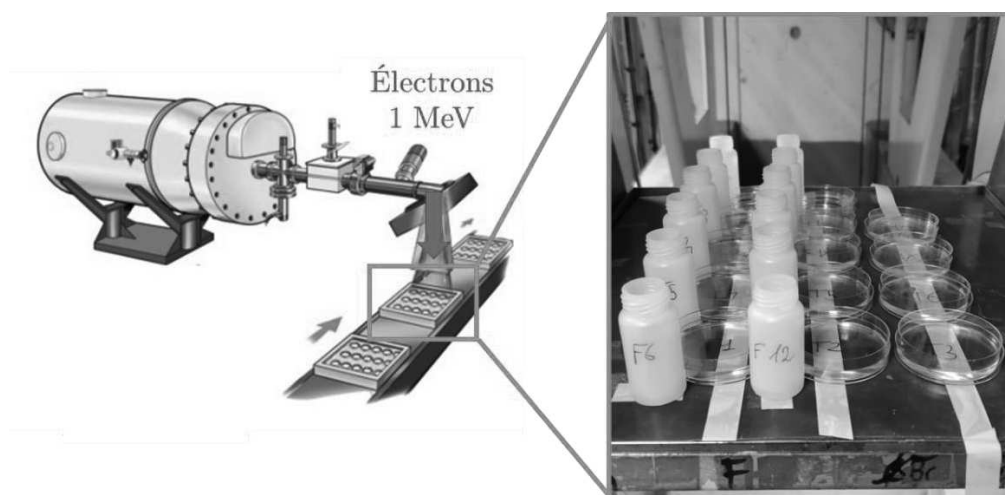


Figure 2-10 Solutions placées sur le convoyeur pour irradiation par des électrons de 1 MeV

La surface totale du convoyeur est irradiée grâce au déplacement de ce dernier sous le faisceau et à un balayage latéral à une fréquence de 20 Hz. Le débit de dose a été ici modifié en changeant l'intensité du faisceau, conjuguée à une modification de la vitesse de déplacement du convoyeur pour maintenir une dose la plus constante possible entre les différents débits de dose. En raison de la fréquence relativement faible du balayage du faisceau, le débit de dose considéré est le débit de dose instantané, ou débit de dose dans le faisceau, ne tenant pas compte du balayage. En effet, le temps entre chaque passage du faisceau à un emplacement donné est de 50ms, soit un temps auquel les processus mis en jeu dans la radiolyse de l'eau sont déjà terminés. Au total, 7 débits de doses ont été explorés avec cet accélérateur.

Tableau 2-1 Tableau récapitulatif des courants utilisés et débits de dose correspondants avec les électrons de 1 MeV

Courant ( $\mu\text{A}$ )	0.04	0.2	0.4	4	20	40	65
Débit de dose instantané (Gy/s)	1.27	6.35	12.7	127	635	1270	2080

Les électrons de 1 MeV ayant une profondeur de pénétration de 4 mm dans l'eau, les contenants utilisés pour les irradiations sont des boîtes de pétri ouvertes (garantissant ainsi une bonne oxygénation des solutions) de diamètre 21 mm remplie d'un volume de 8.85 mL, correspondant donc à la profondeur de pénétration des électrons de 1 MeV. Aucune irradiation sous atmosphère contrôlée n'a été réalisée sur cette installation, du fait de la complexité de maintenir une enceinte fermée tout en permettant une pénétration des électrons de 1 MeV.

La seconde plateforme, Feerix, est organisée autour d'un Rhodotron® modèle TT300 provenant de *IBA industrial*. Cet accélérateur est capable de délivrer des faisceaux de rayons-X de 5 ou 7 MeV horizontaux ainsi qu'un faisceau d'électrons de 10 MeV vertical. Le faisceau que nous avons utilisé pour nos expériences est celui d'électrons de 10 MeV. La plateforme est également équipée d'un système de convoyage de plateaux de 90 x 100 cm, permettant de limiter les entrées dans la zone d'irradiation (*Figure 2-11*).

Les faisceaux délivrés par Feerix sont très intenses, adaptés aux applications industrielles, et donc avec des débits de doses très importants. **Le faisceau est ici nano-pulsé** à une fréquence de 104 MHz et balayé pour irradier toute la largeur du plateau de convoyage à partir d'un *spot* de 9 cm de diamètre, à une fréquence de 100 Hz. Encore une fois, le débit de dose moyen (tenant compte du balayage sur toute la longueur du plateau) n'a pas été utilisé et nous avons considéré le débit de dose instantané dans le *spot* (*Tableau 2-2*). La fréquence de la structure temporelle étant de 104 MHz, elle est assez élevée pour considérer le faisceau comme approximativement continu vis-à-vis des phénomènes que nous étudions. Il est à noter que cette approximation reste questionnable et nécessiterait des expériences sur installations permettant des variations de la structure temporelle des faisceaux. Celle-ci joue en effet certainement un rôle dans les effets de débit de dose, voire dans l'effet FLASH observé. Une telle étude nécessite des caractérisations physiques poussées du faisceau et dépasse le cadre de ces travaux. Seuls trois débits de dose ont été utilisés ici, car le débit de dose minimal accessible sur cette plateforme était déjà très élevé, de plus de 300 Gy/s.

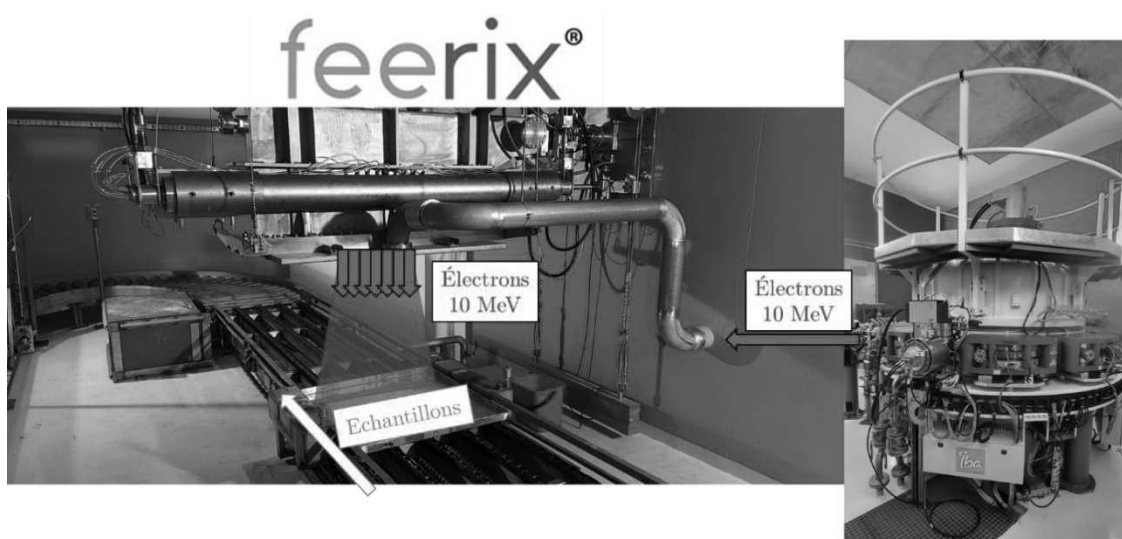


Figure 2-11 Photographies du Rhodotron® et de la sortie air du faisceau d'électrons de 10 MeV.

Les électrons de 10 MeV étant nettement plus pénétrants que ceux de 1 MeV, des irradiations dans des flacons en PEHD de type « corning » ont été possibles, comme pour les rayons X. Cela permet ainsi de réaliser des irradiations sous atmosphère contrôlée grâce à l'étanchéité de ces contenants. Les solutions irradiées sont ainsi totalement traversées par les électrons qui ne déposent pas toute leur énergie en solution.

La dosimétrie fine, sur ces deux installations, a été réalisée avec une dosimétrie de Fricke couplée à une dosimétrie alanine. La comparaison des deux dosimètres a permis de valider leurs utilisations conjuguées.

Tableau 2-2 Tableau récapitulatif des courants utilisés et débits de dose correspondants avec les électrons de 10 MeV

Courant ( $\mu\text{A}$ )	10	100	200
Débit de dose instantané (Gy/s)	325	2400	5000

## 2/ Les rayonnements de TEL moyen - Protons

Les rayonnements de TEL considérés comme moyens ou modérés correspondent ici à des protons d'énergie allant de 2 à 24 MeV, produits sur deux installations différentes.

### La plateforme ACACIA

La plateforme ACACIA fait partie de l'institut Icube, UMR 7357 du CNRS et de l'Université de Strasbourg et plus précisément à la plateforme C<sup>3</sup>-Fab de l'équipe MaCEPV de l'institut. Elle rassemble des équipements et leurs compétences associées pour l'usage de faisceaux d'ions pour les matériaux. Elle dispose à ce titre d'un accélérateur Van De Graaff 4 MV modèle KN4000 de HVEE équipé de plusieurs lignes d'irradiation selon les applications souhaitées. La ligne utilisée dans le cadre de nos expériences est une ligne produisant un **faisceau continu** et dotée d'un système de balayage sur la surface irradiée (ligne d'implantation haute énergie, Figure 2-12).

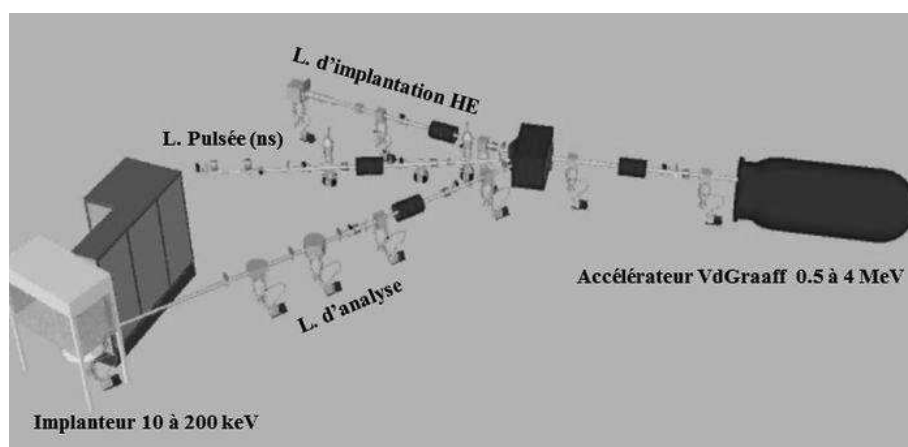


Figure 2-12 Modélisation des différentes lignes d'irradiations de l'accélérateur VdG 4MV de la plateforme ACACIA

De nombreux ions sont disponibles (H, D,  $^3\text{He}$ ,  $^4\text{He}$ , C, N, O, Ne, Ar, Kr, Xe ...) avec des énergies de 500 keV à 4 MeV / nu, énergie donnée avec une résolution de quelques keV. Nous avons utilisé sur cette installation uniquement un faisceau de protons de 2.6 MeV, les autres ions étant trop lourds pour franchir la fenêtre d'extraction à l'air de la ligne.

L'extraction du faisceau à l'air, pour nos irradiations, se fait grâce à une fine feuille de Mylar aluminisé sur une face (épaisseur d'aluminium de quelques nm) d'épaisseur 12  $\mu\text{m}$  utilisée comme fenêtre. Cette faible épaisseur permet ainsi de limiter les pertes d'énergie lors de l'extraction.

Les irradiations étant réalisées ici à l'aide de la cellule d'irradiation en PEEK (*La cellule en PEEK*), l'énergie de 2,6 MeV est déterminée pour aboutir à une énergie précise de 2 MeV en solution (estimation par le logiciel SRIM (Ziegler *et al.*, 2010)). La cellule a par ailleurs été conçue pour être adaptée et fixée directement sur la sortie afin de garantir un placement répétable et donc la meilleure précision possible sur ce placement et sur l'énergie des ions (*Figure 2-13*).

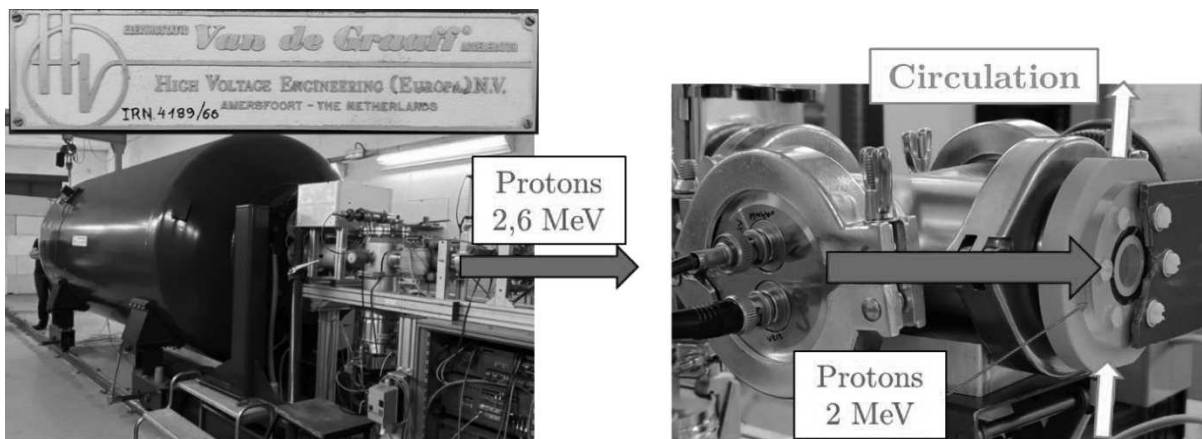


Figure 2-13 Cellule d'irradiation à circulation installée sur la sortie air de l'accélérateur VdG 4 MV

Le faisceau de protons est balayé horizontalement (517 Hz) et verticalement (64 Hz). La modulation de l'intensité du faisceau, en modifiant l'extraction de la source d'ions ou le balayage, a permis des irradiations de 5 nA jusqu'à 100 nA mesurés sur une Faraday-cup de 8.4 cm<sup>2</sup>. Le diamètre de la fenêtre permettant l'extraction du faisceau est de 15 mm, soit identique à celui de la fenêtre de la cellule d'irradiation.

Les protons de 2 MeV ayant un parcours de 77  $\mu\text{m}$  dans l'eau, ils déposent toute leur énergie dans notre cellule et les rendements mesurés sont donc des rendements intégraux, c'est-à-dire des rendements moyens sur toute la trace des ions.

La dosimétrie sur cette installation est réalisée à l'aide d'une *Faraday cup* et est détaillée dans la partie correspondante. En raison de la faible documentation sur les rendements avec des ions de basse énergie, le dosimètre de Fricke n'a pas été utilisé ici.

### La plateforme CYRCé

CYRCé (Cyclotron pour la Recherche et l'Enseignement) est une plateforme de l'IPHC dont le champ de compétences touche l'imagerie et l'utilisation de faisceaux de protons pour la radiobiologie et la production d'isotopes. Elle s'articule autour d'un cyclotron T-24 de chez ACSI permettant la production de faisceaux de protons d'une énergie nominale de 25 MeV et **nano-pulsé** à une fréquence de 85 MHz. Les irradiations sont menées sur la plateforme PRéCy (Plateforme d'irradiation auprès de CYRCé), qui dispose de deux lignes d'irradiations.

L'une d'elle est dédiée aux tests de détecteurs, et la seconde, que nous avons utilisée, est dédiée à des applications en radiobiologie et radiolyse (*Figure 2-14*).

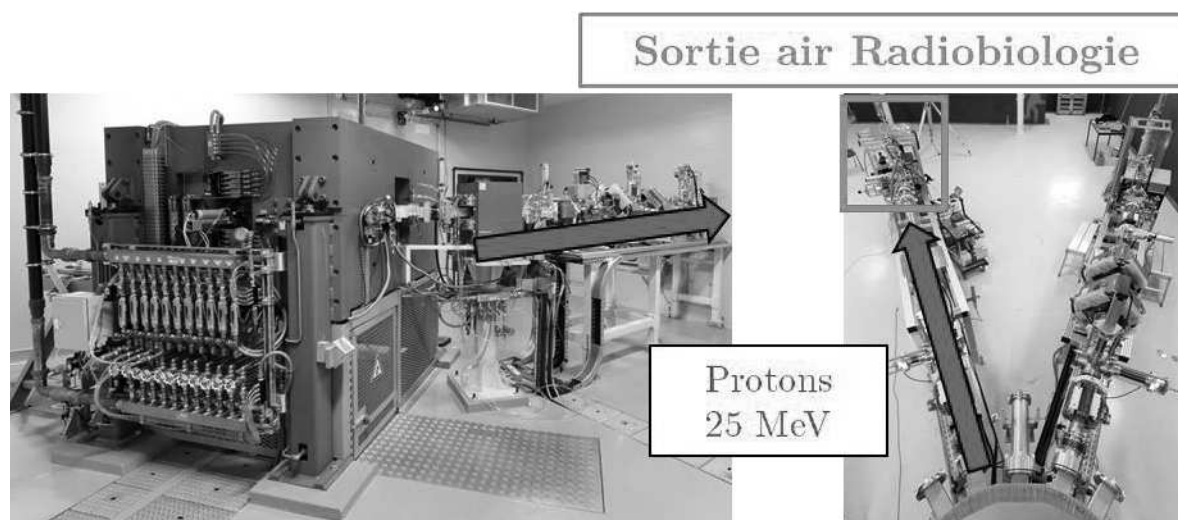


Figure 2-14 Photographie du cyclotron CYRCé et des lignes d'irradiations de PRéCy (images de cyrc.fr)

La sortie air de cette ligne permet de disposer d'un faisceau de protons d'une énergie de 24 MeV dans nos solutions et ayant un profil plat sur un diamètre maximal de 28mm en passant à travers un diffuseur en aluminium d'épaisseur 40 ou 100  $\mu\text{m}$ . Le courant d'ions peut être modulé, et durant nos expériences il a été varié entre 10 pA et 30 nA. Ces intensités correspondent à des débits de dose allant de 0.04 à 450 Gy/s dans le volume irradié.

La sortie radiobiologie est également équipée d'un dégradeur d'énergie. Il s'agit d'une roue en aluminium dont les positions disposent d'une épaisseur variable afin de réduire l'énergie du faisceau de protons (*Figure 2-15*). Cette roue nous a permis de réaliser des irradiations avec des protons de 24 à 5.9 MeV.

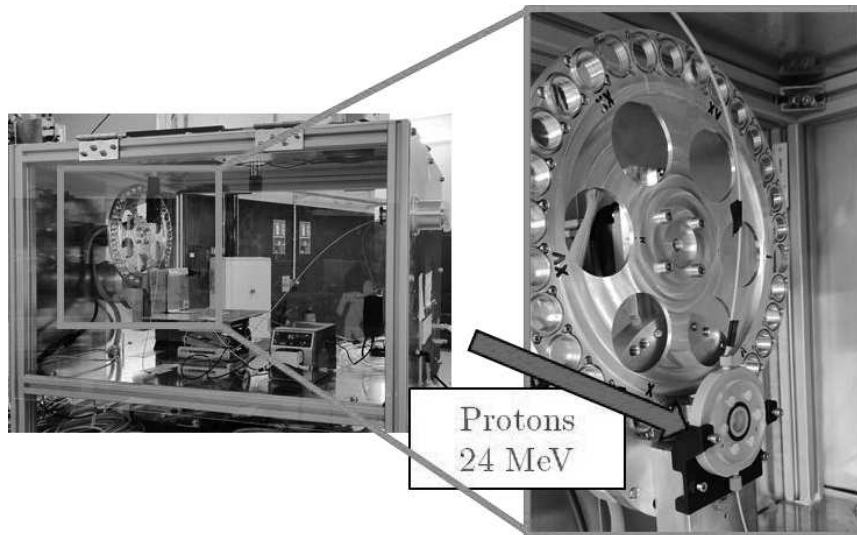


Figure 2-15 Sortie air et de la sortie Radiobiologie. Le dégradeur d'énergie est visible sur la photographie de droite

Les irradiations à CYRCé ont été réalisées sur différents dispositifs, le premier étant la cellule d'irradiation en PEEK, dans laquelle les ions s'arrêtent totalement et où les rendements mesurés sont des rendements intégraux (Figure 2-16).

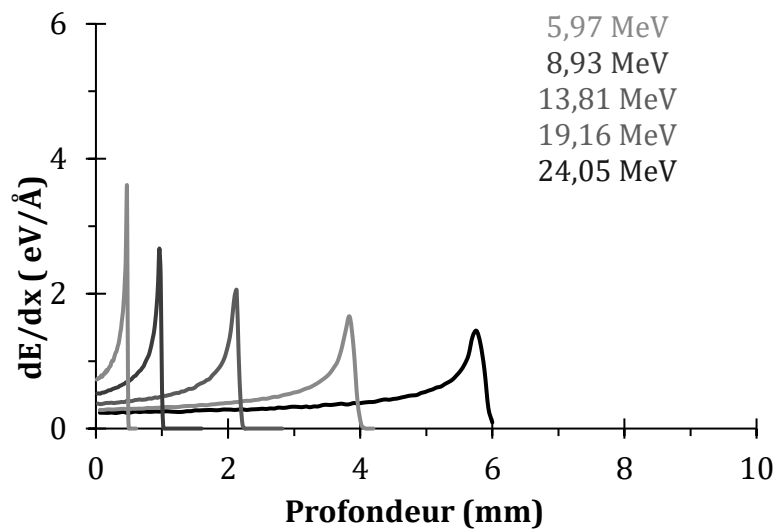


Figure 2-16 Dépôt d'énergie en fonction de la profondeur de pénétration des protons de différente énergie utilisés à CYRCé

La cellule a été utilisée à la fois en circulation mais aussi en configuration statique, pour les irradiations plus courtes que le temps de renouvellement de la cellule et pour les irradiations sous atmosphère contrôlée. L'énergie a été variée avec ce système d'irradiation.

Les eppendorfs de 200  $\mu$ L ont également été utilisés, comme décrit ci-dessus. La dosimétrie sur cette installation fut réalisée avec une *Faraday cup* et via des mesures d'intensité lumineuse émise par un scintillateur sous irradiation.



### 3/ Les rayonnements de haut TEL - Ions lourds He et C

Le HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) est le premier centre au monde dédié à la fois à la thérapie et à la recherche sur l'irradiation sous faisceaux d'ions lourds à avoir vu le jour. Il est situé à Chiba au Japon. Le centre est spécialisé dans le traitement par thérapie carbone, et la recherche est majoritairement axée autour de cette même thématique. Des recherches fondamentales et sur les effets des rayonnements spatiaux sont aussi réalisées au HIMAC en raison des divers ions et des très hautes énergies disponibles. Plus de 7000 patients ont été traités entre son ouverture officielle en 1994 et 2014 (Kamada, 2014).

Les traitements sont réalisés en journée et le faisceau est disponible la nuit dans différentes salles dédiées à la recherche. Le centre, rattaché au *National Institute for Quantum and Radiological Sciences and Technology* (QST) regroupe ainsi diverses compétences en physique des particules, radiobiologie et dosimétrie pour permettre aux différents collaborateurs de travailler dans les meilleures conditions.

Le centre s'articule ainsi autour de l'accélérateur d'ions, constitué de deux parties et capable de fournir un grand nombre de faisceaux d'ions différents, allant des protons à des ions comme le Néon, le Fer ou encore l'Argon.

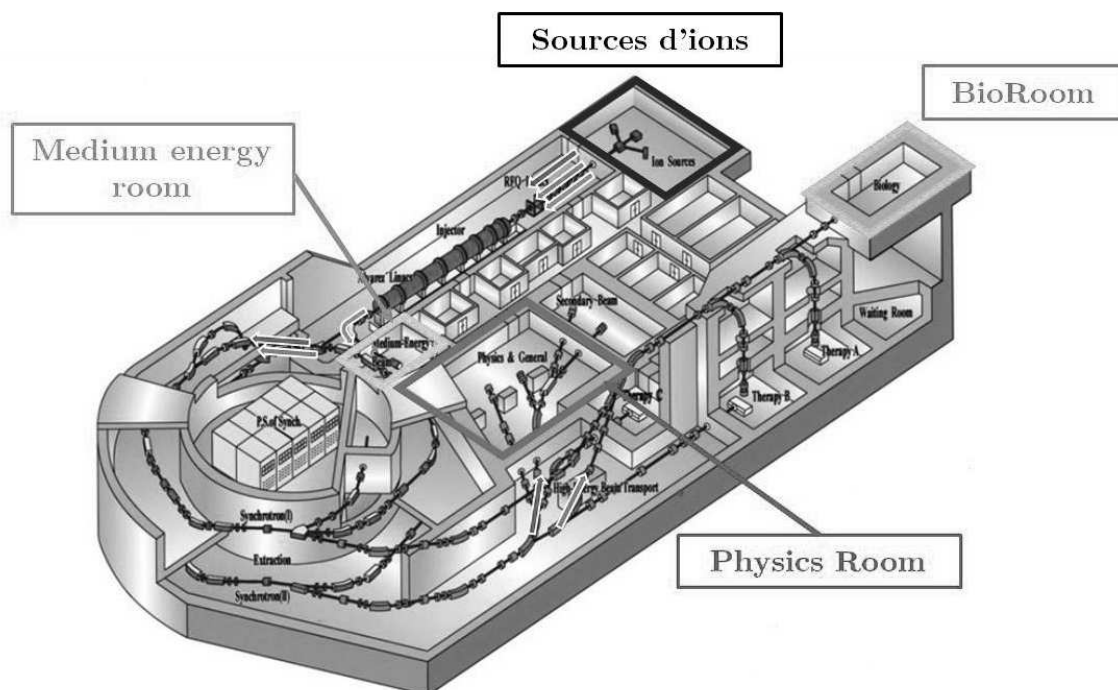


Figure 2-17 Représentation du HIMAC et des différentes salles d'irradiation organisées autour des synchrotrons

La première partie est composée de deux LINAC, (Accélérateurs linéaires) qui permettent aux ions accélérés d'atteindre une énergie de 6 MeV / nu. Le premier possède une longueur de 7.3m et permet aux ions d'atteindre dans un premier temps 800 keV/nu et d'être envoyés dans le second LINAC. Celui-ci mesure 24 m de long et permet d'atteindre l'énergie de 6 MeV/nu.

Les ions sont ensuite envoyés dans un des deux synchrotrons du centre, parfaitement identiques et fonctionnant en parallèle, dans lequel ils seront accélérés jusqu'à atteindre des énergies allant de 100 à 800 MeV/nu selon le type d'ion accéléré. Ce système de double synchrotron permet de disposer d'une sécurité matérielle cruciale pour un centre de thérapie aussi important que le HIMAC. Le diamètre de chaque synchrotron est de 41.3m pour une circonférence de 130m (Kenji *et al.*, 1990). Au total, trois salles différentes sont disponibles pour la recherche (*Figure 2-17*).

La première fournit un faisceau provenant directement des LINAC et donc d'ions d'énergie moyenne 6 MeV/nu. Cette salle est dénommée « Medium Energy Room » (MEXP), en raison des énergies des ions qui y sont disponibles. Nos expériences dans cette salle nous ont permis de travailler avec deux types d'ions, des hélions<sup>8</sup> (ions He / He<sup>2+</sup>) et des ions carbone (ions C / C<sup>6+</sup>). La fenêtre permettant l'extraction des ions à l'air est constituée de Havar, induisant des pertes d'énergie par rapport aux 6 MeV/nu initiaux.

Le faisceau qui y est fourni est très intense et compris dans des impulsions courtes, les ions étant regroupés durant leurs accélérations dans les LINACs. Durant nos expériences, la structure des impulsions se composait **de pulses d'une durée de 700 µs envoyés toutes les 1.65 secondes**.

Le débit de dose moyen y est relativement faible, mais avec des intensités maximales de l'ordre de 10<sup>10</sup> ions/s/cm<sup>2</sup>, le débit de dose dans l'impulsion, qui dure seulement 700 µs et dont les ions ne parcourent qu'une très faible distance dans l'eau, devient rapidement considérable. La sortie faisceau est cependant équipée d'atténuateurs permettant de réduire l'intensité d'un facteur 10 ou 100. Pour les résultats de nos études, nous avons considéré le débit de dose dans l'impulsion et dans le volume irradié, qui est très faible, avec des profondeurs de pénétration de 77 µm pour les C-ions et 420 µm pour les He-ions (*Figure 2-18*). Ces épaisseurs ont été déterminées par SRIM.

Tableau 2-3 Tableau récapitulatif des courants utilisés et débits de dose correspondants avec les Hélions de 21 MeV

Flux d'ions He (ions/cm <sup>2</sup> /s)	1.97 × 10 <sup>10</sup>	1.97 × 10 <sup>9</sup>	1.97 × 10 <sup>8</sup>	1.72 × 10 <sup>8</sup>
Débit de dose (Gy/s)	2.32 × 10 <sup>6</sup>	2.32 × 10 <sup>5</sup>	2.32 × 10 <sup>4</sup>	2.03 × 10 <sup>4</sup>

Tableau 2-4 Tableau récapitulatif des courants utilisés et débits de dose correspondants avec les ions carbone de 41 MeV

Flux d'ions C (ions/cm <sup>2</sup> /s)	2.53 × 10 <sup>9</sup>	2.53 × 10 <sup>8</sup>	5.10 × 10 <sup>8</sup>	4.37 × 10 <sup>7</sup>
Débit de dose (Gy/s)	3.08 × 10 <sup>6</sup>	3.08 × 10 <sup>5</sup>	6.21 × 10 <sup>5</sup>	5.34 × 10 <sup>4</sup>

Les ions étant de moyenne énergie et disposant d'un TEL élevé voire très élevé pour les ions carbone, leur profondeur de pénétration sera particulièrement faible et il est alors nécessaire d'utiliser la cellule d'irradiation en PEEK afin qu'ils puissent pénétrer dans nos solutions.

<sup>8</sup> Hélion est l'appellation donnée aux ions Hélium provenant d'accélérateurs, pour les différencier des particules α qui sont fondamentalement de même nature.

Des ions de ce TEL déposant une énergie importante dans l'air, une mesure exacte de leur énergie par les opérateurs est réalisée après la sortie air de l'accélérateur à l'emplacement de notre cellule. L'énergie en solution est déterminée par calculs sur le logiciel SRIM.

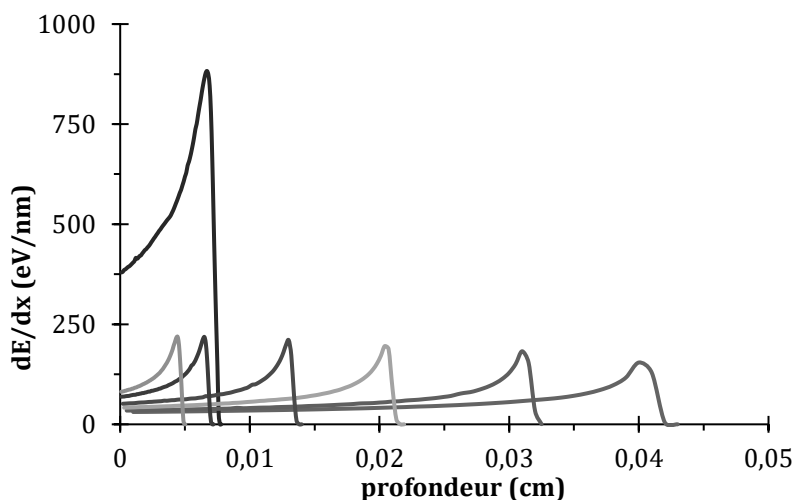


Figure 2-18 Dépôt de dose en fonction de la profondeur de pénétration des Hélicons de différente énergie et des C-ions de 41 MeV utilisés dans la MEXP.

Ainsi, les ions He auront une énergie maximale en solution de 21 MeV (contre 24 MeV avant extraction) et les ions carbone une énergie de 41 MeV (contre 72 MeV dans l'accélérateur).

La cellule est fixée sur une table xyz permettant de régler la distance entre elle et la sortie, ce qui permet de dégrader l'énergie des ions dans l'air. Ceci fut utilisé pour les ions He, nous permettant ainsi de réaliser des irradiations avec des énergies de 21 à 5.9 MeV.

Les irradiations dans la Medium Energy Room ont été réalisées en configuration circulation ainsi qu'en configuration statique, sous air et sous Argon. Les expériences sous atmosphère inerte ont été réalisées avec un flux d'argon constant pendant les irradiations, mais sans bullage (Figure 2-19). La dosimétrie est réalisée par mesure du courant d'ions, calibration par du CR39 et simulations SRIM pour le dépôt de dose.

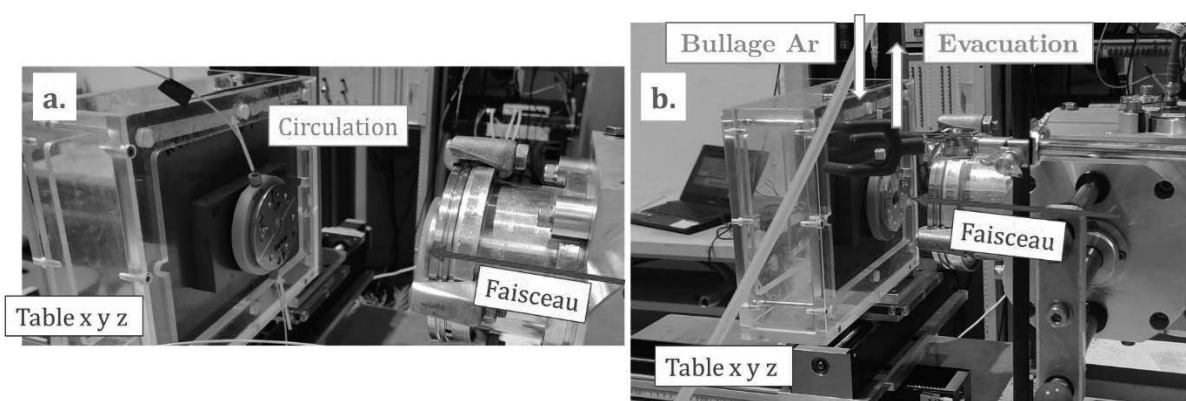


Figure 2-19 Cellule d'irradiation placée devant la sortie air de la MEXP. a. cellule à circulation et b. cellule statique sous flux d'Argon

La seconde salle, la Physics Room (PHI), fournit un faisceau obtenu après accélération dans un des synchrotrons et donc d'ions de haute énergie. Nous avons ainsi travaillé avec des ions He de 230 MeV/nu (920MeV au total).

La structure temporelle du faisceau repose ici sur des **impulsions de 1.5 secondes toutes les 3.3 secondes**. Couplée à la profondeur de pénétration des ions de beaucoup plus importante que dans la *Medium Energy Room*, cette structure donne lieu à des débits de dose nettement plus faibles. L'impulsion plus longue s'explique par le fait que les paquets d'ions sont « étendus » lors de leur accélération dans le synchrotron. Le flux d'ions peut être facilement réglé, et il a été choisi ici de se placer à un débit de dose proche de celui utilisé en thérapie conventionnelle à savoir 0.07 Gy/s en débit moyen et 0.15 Gy/s dans l'impulsion (flux d'ions He de  $8 \times 10^7$  ions/cm<sup>2</sup>/pulse).

Les expériences ont ici été réalisées avec le PEIGNE, pour obtenir les rendements des différentes espèces scrutées tout le long de la courbe de Bragg. Les ions He s'arrêtant dans la 25<sup>ème</sup> cuve, trois cuves supplémentaires ont été placées après celle-ci, afin d'étudier la radiolyse causée par les fragments post pic de Bragg. Le faisceau utilisé pour cette série d'expériences mesurant 2,2 cm de diamètre, une seule série de cuves était irradiée par expérience (*Figure 2-20*).

Parallèlement aux expériences de mesure de la radiolyse le long de la trace réalisées avec le PEIGNE, nous avons étudié la fragmentation des ions sur une cible. Une fine cible carrée de polyéthylène (PE) de 1 mm d'épaisseur et 5 cm de côté a été placée en amont du portoir PEIGNE. Des cuves, contenant des solutions de C3CA et de phénylalanine, ont été placées de part et d'autre à des angles de 5 à 30° et à 90°, soit sept cuves pour chaque espèce chimique, pour mesurer la fragmentation à différents angles.

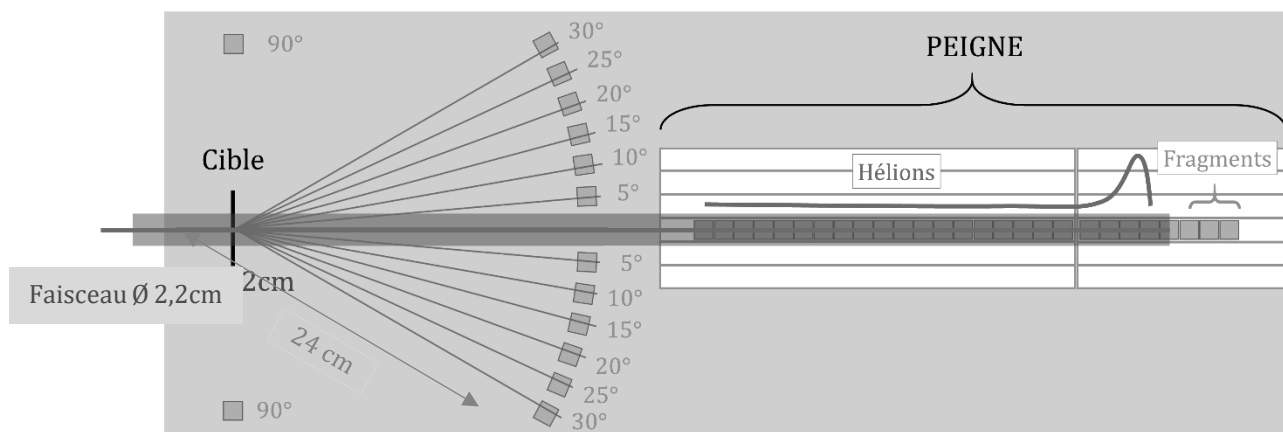


Figure 2-20 portoir PEIGNE utilisé dans la PHI

La mesure de la dose a ici été réalisée en mesurant le dépôt d'énergie tout au long de la courbe de Bragg dans l'eau par une chambre d'ionisation et est explicitée en détail ci-dessous. La mesure pour les fragments a été réalisée avec la même chambre d'ionisation, placée derrière une des cuves à un angle de 20° durant toute la série d'expérience. Des mesures par détecteurs de traces nucléaires par fluorescence (FNTD) ont été effectuées à chaque angle, donnant une évolution relative de la dose enregistrée. Ces détecteurs ont été analysés par microscopie confocale par Tamon Kusumoto dans le cadre de notre collaboration.

Enfin, la dernière salle d'irradiation dédiée à la recherche est la BioRoom. Cette salle simule les conditions des salles de traitement initiales, délivrant un faisceau de profil parfaitement plat sur un diamètre maximal de 10 cm et à des débits de dose correspondant à ceux utilisés en thérapie conventionnelle (de l'ordre de 0.12 Gy/s en débit de dose moyen au maximum).

Nous avons travaillé dans cette salle avec les ions utilisés en thérapie au HIMAC, les ions Carbone, d'énergie 400 MeV/nu soit 4.8 GeV.

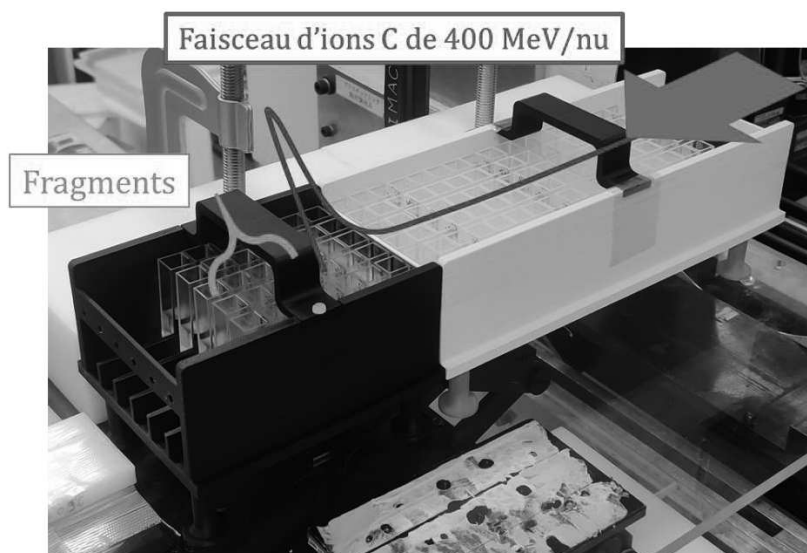


Figure 2-21 Portoir PEIGNE utilisé dans la BioRoom

Le débit de dose a été réglé lors de nos expériences à un débit moyen de 0.07 Gy/s (Flux d'ions de  $1.35 \times 10^7$  ions/cm<sup>2</sup>/pulse).

La structure temporelle du faisceau est identique à celle de la Physics room, car le faisceau provient aussi d'un des synchrotrons. Le débit dans l'impulsion est donc ici de 0.15 Gy/s, soit très proche de celui des expériences avec les hélions de hautes énergies.

Le faisceau large de la BioRoom permet d'utiliser les portoirs PEIGNE à leur plein potentiel avec l'irradiation simultanée de 6 séries de cuves, permettant alors une acquisition d'une grande quantité de données tout le long de la courbe de Bragg, et encore une fois, au-delà (Figure 2-21).

La dosimétrie est ici déterminée par des mesures du dépôt d'énergie tout le long de la courbe de Bragg par une chambre d'ionisation.

## C/ Dosimétrie

Deux types de dosimètres ont été utilisés durant ces expériences de thèse. Le premier correspond aux dosimètres physiques, également dénommés dosimètres primaires car ils permettent l'acquisition d'une valeur de dose ou d'énergie déposée sans calibration préalable (Choppin *et al.*, 2013b). Le second type correspond aux dosimètres chimiques, qui entrent dans la catégorie des dosimètres secondaires car calibrés le plus souvent avec le premier type de dosimètres.

## 1/ Dosimètres physiques

### Faraday cup

La dosimétrie sur les accélérateurs délivrant des faisceaux de protons a été réalisée en utilisant des Faraday-cup. Ces dernières sont composées de plaques métalliques isolées et permettent de mesurer le courant d'ions. Ces ions en entrant en collision avec le métal transfèrent leur charge électrique engendrant ainsi un courant faible mais mesurable. Ce courant est directement lié à la quantité de charges et donc d'ions entrant en collision par unité de temps ( $1A = 1C/s$ ).

**Accélérateur VdG 4 MV - ACACIA :** La Faraday-cup utilisée ici permet de mesurer le courant en ligne durant l'irradiation. Il s'agit d'un anneau de diamètre interne 15 mm et externe 36mm (Figure 2-22). Un repousseur d'électrons est utilisé pour éviter que des électrons arrachés sur les surfaces métalliques par l'impact de l'ion ne soient mesurés par la Faraday-cup comme des charges positives, ce qui fausserait la mesure (Ivers *et al.*, 1986). La mesure se fait ainsi sur la partie pleine de l'anneau et nous donne le flux en ions/s entrant en collision sur cette surface. Il est alors possible de déterminer le flux en ions/s/cm<sup>2</sup> grâce à la surface pleine (8.4 cm<sup>2</sup>) qui est le même que celui passant par la surface creuse et donc qui irradie la cellule. La mesure de la dose se fait donc ici en intégrant ce courant durant le temps d'irradiation, nous donnant la charge totale déposée en solution. En connaissant l'énergie déposée pour chaque ion, nous pouvons alors calculer la dose déposée précisément.

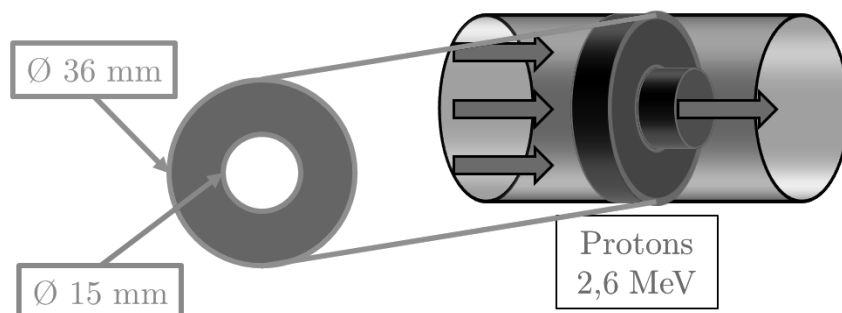


Figure 2-22 Schéma de la Faraday cup utilisée au VdG 4 MV

**Cyclotron CYRCé :** La dosimétrie sur le Cyclotron CYRCé se fait au travers de l'utilisation de deux Faraday-cup. La première est interne, et sert à mesurer le courant dans la ligne avant et après irradiation (le courant moyen est alors utilisé). La seconde est une Faraday-cup externe, dont le placement est identique à celui de notre échantillon irradié, et qui mesure le courant d'ions qui atteint l'échantillon. Un facteur de calibration est déterminé entre les deux cups et est utilisé lors des expériences pour déterminer le temps d'irradiation à partir du courant mesuré par la cup interne.

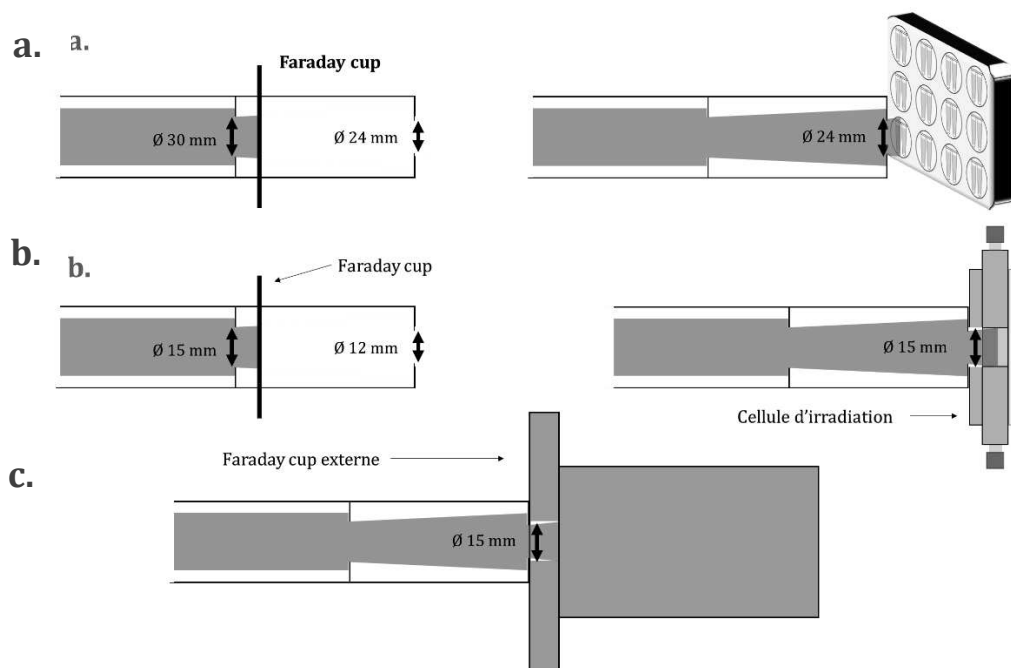


Figure 2-23 Schéma des mesures de courant au cyclotron CYRCé. a. mesure lors des irradiations des eppendorfs b. Mesure lors des irradiations de la cellule à circulation c. mesure à l'aide de la Faraday-cup externe

Le diamètre irradié sur la cup interne est déterminé en utilisant un collimateur légèrement plus grand que le collimateur placé en sortie. Dans le cas d'irradiations avec la cellule d'irradiation PEEK, le collimateur en sortie était de 12mm et celui à l'intérieur de la ligne de 15 mm. Dans le cas des irradiations avec les eppendorfs, le collimateur externe étant de 24 mm, le collimateur interne avait une dimension de 30 mm. Le rapport de diamètre entre les deux collimateurs est ainsi le même (Figure 2-23).

### Chambre d'ionisation

L'autre dosimètre physique utilisé est la chambre d'ionisation (CI). Ici, les ions ne sont pas stoppés sur une plaque en métal mais ils vont traverser une chambre remplie de gaz. En traversant cette enceinte, les ions vont former des paires d'ions, et donc engendrer une ionisation du gaz, créant un courant mesurable par des électrodes placées dans la chambre. La quantité de charge mesurée est ainsi directement proportionnelle à l'énergie et donc la dose déposée (Choppin *et al.*, 2013c).

Dans la Physics Room, la CI a été placée dans un réservoir d'eau de 15cm, et en contrôlant à distance la position de la CI dans l'eau il a été possible de mesurer le dépôt de dose en fonction de la profondeur d'eau. Les ions He parcourent plus de 15cm dans l'eau, et le bassin de la CI ne mesurait que 20 cm. La mesure de la dose s'est donc faite en deux étapes, avec des blocs de polyéthylène (PE) d'épaisseur connue et calibrée dont la correspondance en équivalent eau est connue. Ces blocs étaient placés devant le réservoir pour aller jusqu'au pic de Bragg et au-delà (Figure 2-24). Par la suite, la dose déposée dans les solutions des cuves est déterminée en calculant leur épaisseur d'équivalent eau.

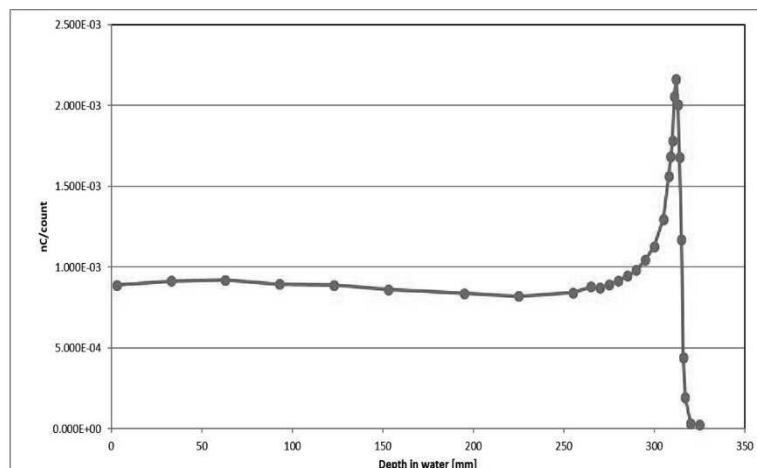


Figure 2-24 Chambre d'ionisation (droite) et courbe de dose obtenue dans la PHI

Dans la BioRoom, cette mesure a été réalisée par les opérateurs du HIMAC grâce à des épaisseurs de PMMA croissantes (dont l'équivalence en épaisseur d'eau est connue). La mesure par CI a donc été effectuée pour chaque épaisseur de PMMA, avec une résolution très fine dans le pic de Bragg, ce qui nous a permis d'obtenir la dose tout le long de la courbe et donc dans chacune de nos cuves.

## 2/ Dosimètres chimiques

### *Dosimètre de Fricke*

Le dosimètre de Fricke est un dosimètre liquide constitué de Sel de Mohr, donc de Fer au degré d'oxydation +II (1 mM), de chlorure de sodium (NaCl, 1 mM) en milieu acide sulfurique (0.4 M).

Sous irradiation, les espèces de la radiolyse de l'eau oxydent le Fer II en Fer III selon les équations (*Equation 1-40* et *Equation 1-43*). Le rendement de formation des ions Fer III est connu pour les rayonnements de bas TEL, photons et électrons énergétiques (« 3. Determination of Absorbed Dose by Chemical Methods », 1969) et démontré comme stable sur une large gamme de débit de doses (Thomas & Hart, 1962; Trumbore *et al.*, 1986) avec une valeur donnée entre 15.36 et 15.6 espèces pour 100 eV déposés.

La quantité d'ions  $\text{Fe}^{3+}$  formée peut alors être mesurée par spectroscopie UV-Visible à une longueur d'onde de 302 nm ( $\epsilon_{\text{Fe}^{3+}}^{304} = 2194 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et peut donc être directement reliée à la quantité d'énergie déposée et donc à la dose. Ce dosimètre étant une solution aqueuse irradiée dans des conditions exactement identiques à celles de nos solutions d'intérêt, il est le moyen de mesurer la dose dans nos solutions le plus fidèle. Il n'est cependant pas adapté à toutes les conditions d'irradiations, car il s'agit d'un dosimètre secondaire nécessitant un étalonnage pour les conditions qui ne sont pas référencées.



*Dosimètre Alanine*

Le dosimètre alanine est un dosimètre chimique solide constitué d'alanine, un acide aminé, pure compressée. Son principe de fonctionnement repose sur la formation sous irradiation de radicaux d'alanine (qui seraient au nombre de trois (Jåstad *et al.*, 2017)) dont le rendement de formation en fonction de la dose déposée est connu. Ces radicaux étant particulièrement stables, jusqu'à plusieurs mois (Bradshaw *et al.*, 1962), ils peuvent être mesurés et quantifiés après irradiation par RPE (Résonance Para-Electronique) pour déterminer la dose déposée. Ce dosimètre est utilisé en routine pour les expériences réalisées au CRT Aerial, qui possède une expertise internationale dans son utilisation. Il a par ailleurs été démontré comme insensible au débit de dose sur une large gamme de débits (« Basic Metrology », s. d.; Desrosiers *et al.*, 2008; Desrosiers & Puhl, 2009).

## D/ Plateformes analytiques

### 1/ Les analyses « in situ »

#### *Les mesures UV-Visibles*

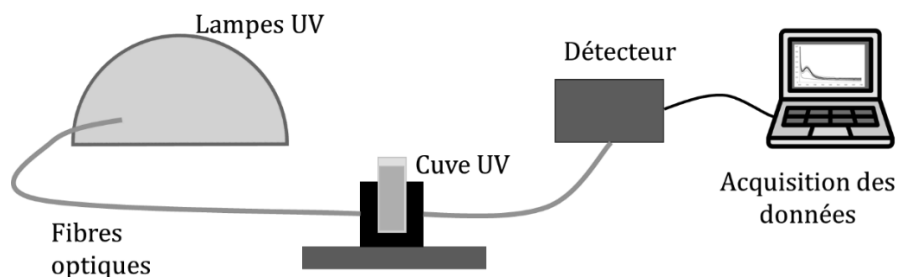


Figure 2-25 Schéma du système d'analyses UV portable

Afin de réaliser les mesures par spectroscopie UV-Visible au plus proche des irradiations, un système d'analyse portable a été mis au point et utilisé pour la quasi-totalité des mesures UV. Il se compose d'un boîtier de lampes (D et Xe), d'un détecteur, d'un portoir pour cuves UV (*OceanOptics*) et de fibres optiques (*Thorlabs*) facilement démontables et transportables (*Figure 2-25*). L'acquisition des données se fait via le logiciel *OceanView*.

#### *Les analyses Infra-rouge (FTIR)*

Les caractérisations de structure secondaire des gels et plastiques formés sous irradiation lors des expériences pour le projet ProBioTion ont été réalisées par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR). Ces mesures ont été réalisées sur un spectromètre IR ALPHA (*Brucker*) fonctionnant en mode transmission.

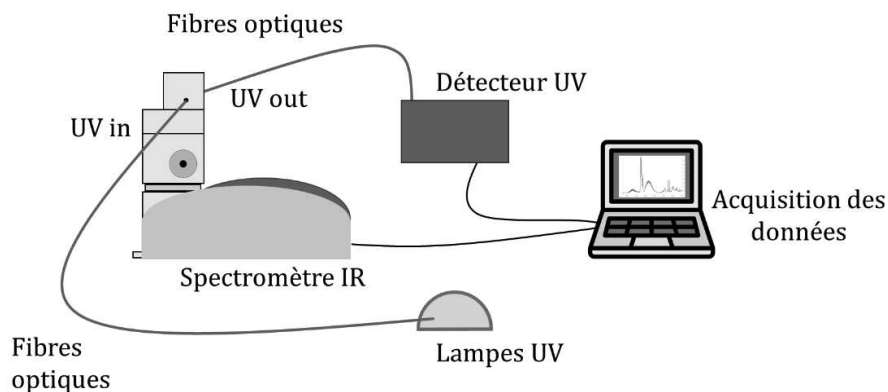


Figure 2-26 Schéma du système d'analyses UV et IR des films de protéines

L'acquisition des données s'est faite via le logiciel *OPUS*. Les analyses ont été réalisées sur des gels suffisamment fins (d'épaisseur 10-20  $\mu\text{m}$  environ).

Les analyses ont été réalisées grâce à un système d'ascenseur à plusieurs étages, permettant de transporter l'échantillon entre différentes positions, une pour les analyses IR et l'autre pour les analyses UV (Figure 2-26). Initialement développé pour pouvoir alterner rapidement entre position d'analyse et position d'irradiation sur d'autres projets liés aux protéines, il fut utilisé ici uniquement dans un but analytique.

## 2/ Le couplage HPLC-MS

Les analyses des solutions aqueuses de biomolécules ainsi que des sondes C3CA et TA pour le radical hydroxyle ont été réalisées par HPLC.

L'HPLC utilisée est un système *Dionex UltiMate 3000 RS* (ThermoFisher) équipé d'un passeur d'échantillons *WPS* (température réglée à 10°C) et couplé à plusieurs détecteurs. Le premier est un détecteur à barrettes de diode *DAD RS Diode Array Detector UltiMate 3000*. Le suivant est un détecteur de Fluorescence *JASCO FP4020*. Les deux détecteurs suivants sont destructifs, le flux HPLC est donc séparé en deux par un split.

Le troisième détecteur est un détecteur *Corona Veo* à aérosol chargé (CAD) (ThermoFisher). Enfin, le dernier détecteur est un spectromètre de masse haute résolution *LTQ-Orbitrap XL* (ThermoFisher). Les séparations ont été réalisées sur une colonne *C18 Hypersil Gold* (250 x 4.6mm, 5  $\mu\text{m}$ ) précédée d'une pré-colonne de 10mm ayant les mêmes caractéristiques que la colonne.

Le détecteur DAD a été utilisé pour deux aspects. Le premier est la vérification de l'identification des composés via leurs spectres UV-Vis, et la seconde est la quantification d'une partie des produits de radiolyse du tryptophane. L'acquisition sur les détecteurs *ThermoFisher* a été réalisée grâce au logiciel **Chromoéléon** et sur le détecteur *JASCO* grâce au logiciel **ChromNav**. Le détecteur de fluorescence a été utilisé à des fins quantitatives de par sa grande sensibilité.

Le spectromètre de masse a été utilisé pour l'identification des produits de radiolyse via les rapports  $m/z$  des fragments observés. Les données ont été collectées grâce au logiciel **Xcalibur**.

Enfin, le détecteur corona a été utilisé pour son caractère universel. Il s'agit d'un détecteur dont la réponse est proportionnelle uniquement à la masse de produits le traversant (indépendamment de leur structure) ainsi qu'à la composition de la phase mobile. Il est ainsi possible d'établir des courbes d'étalonnage pour des produits commerciaux et d'appliquer ces mêmes courbes (dès lors que la composition de la phase mobile est identique) à des produits non disponibles dans le commerce.

Au Japon, les analyses HPLC ont été réalisées sur une HPLC LC-20AD (*Shimadzu*) couplée à des détecteurs UV-Vis et fluorescence de la même marque.

Des étalonnages croisés entre le système en France et celui au Japon ont été réalisés pour les différents composés analysés

## E/ Les systèmes étudiés

### 1/ L'eau oxygénée

Deux espèces piégeuses de HO• ont été utilisées : KBr ( $k_{Br^-}^{HO} = 1.1 \times 10^{10} M^{-1}.s^{-1}$  (Zehavi & Rabani, 1972)) et le méthanol ( $k_{MeOH}^{HO} = 1.1 \times 10^{10} M^{-1}.s^{-1}$  (Buxton *et al.*, 2009)).

Afin de capturer l'électron hydraté et d'éviter sa réaction avec l'oxygène, les solutions sont préparées sous Argon dans un milieu contenant du nitrate de sodium (NaNO<sub>3</sub>) de concentration 25 mM (temps de capture de l'électron hydraté de 4 ns,  $k_{NO_3^-}^{e-aq} = 9.7 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$  (Buxton *et al.*, 2009)). Lors de l'utilisation de la sonde méthanol, les solutions de nitrate de sodium et de méthanol étaient bullées séparément puis des dilutions de la solution de méthanol étaient réalisées ensuite pour éviter des pertes de méthanol durant le bullage de par sa volatilité. Pour l'utilisation de la sonde KBr, Les solutions étaient dégazées simultanément à l'aide d'un poste multi-dégazage. Les différentes concentrations utilisées et leurs temps de capture correspondants sont listés dans le Tableau 2-5.

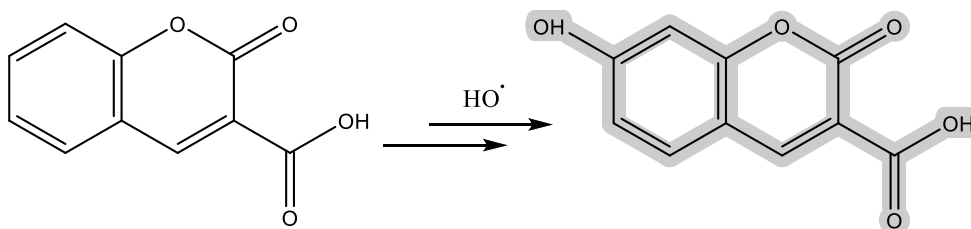
Tableau 2-5 Liste des temps de capture correspondant aux différentes concentrations de KBr et de méthanol utilisées

<b>Temps de capture (ns)</b>	0.37	0.74	1.85	7.4	18.5	74	296	740	1480
<b>Concentration (mM) MeOH</b>	/	/	560	140	56	14	3.5	/	0.7
<b>Concentration (mM) Br<sup>-</sup></b>	246	123	49.2	12.3	4.92	1.23	0.31	0.12	0.06

## 2/ Les sondes du radical hydroxyle

### La sonde C3CA

L'Acide Coumarine 3-Carboxylique (généralement appelé C3CA ou 3CCA) réagit avec le radical hydroxyle pour former divers produits hydroxylés. L'un de ces produits de réaction, l'acide 7-hydroxy-Coumarine-3-Carboxylique (7-OH-C3CA/3CCA) (Equation 2-1) est particulièrement intéressant par rapport aux autres produits de réaction car intensément fluorescent avec un rendement quantique de fluorescence de 0.70 à pH neutre (Sun *et al.*, 1998). Ce produit est stable sur plusieurs jours d'après nos tests, et sur plusieurs mois selon les travaux de (Collins *et al.*, 1994). Il se forme avec un taux de production de 4.7% (Maeyama, Yamashita, Baldacchino, et al., 2011; Yamashita et al., 2012).



Equation 2-1 Réaction simplifiée de formation du 7-OH-3CCA

Cette sonde présente une constante de vitesse élevée pour sa réaction avec  $\text{HO}\cdot$ , estimée à  $6.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Yamashita *et al.*, 2012), cependant sa faible solubilité dans l'eau ne permet pas de réaliser des mesures à des temps de capture très courts.

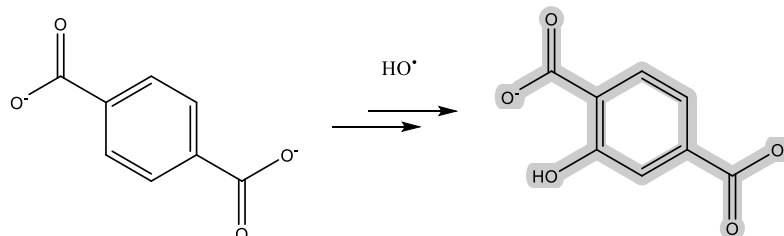
Les solutions de 3CCA sont préparées dans du tampon phosphate 66 mM (tampon à pH = 6.8 préparé à partir de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) permettant de se placer en conditions physiologiques et également d'améliorer la solubilité de la C3CA. Il est alors possible avec ce solvant d'atteindre des concentrations de 20 mM. Les différentes concentrations utilisées et leurs temps de capture correspondants sont listés dans le Tableau 2-6. La cinétique n'est pas étudiée au-delà de 1480 ns en raison d'une concentration trop faible en sonde moléculaire qui la rendrait à la fois beaucoup trop sensible à la moindre trace d'impuretés. De plus, la concentration serait imprécise, et donc l'hypothèse d'un temps de capture fixe deviendrait invalide à des concentrations si faibles, de l'ordre des concentrations en produits de radiolyse formés.

Tableau 2-6 Liste des temps de capture correspondant aux différentes concentrations de 3CCA utilisées

<b>Temps de capture (ns)</b>	7.4	18.5	74	296	740	1480
<b>Concentration (mM)</b>	20	8	2	0.5	0.2	0.1

## La sonde TA

Le téréphtalate de sodium (noté TA) est une autre sonde organique réagissant de façon similaire à la C3CA avec le radical hydroxyle pour former un dérivé hydroxylé qui sera ici le 2-hydroxy-téréphtalate (2-OH-TA) (Equation 2-2).



Equation 2-2 Réaction simplifiée de formation du 2-OH-TA

Son taux de production de 35% a été déterminé expérimentalement à l'ICANS et validé par la littérature où le rendement est donné à  $32 \pm 7\%$  (Charbouillot *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2018; Page *et al.*, 2010). Cela en fait donc une sonde encore plus sensible que la 3CCA en raison du taux de production de l'espèce fluorescente nettement plus élevé.

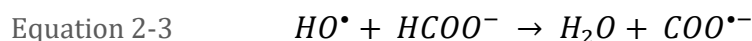
Un autre avantage de cette sonde est sa très bonne solubilité (131 g/L (Rezazadeh *et al.*, 2021)). TA étant un ion doublement chargé, il est très soluble dans l'eau ce qui nous permet de monter à des concentrations au-delà de 300 mM et donc de couvrir une gamme encore plus large de temps de capture. Il est toutefois légèrement moins réactif vis-à-vis de  $\text{HO}^\bullet$  ( $k_{TA}^{\text{HO}} = 4.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Charbouillot *et al.*, 2011), nécessitant donc d'être plus concentré que le 3CCA pour un même temps de capture. Les différentes concentrations utilisées et leurs temps de capture correspondants sont listés dans le Tableau 2-7.

Tableau 2-7 Liste des temps de capture correspondant aux différentes concentrations de TA utilisées

<b>Temps de capture (ns)</b>	0.74	1.85	7.4	18.5	74	296	740	1480
<b>Concentration (mM)</b>	338	84.5	33.8	8.45	3.38	0.85	0.34	0.17

## Le système KBr/formiate

Le système de sonde KBr/Formiate est très différent des deux sondes décrites précédemment. Premièrement, il repose sur deux solutions différentes, une contenant du formiate de sodium et une seconde contenant du bromure de potassium (KBr). Il s'agit d'une sonde à caractère inorganique. Ces deux espèces peuvent réagir avec le radical hydroxyle selon les réactions suivantes (Equation 2-3 et Equation 2-4) (Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008a).



Le mécanisme détaillé de ce système de mesure sera explicité et également discuté plus tard dans le **Chapitre 3** - de ce manuscrit.

Au final, la relation importante permettant la détermination du rendement du radical hydroxyle avec ce système est montrée dans l'*Equation 2-5*

$$\text{Equation 2-5} \quad G(\text{HO}^\bullet) = G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Formiate}} - G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{KBr}}$$

L'usage de deux solutions différentes pour réaliser une seule mesure implique de se placer au même temps de capture pour les deux sondes du système, ce qui correspond à des concentrations différentes car les constantes de vitesse de réaction avec  $\text{HO}^\bullet$  ne sont pas les mêmes ( $k_{\text{HCOO}^-}^{\text{HO}} = 3.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Chin & Wine, 1994; Motohashi & Saito, 1993) et  $k_{\text{Br}^-}^{\text{HO}} = 1.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Zehavi & Rabani, 1972)). Ces concentrations sont référencées dans le Tableau 2-8.

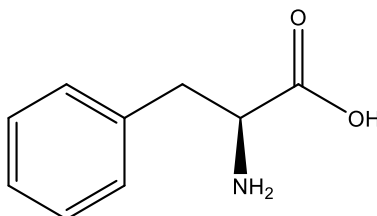
Tableau 2-8 Liste des temps de capture correspondant aux différentes concentrations de KBr et de formiate de sodium utilisées

<b>Temps de capture (ns)</b>	0.37	0.74	1.85	7.4	18.5	74	296	740	1480
<b>Concentration (mM) <math>\text{HCOO}^-</math></b>	844	422	169	42.2	16.9	4.22	1.06	0.42	0.21
<b>Concentration (mM) <math>\text{Br}^-</math></b>	246	123	49.2	12.3	4.92	1.23	0.31	0.12	0.06

### 3/ Les biomolécules protéiques

#### *La phénylalanine*

La phénylalanine est un acide aminé dont le groupement latéral caractéristique est un groupement phényle (*Figure 2-27*). Ses produits de radiolyse provenant majoritairement de réactions avec le radical hydroxyle, il s'agira de composés hydroxylés et donc intensément fluorescents dans les bonnes conditions d'émission et d'excitation.



*Figure 2-27 Structure de la Phénylalanine*

Les solutions irradiées de phénylalanines sont préparées dans de l'eau MilliQ à une concentration de 1.98 mM ( $k_{\text{Phe}}^{\text{HO}} = 6.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Solar, 1985)) correspondant à un temps de capture de 74 ns.

*L'aspartame*

L'aspartame est un dipeptide constitué d'une unité phénylalanine et d'une unité acide aspartique dont la fonction C-terminale est fonctionnalisée par un groupement méthyle. Tout comme pour la phénylalanine, ses produits de radiolyse sont facilement détectables par fluorescence dans les bonnes conditions.

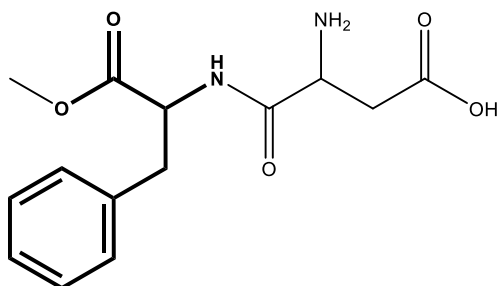


Figure 2-28 Structure de l'Aspartame

Les solutions à irradier sont préparées dans l'eau MilliQ à une concentration de 2.25 mM ( $k_{Asp}^{HO} = 6.0 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ , mesuré) pour un temps de capture de 74ns. Les solutions sont préparées au plus proche possible de leurs irradiations car l'aspartame subit une hydrolyse pour former la DKP (Diketopiperazine). Cette hydrolyse est relativement lente dans l'eau MilliQ mais est favorisée par une augmentation du pH, rendant donc impossible des irradiations dans le tampon phosphate à pH physiologique (6.8).

*Le tryptophane*

Le groupement latéral du tryptophane caractéristique de ce dernier est un cycle indole (juxtaposition d'un cycle benzénique et d'un cycle pyrrolique). Les produits de radiolyse pouvant être obtenus offrent donc de multiples possibilités et seront ainsi très nombreux, d'autant plus que certains proviennent de cyclisations supplémentaires ou à l'inverse d'ouvertures de cycle. Les propriétés spectroscopiques de ces différents composés seront ainsi fortement variables, rendant l'analyse nettement plus compliquée. Plusieurs composés sont détectables dans les mêmes conditions de fluorescence, ces dernières ont ainsi été optimisées pour convenir au plus grand nombre de produits. Les produits restants sont détectés en UV à une longueur d'onde de 256 nm.

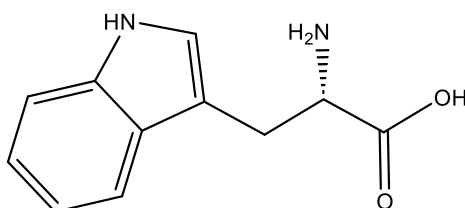
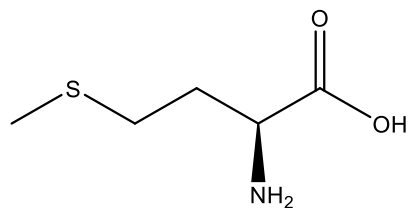


Figure 2-29 Structure du Tryptophane

Les solutions ont été préparées dans de l'eau MilliQ, avec une concentration en tryptophane de 1.0 mM correspondant encore une fois à un temps de capture de 74ns ( $k_{Trp}^{HO} = 1.0 \times 10^{10} M^{-1}.s^{-1}$  (Solar *et al.*, 1984b)).

*La méthionine*

Contrairement aux acides aminés présentés ci-dessus, la méthionine ne dispose pas de cycle aromatique comme groupement caractéristique, mais d'un groupe thioéther (*Figure 2-30*).



*Figure 2-30 Structure de la Méthionine*

Les solutions de méthionine sont préparées dans de l'eau MilliQ, à une concentration correspondant à un temps de capture de 74 ns (1,6 mM, ( $k_{Met}^{HO} = 8,5 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$ ) (J. H. Lee & Tang, 1982)).

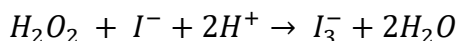
## F/ Les méthodes analytiques

### 1/ La radiolyse de l'eau

#### *L'eau oxygénée*

Les mesures de rendement d'eau oxygénée ou du radical hydroxyle passent toutes par une détermination de la quantité d'eau oxygénée en solution. Les analyses d'eau oxygénée ont été réalisées par le réactif de Ghormley (Ghormley & Hochanadel, 1954), qui repose sur la formation de triiodure ( $I_3^-$ ) par réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions iodures (*Equation 2-6*).

*Equation 2-6*



Le protocole analytique est le suivant : 0.5 mL de solution irradiée sont prélevés. A ce volume sont ajoutés 1 mL de B puis 1 mL de solution A.

La solution A est composée de KI à 0.4 M (large excès), d'heptamolybdate d'ammonium (0.17 mM, catalyseur de la réaction) et d'hydroxyde de sodium (NaOH, 0.05 M). La solution B est constituée d'hydrogénéphthalate de potassium (0.1 M). La présence de l'hydrogénéphthalate de potassium et de soude dans la solution finale et dans ces proportions (2/1) permet de se placer au pH optimal pour que la réaction de formation du triiodure ait lieu (pH).

$I_3^-$  ainsi formé est alors mesuré par spectroscopie UV-Vis à une longueur d'onde de 352 nm et quantifié via les coefficients d'absorptions molaires ( $\epsilon$ ) déterminés par l'analyse de solutions-étalon. Plusieurs tests ont été réalisés pour vérifier qu'aucune influence du solvant n'était observée sur les  $\epsilon$  et ce aux différentes concentrations utilisées lors de nos expériences.



Ce coefficient d'absorption molaire a été déterminé comme valant  $24100 \pm 500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , valeur comparée à différentes données de la littérature et tout à fait cohérente avec celles-ci (Fournier *et al.*, 1996; Gobert *et al.*, 2017; Guichardon & Falk, 2000; Pinot *et al.*, 2014).

Ces proportions ont par la suite été optimisées afin de disposer d'une meilleure sensibilité lors des analyses avec dilution moindre de la solution irradiée. Les tests réalisés nous ont permis de passer à des proportions de 1 volume de solution irradiée pour  $\frac{1}{2}$  volume des solutions A et B, passant d'une dilution par 5 à une dilution par 2. Ces proportions ne sont cependant pas adaptables partout, car le volume final devant être d'au minimum 1 mL pour réaliser les analyses dans les meilleures conditions. Ainsi, les premières proportions présentées ont parfois dû être maintenues.

#### *La sonde C3CA*

Les solutions irradiées de 3CCA (dans lesquelles se sont formées du 7-OH-3CCA) sont analysées par HPLC-Fluorescence. Les analyses sont réalisées en conditions isocratiques avec un éluant composé à 58% d'eau + 0.2 % d'acide formique et de 42% d'acétonitrile +0.1 % d'acide formique. Le flux est réglé à 1 mL/min avec une température de colonne à 20 °C. L'excitation pour la fluorescence est réglée à une longueur d'onde de 370 nm pour une émission à 440 nm. L'analyse dure au total 12 minutes, avec une élution du 7-OH-3CCA à 8 min et l'élution de la 3CCA à 10 min.

Les étalonnages sont réalisés avec un 7-OH-3CCA commercial analysé dans les mêmes conditions que les solutions irradiées.

#### *La sonde TA*

Les analyses sont ici également réalisées en HPLC-Fluorescence. Les conditions de séparations sont à nouveau isocratiques, avec cette fois-ci un éluant composé à 88% d'eau + 0.2 % d'acide acétique et de 12% d'acétonitrile +0.1 % d'acide acétique. Le flux est de 1 mL/min avec une température de colonne réglée à 20 °C. La longueur d'excitation est fixée à 323 nm pour une émission à 440 nm. L'analyse dure 12 minutes

Les étalonnages sont à nouveau réalisés avec un 2-OH-TA commercial analysé dans les mêmes conditions que les solutions irradiées.

## **2/ Les biomolécules protéiques**

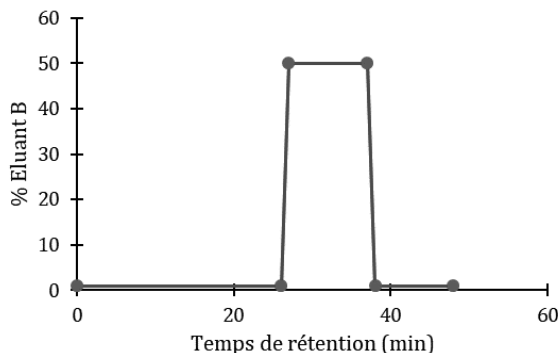
#### *La phénylalanine*

Les analyses sont réalisées dans une plage de 15 à 24h après irradiation, car les DOPA se forment lentement après les irradiations et atteignent leur concentration maximale après 15h d'attente avant de décroître 9h plus tard. Elles sont réalisées par HPLC-Fluorescence, à une température de colonne de 10°C et un flux réglé à 0.8 mL/min.

Les conditions d'élution sont renseignées dans le Tableau 2-9 (éluant A = eau + 0.2% acide acétique, B = Acétonitrile + 0.1 % acide acétique). La longueur d'onde d'émission est réglée à 310nm pour une excitation à 280 nm.

Tableau 2-9 Gradient d'élution des analyses de la phénylalanine

Temps de rétention (min)	% A	%B
0	99	1
26	99	1
27	50	50
37	50	50
38	99	1
48	99	1



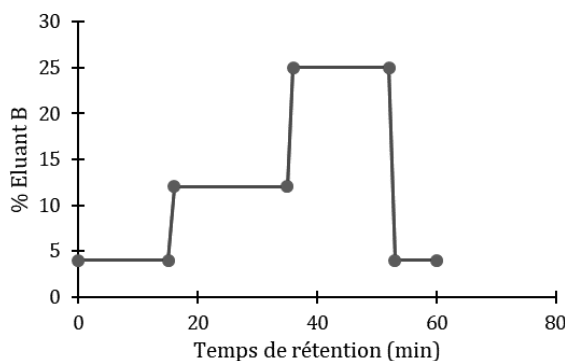
Comme les produits de radiolyse de la phénylalanine ne sont pas tous disponibles commercialement, les étalonnages ont été réalisés grâce au détecteur CAD de notre système HPLC. Des irradiations à des doses très élevées (au-delà de 1000 Gy) ont été réalisées par des protons de 2 MeV afin de former des produits de radiolyse en quantités suffisamment importantes pour être quantifiés par le détecteur CAD. Cette quantification absolue nous a alors permis d'étalonner le détecteur de fluorescence. Cette méthode a été validée par des étalonnages réalisés avec les produits commerciaux disponibles comparés aux étalonnages provenant du CAD.

*L'aspartame*

Tout comme la phénylalanine, les analogues aux DOPA issus de la radiolyse de l'aspartame se forment lentement, et atteignent ici un maximum au bout de 12h. Les analyses ont donc également été réalisées de façon systématique entre 12h et 24h après l'irradiation des solutions. Les analyses sont réalisées par HPLC-Fluorescence, à une température de colonne de 30°C et un flux réglé à 0.8 mL/min. Les conditions d'élution sont renseignées dans le Tableau 2-10 (éluant A = eau + 0.2% acide acétique, B = Acétonitrile + 0.1 % acide acétique). La longueur d'onde d'émission est réglée à 310nm pour une excitation à 280 nm. Les étalonnages ont été réalisés de la même façon que pour la phénylalanine, sans validation par des solutions commerciales en raison de leur indisponibilité.

Tableau 2-10 Gradient d'élution des analyses de l'Aspartame

Temps de rétention (min)	% A	%B
0.000	96	4
15	96	4
16	88	12
35	88	12
36	75	25
52	75	25
53	96	4
60	96	4

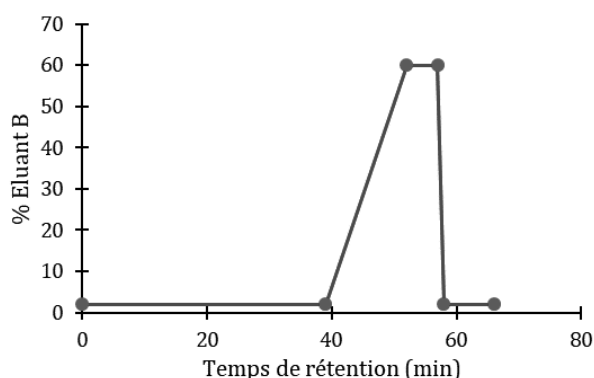


### Le tryptophane

Les analyses sont réalisées le plus rapidement possible après les irradiations. Elles sont réalisées par HPLC-DAD-Fluorescence, à une température de colonne de 10°C et un flux réglé à 0.7 mL/min. Les conditions d'élution sont renseignées dans le Tableau 2-11 (éluant A = eau + 0.2% acide acétique, B = Acétonitrile + 0.1 % acide acétique).

Tableau 2-11 Gradient d'élution des analyses du Tryptophane

Temps de rétention (min)	% A	%B
0	98	2
39	98	2
52	40	60
57	40	60
58	98	2
66	98	2



Peu des produits de radiolyse du tryptophane sont disponibles commercialement, les étalonnages ont donc également été réalisés grâce à l'universalité du détecteur CAD et confirmés par comparaison avec les quelques produits disponibles commercialement.

### La méthionine

Contrairement aux biomolécules présentées précédemment, la méthionine ne dispose pas de groupements chromophores et fluorophores la rendant suffisamment sensible pour les analyses HPLC-UV-Fluo, et ce n'est pas non plus le cas de ses produits de radiolyse.

De plus, l'absence de groupement apolaire important, comme c'était le cas pour les espèces précédentes avec leurs cycles aromatiques, rend sa rétention sur colonne C-18 compliquée. Une méthode permet cependant de combler ces deux difficultés analytiques : la dérivation.

Deux méthodes de dérivations différentes ont été utilisées pour l'analyse des échantillons irradiés de méthionine.

La première se fait par réaction avec le FMOC-Cl (Chlorure de fluorénylméthoxycarbonate, *Figure 2-31*), chlorure d'acyle capable de réagir avec les fonctions amines de la méthionine et de ses produits de radiolyse possédant toujours cette fonction chimique. Le FMOC-Cl étant un chlorure d'acyle très réactif, il peut réagir avec l'eau, et comme il doit être ajouté en large excès son produit de réaction avec l'eau pourrait perturber l'analyse HPLC. L'ajout de 1-adamantanamine (ADAM) est donc préconisé afin de stopper l'action du FMOC-Cl en réagissant avec ce dernier pour le consommer entièrement.

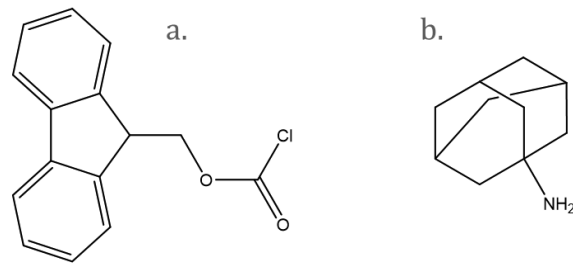


Figure 2-31 Structure Fmoc-Cl (a.) et de l'ADAM (b.)

Cependant, certains produits de radiolyse de la méthionine subissent une désamination lors de leur formation, rendant alors une dérivation par le Fmoc-Cl impossible. Parmi ces produits se trouve le méthional, aldéhyde important car un des produits majoritaires de la radiolyse de la méthionine. Afin de quantifier ce type de composés, une deuxième dérivation a été utilisée. Celle-ci se fait par réaction des produits de radiolyse avec de la DPNH (2,4-dinitrophénylhydrazine, *Figure 2-32*) qui réagit spécifiquement avec les groupements carbonyles des aldéhydes et cétones.

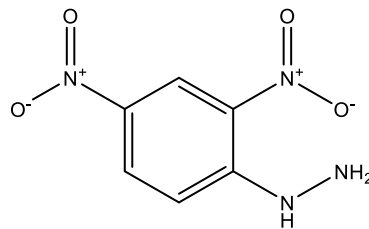


Figure 2-32 Structure de la DPNH

**Protocole de dérivation par le Fmoc-Cl :** 400  $\mu\text{L}$  de tampon Borate-HCl 50 mM sont ajoutés à 100  $\mu\text{L}$  de solution irradiée. Vient ensuite un ajout de 200  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile puis 200  $\mu\text{L}$  de Fmoc-Cl à 14 mM (28 équivalents de méthionine) fraîchement préparé dans de l'acétonitrile. L'ajout d'acétonitrile permet d'empêcher la précipitation du Fmoc-Cl lorsqu'il est en milieu trop polaire. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 minutes.

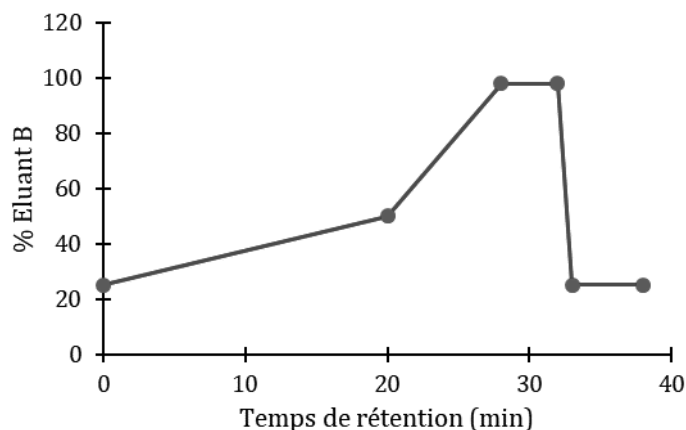
La 1-adamantanamine (ADAM) est alors introduite pour inhiber la réaction par un ajout de 200  $\mu\text{L}$  de solution à 298 mM (21,3 équivalents de Fmoc-Cl) préparée dans un mélange 50/50 v/v d'acétonitrile et de tampon Borate.

**Protocole analytique :** L'analyse est réalisée selon les conditions décrites dans le Tableau 2-12 (A=tampon acétate 10 mM ; B=acétonitrile)

La quantification est réalisée par le détecteur fluorescence réglée sur un  $\lambda_{\text{exc}}$  de 260 nm pour un  $\lambda_{\text{em}}$  de 310 nm. La séparation se fait à 20 degrés. L'étalonnage est réalisé via des poudres commerciales de sulfoxyde de méthionine et de sulfone dérivationnées dans les mêmes conditions que les échantillons irradiés.

Tableau 2-12 Gradient d'élution des analyses de la méthionine

Temps de rétention (min)	% A	%B
0	75	25
20	50	50
28	2	98
32	2	98
33	75	25
38	75	25



**Protocole de dérivatisation par la DNPH :** A 4 mL de solution irradiée sont ajoutés 1 mL de DNPH de concentration 10 mM ainsi qu'1  $\mu$ L d'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 1h30. L'analyse est alors rapidement réalisée en raison la faible stabilité des hydrazines formées (Cardoso *et al.*, 2003)

**Protocole analytique :** L'analyse est réalisée en HPLC-DAD avec détection à 365 nm. La séparation se fait en conditions isocratiques avec 60% d'acétonitrile et 40% d'eau. La colonne est maintenue à 20°C pendant la durée de l'analyse soit 15 minutes.



---

**Chapitre 3 - Utilisation de sondes moléculaires  
pour la mesure d'espèces de la radiolyse de  
l'eau**

---

## Abstract

Because of the technical difficulties to measure the radical species of water radiolysis directly (short-pulse radiolysis platforms, poor spectroscopic properties), molecular scavenging probes are extensively used for this purpose.

However, these molecular probes have potential limitations due to their chemical mechanisms involving relatively long-living intermediates that could be sensitive to the irradiation parameters and could cause bias in the measurements. This third chapter of my thesis manuscript will focus on the use of these probes in order to measure water radiolysis species.

First, an important discussion of molecular probes for HO• measurements will be held, especially in a context of high dose-rates. We investigated three probes, C3CA (Coumarin-3-Carboxylic Acid), TA (Terephthalate ion from sodium terephthalate) and the KBr/formate probe system. We found that only the third one can be used to accurately represent the evolution of G(HO•) as a function of the dose-rate as its mechanisms are not affected by this parameter. We also observed that the TA probe is very sensitive to a change in the LET of the ionizing radiation.

Then the second part will be dedicated to hydrogen peroxide, a species who is stable enough to be measured without being scavenged. However, as it is formed by recombination of hydroxyl radical, the kinetic of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is studied by scavenging HO• at different scavenging times. Several products can be used for this purpose, and the selection of one of those will be achieved for further experiments.

Finally, we propose here a novel method for the indirect measurement of hydrated electron, in aerated conditions. Despite its limit at scavenging times above 300 ns, preliminary results are really promising with a very good agreement with data from literature at short scavenging times.



Les espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau, et notamment le radical hydroxyle, possèdent une durée de vie extrêmement faible, disparaissant totalement de la solution après quelques millisecondes suite à des réactions de recombinaisons. HO• possède de plus des propriétés spectroscopiques le rendant difficilement détectable. La mesure directe de ce radical nécessite ainsi de passer par la radiolyse pulsée et des moyens techniques très importants pour le mesurer directement après une impulsion de rayonnement.

Une stratégie de mesure est l'utilisation de **sondes moléculaires**, qui est celle qui a été choisie dans ces travaux.

Le principe de cette méthode de mesure est d'utiliser des espèces moléculaires qui vont réagir avec le radical hydroxyle avec un rendement de réaction connu pour former une espèce suffisamment stable pour être analysée post-irradiation. Cette méthode permet donc d'avoir une marge de manœuvre beaucoup plus importante pour réaliser les analyses, allant de plusieurs heures à plusieurs jours après irradiation selon la sonde utilisée, avec parfois un gain considérable en termes de sensibilité.

Le paramètre de la concentration des sondes en solution est crucial, car intrinsèquement lié à une grandeur caractéristique de la mesure des espèces issues de la radiolyse de l'eau : le temps de capture. Cette notion est expliquée dans le Chapitre 1, et est présentée à nouveau dans l'*Equation 3-1*.

$$\text{Equation 3-1} \quad t_s = \frac{1}{k_x^{HO} \times [x]}$$

Cette relation implique donc qu'il est possible de reconstituer expérimentalement l'évolution temporelle du rendement du radical, c'est-à-dire sa cinétique. Ceci peut se réaliser par des mesures statiques, en faisant varier la concentration de la sonde pour obtenir des rendements à différents temps de capture.

Un équivalent de cette grandeur est souvent utilisé dans la littérature, le « pouvoir de capture » (*Scavenging power*) et correspond simplement à l'inverse du temps de capture (*Equation 3-2*)

$$\text{Equation 3-2} \quad S_p = k_x^{HO} \times [x]$$

## **A/ Determination of a scavenging probe suitable to investigate dose-rate effects on HO•**

The following part is written in English as it comes from an ongoing paper "Dose-rate effect on hydroxyl radical: investigating the use of molecular scavenging probes"

### **1/ Quantification of HO• with molecular probes**

In the present study, the yields of formation of hydroxyl radical were determined under irradiation by X-rays and proton beams by indirect methods, using scavengers, also mentioned as probes.

Scavengers react with HO radical to yield specific stable products, quantified by analytical methods. When the rate of formation of the product is known, the radiolytic yield of HO is deduced from its quantification. The validity of the indirect method is based on the fact that the probe reacts readily with OH radicals and that the derivatives are stable under the attack of highly reactive HO radicals. The radiolytic yield is a measure of the quantity of molecules formed or degraded, per unit of energy deposited. It is usually expressed as a number of species formed for 100 eV deposited (*Equation 3-3*).

$$\text{Equation 3-3} \quad G = 100 \cdot \frac{N_{\text{species}}}{E_{\text{deposited}}} \quad G \text{ in species / 100 eV}$$

### C3CA probe

C3CA is a probe specific to HO<sup>•</sup>, which has already been used in several studies (Baldacchino et al., 2009; Collins et al., 1994; Maeyama, Yamashita, Baldacchino, et al., 2011; Yamashita et al., 2012). It reacts with the radical to form highly fluorescent 7-OH-C3CA (*Figure 3-1*), among several other mono-hydroxylated products (Loui et al., 2005). Despite its low formation yield ( $y = 4.7 \pm 0.6 \%$  (Maeyama, Yamashita, Baldacchino, et al., 2011)), the high fluorescence quantum yield of 7-OH-C3CA makes it a very sensitive probe. However, although the yield of formation of 7-OH-C3CA has been shown to be independent of the Linear Energy Transfer (LET) of ionizing particles, several teams have identified dose-rate effects on the yield of formation of 7-OH-C3CA (Kusumoto et al., 2020, 2022; Precek et al., 2022).

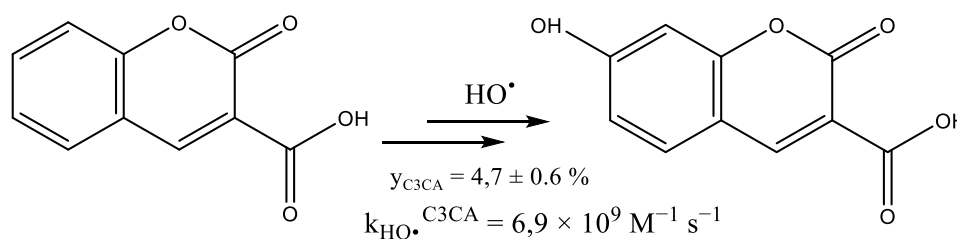
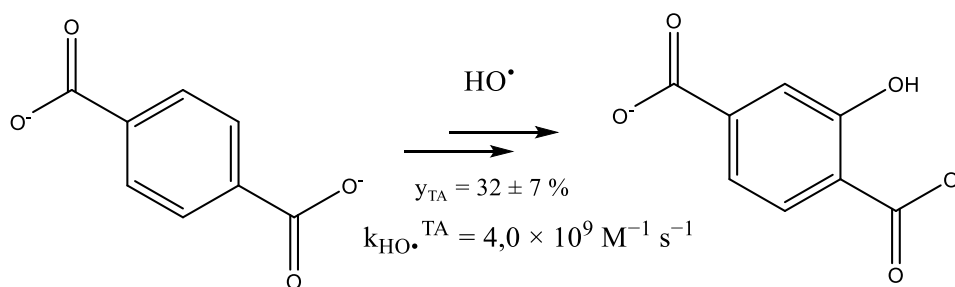


Figure 3-1 Reaction scheme of C3CA with hydroxyl radical to form 7-OH-C3CA (Yamashita et al., 2012)

### Terephthalate probe

Sodium terephthalate (TA) reacts with hydroxyl radical to form the 2-OH-TA (*Figure 3-2*). The yield reported for the reaction is  $y = 32 \pm 7\%$  (Charbouillot et al., 2011; Gonzalez et al., 2018; Page et al., 2010), higher than for C3CA reaction as any of the four available positions for HO addition leads to the formation of the same product, by symmetry. This higher yield, combined with a high fluorescence yield of 2-OH-TA, makes TA a very sensitive probe.

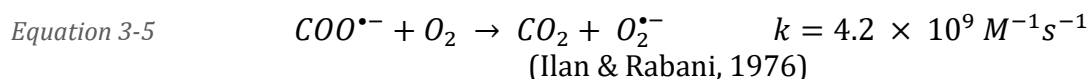
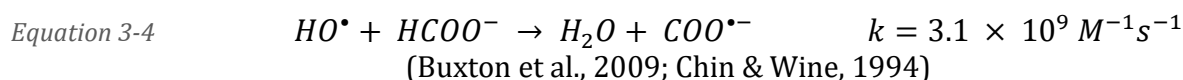


**Figure 3-2** Reaction scheme of TA anion with hydroxyl radical to form 2-OH-TA (Page *et al.*, 2010)

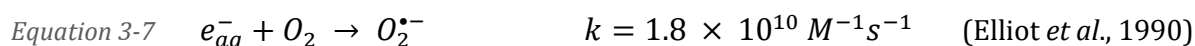
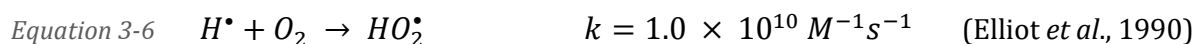
C3CA and TA probes have similar mechanisms of reaction with  $\text{HO}^\bullet$ , involving the action of  $\text{O}_2$  and formation of reaction intermediates that have relatively long lifetimes compared to water radiolysis species.

#### KBr/Formate probe system

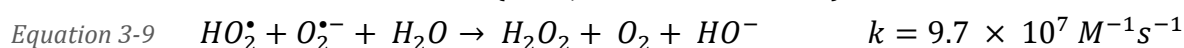
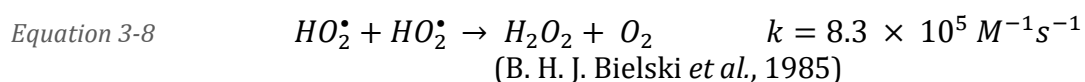
Two aerated solutions of sodium formate and KBr were used also for  $\text{HO}^\bullet$  measurements, as previously described by Yamashita *et al.* and Appleby *et al.* (Appleby & Christman, 1985; Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008a).  $\text{HO}^\bullet$  quantities are determined from that of hydrogen peroxide  $\text{H}_2\text{O}_2$  formed in both solutions. Formate anion reacts with hydroxyl radical to form the formate radical ( $\text{COO}^{\bullet-}$ ) (Equation 3-4) which will then react with dioxygen to yield superoxide radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Equation 3-5).



$\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{HO}_2^\bullet$  will form in aerated conditions also by reaction of  $\text{e}_{\text{aq}}^-$  and  $\text{H}^\bullet$  respectively with dissolved  $\text{O}_2$  (Equations 3-6 and 3-7).

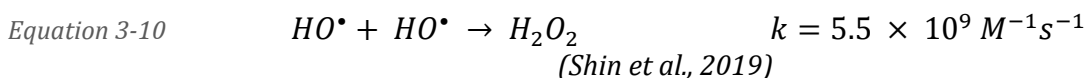


Disproportionation of  $\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-}$  can then occur to form hydrogen peroxide by the two following reactions (Equation 3-8 Equation 3-9) with a clear predominance of reaction 3-9. Dismutation of  $\text{O}_2^{\bullet-}$  occurs with a much lower rate constant of  $0.3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (B. H. J. Bielski & Allen, 1977; Rabani & Nielsen, 1969).

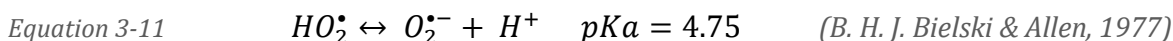


(B. H. J. Bielski *et al.*, 1985)

Hydrogen peroxide is also formed by reaction of HO• with itself (*Equation 3-10*).



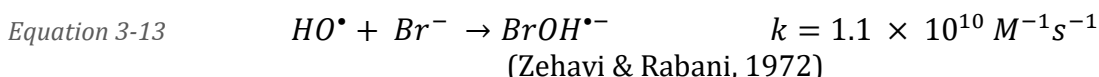
It is worth noting that acid-base equilibrium exists between  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{HO}_2^\bullet$  (*3-11*). This equilibrium is the reason of the relative slowness of reaction (*3-9*).



Considering the reactions above, the yield of hydrogen peroxide in formate solutions can be expressed as follows:

$$\text{Equation 3-12} \quad G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Formate}} = g(\text{H}_2\text{O}_2) + \frac{1}{2} [g(e_{aq}^-) + g(\text{H}^\bullet) + g(\text{O}_2^{\bullet-}) + g(\text{HO}_2^\bullet)] + \frac{1}{2} g(\text{HO}^\bullet)$$

In potassium bromide solutions, HO• is readily scavenged by Br<sup>-</sup> (*3-13*).



Competition between reactions *3-10* and *3-13* leads to a decrease of hydrogen peroxide yield. Therefore, in KBr solutions, the yield of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed can be expressed as:

$$\text{Equation 3-14} \quad G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{KBr}} = g(\text{H}_2\text{O}_2) + \frac{1}{2} [g(e_{aq}^-) + g(\text{H}^\bullet) + g(\text{O}_2^{\bullet-}) + g(\text{HO}_2^\bullet)] - \frac{1}{2} g(\text{HO}^\bullet)$$

The yield of hydroxyl radical is determined by *Equation 3-15* from that of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measured in both solutions:

$$\text{Equation 3-15} \quad G(\text{HO}^\bullet) = G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Formate}} - G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{KBr}}$$

(*Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008a*)

In the remainder of this article, the system consisting of KBr and formate solutions will be referred to as KBr/formate probe.

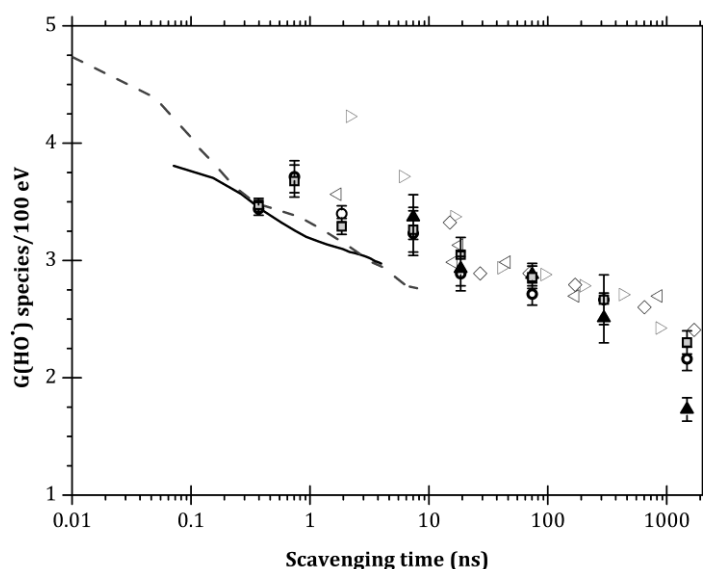
## 2/ Benchmarking of the probes

In pure water, HO• reacts quickly with itself, hydrated electron or other species. Therefore, its quantity decreases rapidly with time, within a few hundreds of ns. Therefore, comparison of yields must be conducted at similar times after the radiation-matter interaction.

The time evolution of HO• yield can be measured directly with pulsed radiolysis, or reconstructed by steady state measurements with scavenging probes of various concentrations.

Scavenging time represents here the average reaction time of a probe with HO•. It varies as the inverse of the scavenging capacity,  $k \times [\text{probe}]$ , with  $k$  being the kinetic constant of the reaction (*Equation 3-1*)

Kinetics of HO radiolytic yields have been well described in the literature with gamma rays, X-rays or electrons. Therefore, in order to benchmark the probes used in this study, we used them to determine the kinetics of HO• under 6 MeV X-rays irradiation, at conventional dose-rate (CONV, 0.1 Gy/s). Similar scavenging capacities were used for C3CA, TA and KBr/formate, to reconstruct the time evolution of the radical yield between about 0.4 ns and 1500 ns.



**Figure 3-3** Yield of hydroxyl radical as a function of the scavenging time. Black triangles, open circles and squares are this work's data under 6 MeV X-rays irradiations, measured with C3CA, KBr/Formate and terephthalate respectively (error bars estimated from duplicates of experiments). Grey data points of  $\diamond$  are data from Baldacchino et al. (2009),  $\triangle$  are from LaVerne et al. (2000) and  $\triangleleft$  are from Draganic et al. (1973) obtained either by gamma irradiations or high-energy electrons irradiations and measured by molecular probes (Baldacchino et al., 2009; Z. D. Draganic & Draganic, 1973; LaVerne, 2000). Dashed lines are from Wang et al. (2018) and solid lines from El Omar et al. (2011) which are direct measurements of hydroxyl radical under fast electrons (7 MeV) irradiations (El Omar et al., 2011c; Wang et al., 2018).

As shown in *Figure 3-3*, all three probes gave very similar results, with excellent reproducibility. Hydroxyl radiolytic yield decreases with time, as a result of fast radical-radical recombination in spurs. The yield of formation of 2-OH-TA from terephthalate is described in the literature with quite high uncertainty ( $32 \pm 7\%$ ), related to various experimental conditions. It was re-evaluated from our data at 35 % for data self-consistency.

Our results are also in good agreement with published datasets obtained with molecular probes (C3CA, sodium formate and formic acid) as well as pulse radiolysis direct measurements, under irradiation by gamma rays or high energy electrons (Baldacchino et al., 2009; Z. D. Draganic & Draganic, 1973; El Omar et al., 2011c; LaVerne, 2000; Wang et al., 2018).

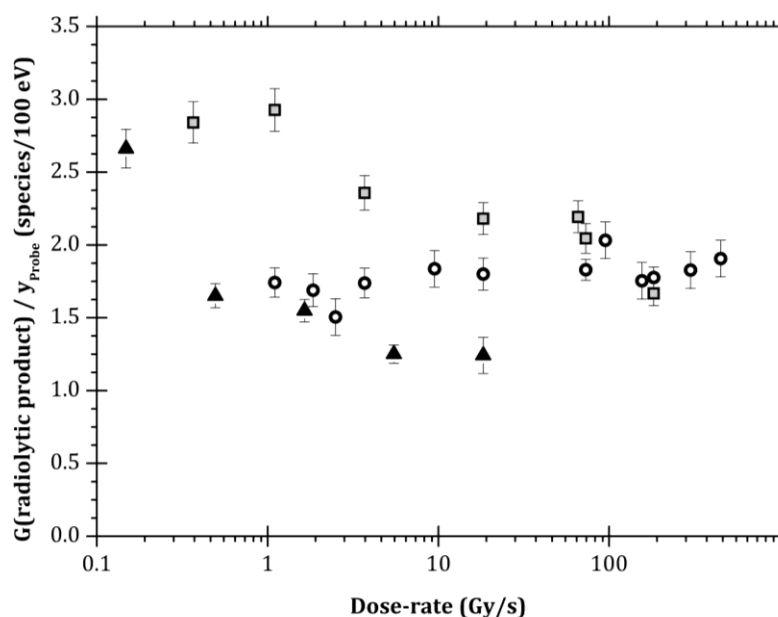
This validates the use of these probes for an accurate measurement of OH radical at various scavenging times, at conventional dose-rate and with low-LET particles.

It is worth noting that the kinetic determined in the present study is the first carried out using the KBr/formate probe, all literature data with this probe system having been acquired at a single scavenging time of about 100 ns. For the TA probe, although it has been used at different concentrations, it has never been directly correlated to the evolution of  $G(\text{HO}\cdot)$  through time. It makes our result the first kinetic with this probe.

### 3/ Irradiation by 24 MeV protons

#### *Dose rate effect - Integral yields*

A 1 cm thick cell was used for irradiations, in which protons deposit all their energy, due to their short range of penetration in water of only 6 mm at 24 MeV. Hydroxyl radical yields measured under these conditions are thus *track-average*, or *integral* yields along ion track, from the initial energy to after the Bragg peak. *Track-average* yields were estimated from the three probes KBr/formate, TA and C3CA, under irradiation by 24 MeV protons, at various dose-rates and identical scavenging time of 74 ns. *Figure 3-4* shows their evolution with dose-rate, when conversion yields used with low dose-rate X-Rays irradiations are considered.



**Figure 3-4** Evolution of Radiolytic track-average HO yields (assuming a constant production rate for the organic probes corresponding to the one determined under 6 MeV X-rays at low dose-rate) at a scavenging time of 74 ns as a function of the dose-rate for the three scavenging probes. Black triangles are C3CA, black open circles are KBr/formate and grey-filled squares are TA.

The y axis of the figure represents the yield of the radiolytic products divided by their formation rate determined under 6 MeV X-rays at low dose-rate. This is rigorously what was measured during our experiments, and should correspond to HO radiolytic yields for a constant production rate over the range of investigated dose-rates.

Under these conditions (*track-average yields*), evolutions of the yields with the dose rate differ significantly from one probe to another.

A sharp decrease occurred for C3CA, from 2.66 at 0.15 Gy/s to a plateau at about 1.24 spe/100 eV above 5 Gy/s. Radiolytic yields determined with TA also decrease above 1 Gy/s from 2.84 at 0.15 Gy/s to 1.67 spe/100eV at 183 Gy/s.

By contrast, yields determined using KBr/formate probe system remain constant, around  $1.80 \pm 0.16$  spe/100eV for the entire dose-rate range investigated (0.15 to 450 Gy/s). Experiments with this system were reproduced three times to check reproducibility, and variations did not exceed 10 %.

#### *Dose-rate effects - Track-segment yields*

*Track-segment* yield, noted  $G'$ , corresponds to the yield for an infinitesimal energy loss and a constant LET value. To measure it directly, thin polyethylene vials were used, so that most of the energy is deposited by 24 MeV protons in the plateau region. Experiments were conducted at various dose-rates, with the three probes, and a scavenging time of 74 ns. Track-segment-yields can also be estimated by derivation from number of species formed per ion  $N_{HO^{\bullet}/ion}$ , measured at various initial energies  $E_0$ :

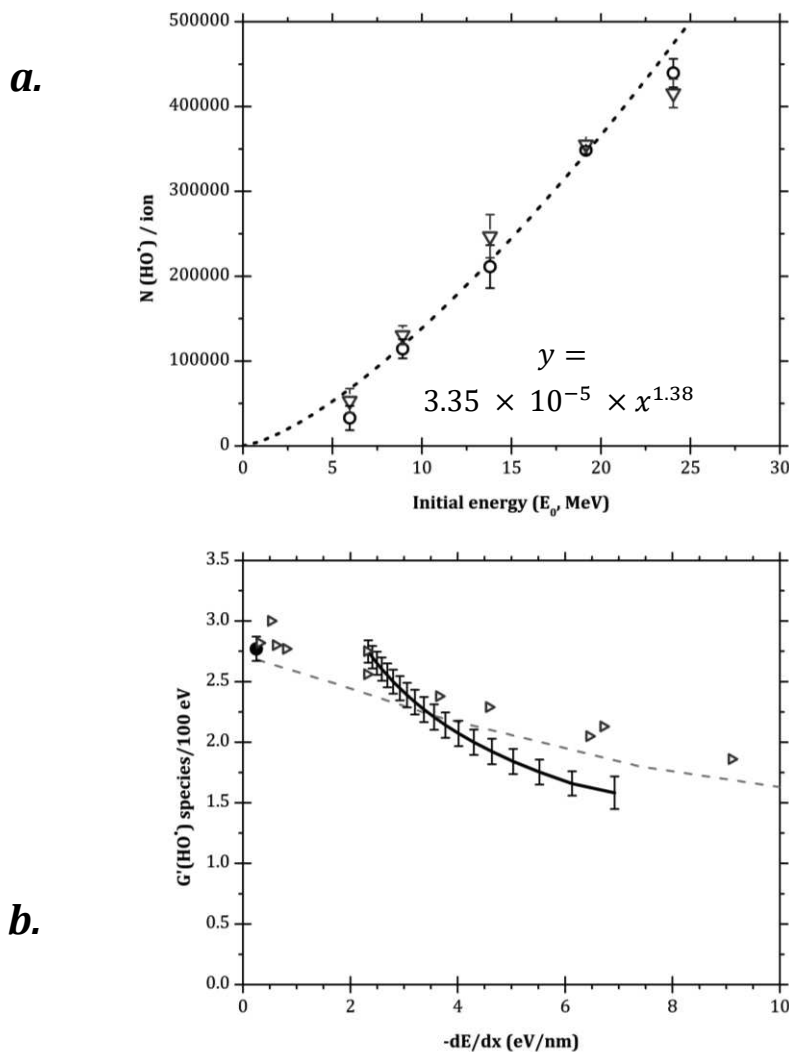
Equation 3-16

$$N_{HO^{\bullet}/ion} = \frac{1}{100} \times \int_0^{E_0} G' \cdot dE \Rightarrow G' = 100 \times \frac{dN_{HO^{\bullet}/ion}}{dE} \quad (\text{LaVerne, 1989})$$

This was done with KBr/formate at 180 Gy/s and 18 Gy/s.

*Figure 3-5a.* presents the evolution of the number of HO radical per ion as a function of the initial energy of the protons, for the two different dose-rates. There is no observed dose-rate effect regardless of the proton energy. Therefore, *track-segment* yields were estimated from both data sets, for LETs corresponding to proton energies between 5.9 and 24 MeV (*Figure 3-5b*).

The decrease of  $G'$  with LET of the particle is caused by increased intra-tracks radical-radical reactions with higher density of energy deposition. As expected, at low LET, HO $\bullet$  yields are close to that measured in this work with X-rays and those described in literature with photons or high energy electrons and ions, and even Monte Carlo simulations (Maeyama, Yamashita, Baldacchino, et al., 2011; Shin et al., 2019)

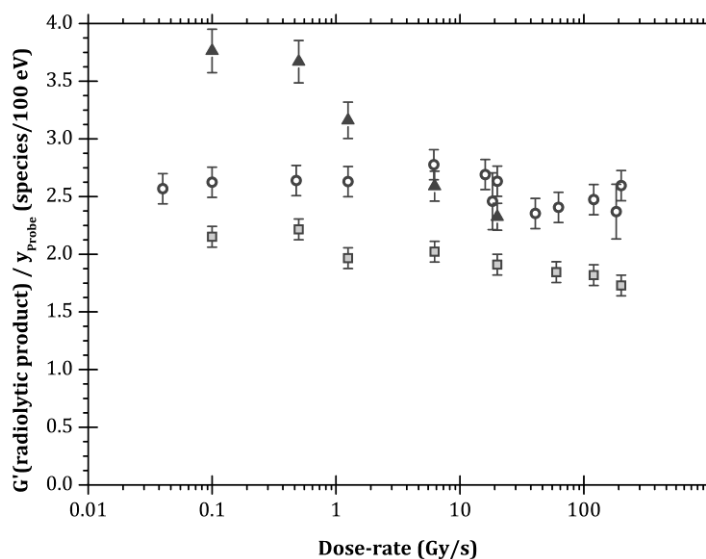


**Figure 3-5a.** Evolution of the number of HO radical species per ion measured with KBr/Formate probe system as a function of the initial energy of the proton beam. Circles are data points calculated from track-average yields and the continuous line is the mathematical fit for a dose-rate of 180 Gy/s. Open triangles are data for a dose-rate of 18 Gy/s and the dashed line its mathematical fit.

**Fig. 3-5b.** Evolution of HO radical differential yield measured with KBr/Formate probe system as a function of the LET (-dE/dx). ● is yield obtained with 6 MeV X-rays, continuous line are differential yields at dose-rates 180 Gy/s and 18 Gy/s. Grey dashed line is Monte-Carlo simulations with Geant4-DNA(Shin et al., 2019), open triangles are from Maeyama et al. (2011)(Maeyama, Yamashita, Baldacchino, et al., 2011)

Figure 3-6 represents the evolution of *track-segment* yields estimated with C3CA, TA, and KBr/formate at 24 MeV.  $G'(\text{HO}\cdot)$  estimated from C3CA decreases significantly with dose-rate, as for *track-average* yields, with low dose-rate yields higher than those obtained with X-rays. These results are consistent with previous data obtained in similar conditions (Kusumoto et al., 2020). Unlike *track-average* yields,  $G'$  values derived from TA probe show a slight and continuous decrease over the investigated range. They are lower than reported values of 2.5-2.6 species/100 eV for protons of an average LET of 3 eV/nm (Alanazi et al., 2020; Burns & Sims, 1981; LaVerne, 2000), indicating that the production rate, which was determined  $y = 35\%$  with X-Rays, most likely varies with LET.



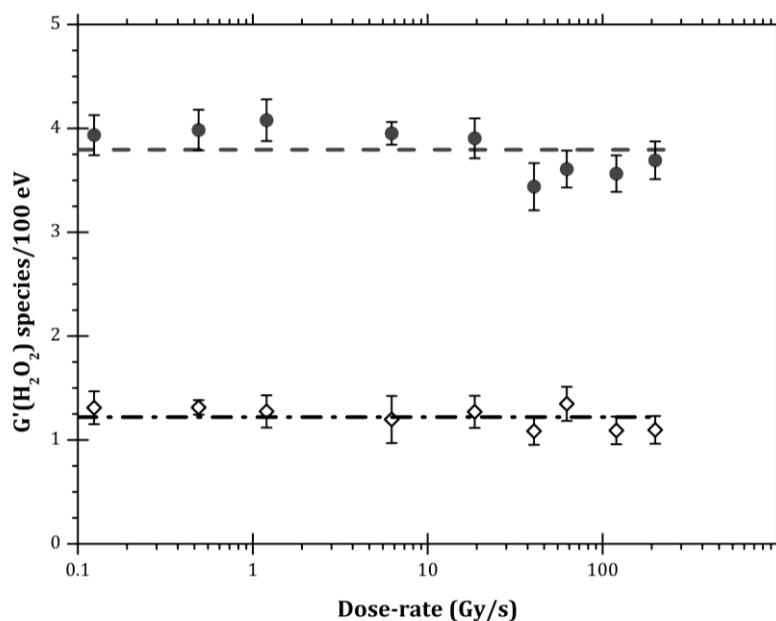


**Figure 3-6** Evolution of Radiolytic track-segment HO yields (assuming a constant production rate for the organic probes corresponding to the one determined under 6 MeV X-rays at low dose-rate) at a scavenging time of 74 ns as a function of the dose-rate for the three scavenging probes. Grey triangles are C3CA, grey open circles are KBr/formate and light grey-filled squares are TA.

As for *track-average* yields, *track-segment* yields measured with KBr/formate hardly vary with LET, and well agree with literature data at similar LET and scavenging times.

*Track-segment* yields measured by differentiation are very similar to those measured directly, which validates the possibility of using either of the two methods to measure them.

Furthermore, concerning the KBr/Formate probe system, not only the radiolytic yields of HO• but also the measured hydrogen peroxide yields in both solutions remained constant over the investigated dose-rate range (Figure 3-7).



**Figure 3-7** Evolution of global track-segment hydrogen peroxide yield as a function of the dose-rate under 24 MeV protons in formate solutions (●) and in bromide solutions (◊). Dashed lines are guides to show the stability of the trend.

Three molecular scavengers or combinations of scavengers were used to probe HO• yields at various dose-rates under proton irradiation, showing quite different behaviors. The kinetics reconstructed under 6 MeV X-rays irradiation have confirmed the validity of these probes for measuring HO radical at various scavenging times, in good agreement with previous determinations, either with molecular probes or by pulsed radiolysis. While C3CA had already been used for similar experiments with gamma rays, this is the first description with KBr/Formate and TA and on quite wide temporal width of 0.4 – 1500 ns (Baldacchino *et al.*, 2009). It allowed reevaluation of formation yield of 2-OH-TA from reaction of TA with HO• at 35 % under these conditions.

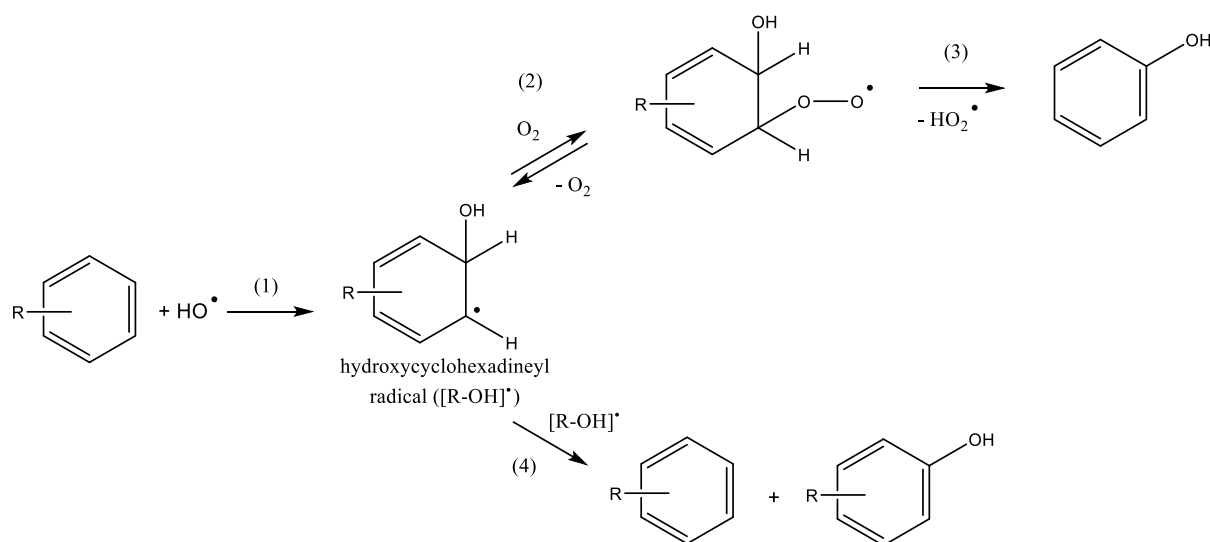
For experiments with protons, probes concentrations were adapted to reach a common scavenging time of 74 ns for all experiments. This scavenging time is well-documented in the literature for data comparisons and corresponds to the end of the inhomogeneous chemistry stage. Moreover, 74 ns corresponds to a period at which no dose-rate effect on HO• yield would be expected, according to published simulations at various dose-rates. Watanabe *et al.* studied dose-rate effect by Monte Carlo simulation of radiolysis with electrons of 100 eV – 1 MeV energies, by varying the dose given “instantaneously”. (R. Watanabe & Saito, 2001)

Under these conditions, they describe a dose-rate effect above  $10^{-8}$  s, which becomes significant close to  $10^{-7}$  s. According to Alanazi *et al.*, Monte-Carlo simulations with 300 MeV H<sup>+</sup>, dose-rate effect should not be observed below  $5.10^7$  Gy/s under deaerated conditions, as species formed in one track would not diffuse enough to meet species of neighboring tracks. (Alanazi *et al.*, 2021) With protons of lower energy and in aerated conditions where  $e_{aq}^-$  is scavenged by O<sub>2</sub>, one should expect dose-rate effect to occur at an even higher dose-rate, orders of magnitude from those used in this work. Therefore, scavenging time of 74 ns was chosen to assess eventual dose-rate effects on probe mechanisms. Data from *Figure 3-4* show strong variations of the yields determined with C3CA and TA between conventional dose-rate and above 400 Gy/s.

As previously mentioned, organic scavenging probes as C3CA, but also TA, goes through complex mechanisms involving several steps and pathways. Addition of HO• on a benzene ring follows the mechanism depicted below (*Figure 3-8*), which can apply to both C3CA and TA (Louit *et al.*, 2005; Precek *et al.*, 2022; Yamashita *et al.*, 2012).

Several studies reported a significant influence of the dose-rate on the radiolysis of C3CA, whether with ions (Kusumoto *et al.*, 2020, 2022) or pulsed electrons (Precek *et al.*, 2022). One hypothesis was that pathway (2) would be reduced, due to oxygen depletion at high dose-rate, to the benefit of pathway (4), which gives oxygenated products with a lower yield by disproportionation. Recent publications have shown that with doses lower than 200 Gy, oxygen consumption is most likely not sufficient to explain differences in the measured yields (Jansen *et al.*, 2021; Kusumoto *et al.*, 2022). Under aerated conditions, such as the ones used in this study,  $e_{aq}^-$  is efficiently trapped by dissolved O<sub>2</sub>. To estimate the fluctuations of conversion yield  $y_{C3CA}$  with oxygen, while keeping  $e_{aq}^-$  trapping, we reconstructed a kinetic with C3CA after bubbling the solution with pure O<sub>2</sub>.

HO• radiolytic yields measured were identical to that measured in aerated conditions, within the experimental uncertainty (*Annexe 5*), thus showing little influence of O<sub>2</sub> fluctuations on the mechanism.



**Figure 3-8** Reaction scheme of a HO• addition on the aromatic ring of TA and C3CA leading to the formation of mono-oxygenated products.

(Precek *et al.*, 2022) interpreted that the disproportionation pathway is favoured over reaction with dioxygen considering relative rate constants of the different steps involved in the radiolysis mechanism. Based on Fang *et al.* (Fang *et al.*, 1995, 1996), they proposed that the presence of electron withdrawing groups on the C3CA would lead to low rate constants for steps (2) and (3), making C3CA very sensitive to dose-rate increase, with accumulation of hydroxycyclohexadienyl radical that would then disproportionate rather than react with oxygen.

Conclusions of these studies were that this effect could be related to the existence of  $\mu$ s-lifetime radical intermediates, quite long compared to the processes of water radiolysis. As for TA, a significant dose-rate effect is observed with *track-average* yields (*Figure 3-4*), and a very moderate one with *track-segment* yields measured. The lower HO• average yield measured, compared to KBr/formate and literature, can be attributed to protons LET, rather than dose-rate effect, as it is also observed at low dose-rate. It must be noted that the yield of formation of 2-OH-TA as a function of the LET has never been studied. The validity of  $y_{TA} = 35\%$  determined by using low-LET photons as radiation source is questionable for higher LET particles.

Such LET effect on TA mechanism could also explain the different behaviours observed between *track-segment* and *track-average* yields. *Track-average* yields are measured along the whole path of ions, including Bragg peak, where LET sharply increases, while *track-segment*-yields are measured in the low-LET plateau (LET= 3.0 eV/nm). The important decrease of *track-average* yields with dose-rate, compared to *track-segment* yields, shows that TA conversion yield is particularly affected by dose-rate at high-LET. This would also explain why Precek *et al.* did not observe any dose-rate effect with TA under electron irradiation (Precek *et al.*, 2022).

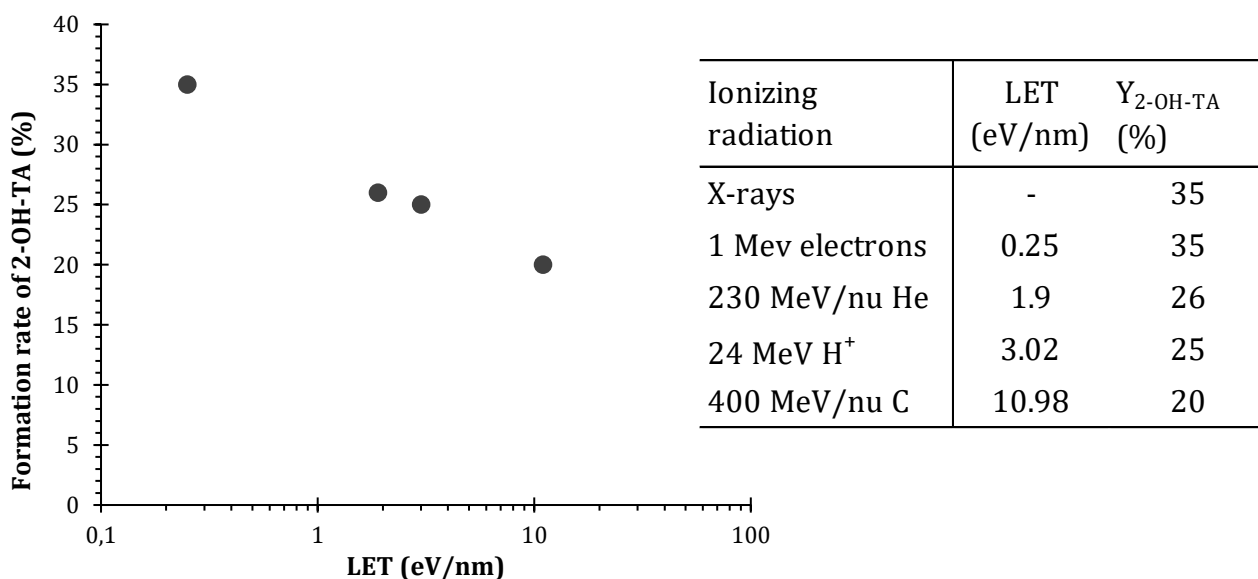
It is worth mentioning that in this pulsed radiolysis study, electrons were delivered in *ps*-pulses, with TGy/s doses rates, which could also explain differences in the effect observed with 24 MeV protons produced in 85 MHz pulses.

In order to better understand how dose-rate affect TA radiolysis mechanisms, solutions were analyzed by LC-MS after irradiation with X-rays, and protons at various dose-rates. Di-oxygenated product (OH)<sub>2</sub>-TA was identified, formed in lower quantities with X-rays compared with protons of similar dose-rates (0.4 Gy/s). The relative quantity of di-oxygenated product, compared to 2-OH-TA, increases continuously with dose-rate. Such product can be compared to 2,5-di-hydroxy phenylalanine (2,5-DOPA), that forms at high LET by radiolysis of aromatic amino acid phenylalanine (Ludwig *et al.*, 2018). 2,5-DOPA forms by reaction with long-lived superoxide radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, which could be also the case with TA, explaining dose-rate and LET effects observed. It would lead to a shift of the mechanism towards the formation of non-fluorescent, in our analytical conditions, di-oxygenated product. As for C3CA, a kinetic was reconstructed after bubbling of TA solutions with pure O<sub>2</sub>. Conversion yield  $y_{TA}$  was quite modified, rising from 35 % in aerated conditions to 40 % under O<sub>2</sub>, indicating a more pronounced sensibility of the radiolysis mechanism to oxygen concentration than for C3CA.

TA probe was also studied as a function of the LET to determine if the formation rate of 2-OH-TA (noted  $Y_{2-OH-TA}$ ) is constant when changing the LET as it has been proven for the C3CA probe.

$G'(HO\bullet)$ , the differential yield of hydroxyl radical, was then measured under different irradiation conditions at low dose-rate, as we observed a major effect of this parameter on this probe. We did those measurements on the platforms allowing CONV dose-rates: under X-rays at ICANS, 1 MeV electrons at Aerial-CRT, 24 MeV protons at CYRCé, 230 MeV/nu He ions and finally 400 MeV/nu C ions at HIMAC (Physics room and Bioroom).

Obtained results are presented in *Figure 3-9*. LET from the 1 MeV electrons were calculated from their measured penetration depth. Ions LETs were obtained by SRIM calculations (Ziegler *et al.*, 2010).



*Figure 3-9 Evolution of the formation rate of 2-OH-TA at 74 ns as a function of the LET.*

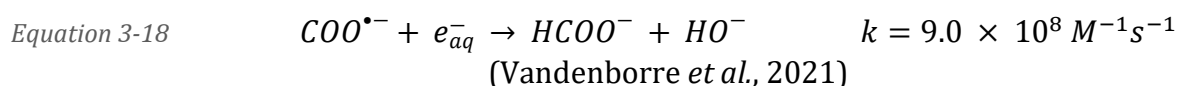
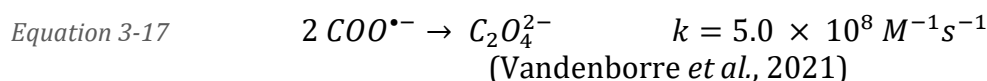
It appears very clearly that the LET has an important effect on the yield of formation of 2-OH-TA after reaction of TA with HO•, with a decreasing yield when increasing the LET. Similar observations were made when modifying the dose-rate. This means that a general change in the radicals density in the solution, whether it is by changing the LET or the dose-rate, strongly impact this probe.

Despite its excellent sensitivity the TA probe shows too much weaknesses when changing the parameters we aim at studying in this PhD work. In order to confidently measure HO• yields with this probe it should be calibrated in every single condition.

Dose-rate effects observed with C3CA and TA show that these probes are most likely unfit for accurate determination of HO• yields at high dose-rate with protons.

Regarding KBr/formate probe system, *track-average* and *track-segment* yields remain stable over the whole range of dose-rates 0.04 Gy/s to 450 Gy/s (*Figure 3-6* and *Figure 3-4*), in very good agreement with literature for *track-segment* yields of similar LET ions. If the reaction mechanisms of formate or Br• with HO• to give H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were affected by dose-rate, such stability of the yields measured could only be explained by dose-rate effect on HO• radical itself in proportions that would exactly compensate the modifications of the probe mechanisms, which seems virtually impossible. Probes mechanisms involve diffusion-limited quantitative reactions (1-10) up to the formation of O<sub>2</sub>•, which ultimately gives H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by dismutation as shown in in equations (2-11). Contrary to C3CA and TA, formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> does not involve alternative pathways in the mechanisms, such as competition of reaction with dioxygen and dismutation between two probe radicals, and is therefore less prone to be affected by the radiolysis conditions.

Previous studies from (Vandenborre *et al.*, 2021) and (Horne *et al.*, 2020) investigated the radiation chemistry of formate solutions. Indeed, a potential dose-rate effect in this solution could exist, because the mechanism of formation of hydrogen peroxide still goes through several steps even if there is no different branches. Particularly, COO•<sup>-</sup> radical could react with itself to form oxalate according to *Equation 3-17* or with e<sub>aq</sub><sup>-</sup> according to *Equation 3-18*.



However, the rate constants of these reactions are smaller than the rate-constant of the reaction of COO•<sup>-</sup> with O<sub>2</sub> ((3),  $k = 4.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Ilan & Rabani, 1976)) and involves products present in low concentration compared to dioxygen. Then, these reactions are very unlikely to occur. Horne *et al.* demonstrated that oxalate production appeared only at high doses (~1000 Gy) under gamma irradiations and in sealed conditions where oxygen was consumed. Under aerated conditions, no oxalate production was observed.

Moreover, as it is shown in *Figure 3-7*, the global yield of hydrogen peroxide measured in both formate and bromide solutions was stable for the entire dose-rate range investigated, and not only the yield of hydroxyl radical deduced from these measurements. This shows that no consumption of  $COO^{\bullet-}$  from reactions (17) or (18) is observed since it would lead to a decrease in the radiolytic yields of  $H_2O_2$ . While dioxygen is involved in the formate reaction pathway, it is not significantly depleted under doses used (50-150 Gy), as discussed above. Furthermore, when kinetics of radiolytic yields were reconstructed under pure  $O_2$ , no effect whatsoever on  $G(HO^{\bullet})$  was observed, indicating a limited impact of oxygen concentration on probe conversion yield.

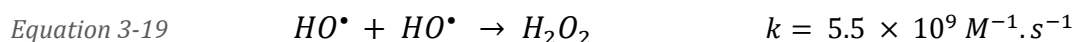
Measuring HO radical by indirect methods requires a good knowledge of the intermediate mechanisms, which can be affected by the radiolysis conditions. The aim of this work was to study the behavior of three  $HO^{\bullet}$  molecular probes with dose-rate under protons irradiation, and to identify eventual dose-rate effect on HO radical. Significant dose-rate effects were observed for both C3CA and TA, but less so for TA *track-segment* yields. These effects could be attributed to modifications of radiolysis mechanisms leading to fluorescent species 7-OH-C3CA and 2-OH-TA, and not to any effect on  $HO^{\bullet}$  itself. Yields measured with KBr/formate probe system were found independent of the dose-rate in the range investigated, 0.04 - 450 Gy/s. This leads to the conclusion that this probe mechanisms are unaffected by dose-rate, making it a reliable probe for such measurements. Furthermore, it shows that neither is hydroxyl radical yield, from conventional conditions up to above the range of “Flash effect” observed in radiotherapy.

## B/ L'eau oxygénée

### 1/ Etat de l'art

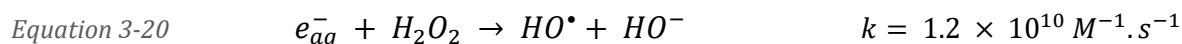
L'eau oxygénée est un produit moléculaire de la radiolyse de l'eau formée par des réactions de recombinaisons radicalaires impliquant différentes espèces. C'est un oxydant fort, de même que le radical hydroxyle mais à moindre mesure. Contrairement aux espèces radicalaires de radiolyse de l'eau,  $H_2O_2$  est relativement stable et peut être mesuré directement post-irradiation.

Dans de l'eau pure, l'eau oxygénée est formée initialement par recombinaison du radical hydroxyle avec lui-même (Choppin et al., 2013b).

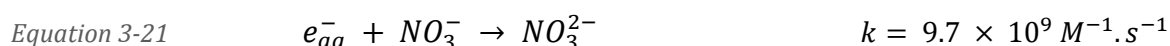


En présence d'oxygène, l'électron hydraté / l'atome d'hydrogène (selon les conditions de pH) joueront également un rôle majeur dans la production d'eau oxygénée en réagissant avec  $O_2$  pour former par l'intermédiaire du couple  $HO_2^{\bullet} / O_2^{\bullet-}$  plus de peroxyde d'hydrogène (*Equation 3-6*) (B. H. J. Bielski & Allen, 1977). Afin de déterminer le rendement primaire en  $H_2O_2$  formé par radiolyse de l'eau pure, il sera alors nécessaire de réaliser les mesures en l'absence de dioxygène afin d'empêcher ces réactions (Pastina & LaVerne, 1999).

Cependant, l'électron n'étant plus capturé par O<sub>2</sub>, il peut réagir rapidement avec l'eau oxygénée formée et la dégrader sous forme de HO• et HO<sup>-</sup> (Equation 3-20). Ceci aboutirait à la perte de ½ molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le radical HO• formé pouvant ensuite recombiner avec lui-même pour former une nouvelle molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Christensen *et al.*, 1994).



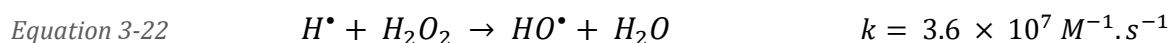
L'ajout d'un piègeur (ou *scavenger*) de l'électron hydraté est donc nécessaire afin d'éviter cette réaction de dégradation de l'eau oxygénée. L'espèce la plus utilisée à cette fin dans les études de l'eau oxygénée est généralement l'ion nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, qui réagit très efficacement avec e<sub>aq</sub><sup>-</sup> (3-21) (Z. D. Draganic & Draganic, 1969; Wasselin-Trupin *et al.*, 2002)(Buxton *et al.*, 2009)



L'eau oxygénée étant une espèce moléculaire qui se forme par recombinaison des espèces radicalaires primaires, son rendement après passage du rayonnement ionisant augmente avec le temps. L'étude de la cinétique du rendement radiolytique G(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est réalisée en piégeant HO• par un « scavenger » approprié.

Ainsi, un rendement radiolytique mesuré à un temps de capture x en HO• correspond au rendement d'eau oxygénée formée avant la capture par le piègeur. Contrairement à l'électron hydraté, de nombreuses espèces ont été utilisées dans la littérature pour HO•, notamment KBr et le méthanol (MeOH) (I. Draganic & Draganic, 1971) qui sont les espèces avec lesquelles nous avons réalisé nos captures.

L'influence du pH sur les rendements mesurés a également été étudiée dans la littérature. Ces différentes études, qu'elles soient expérimentales (Allen & Holroyd, 1955; Roth & LaVerne, 2011) ou par simulations (Meesungnoen & Jay-Gerin, 2005a), montrent une formation maximale à faible pH. Cela s'explique par la conversion de l'électron hydraté en H• qui réagit beaucoup moins vite avec l'eau oxygénée (3-22) (Mezyk & Bartels, 1995).

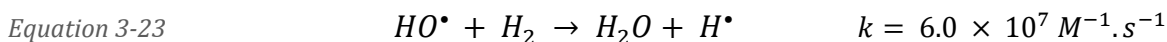


Dans notre cas, les expériences ont été menées sans modification du pH.

L'effet de la température a également été étudié dans certains travaux, qui ont montré une décroissance importante du rendement en peroxyde d'hydrogène avec celle-ci (Štefanić & LaVerne, 2002).

La cinétique de l'eau oxygénée est souvent représentée en fonction du pouvoir de capture, mais une autre représentation fut proposée par Sworski et réutilisée par Allen et Wasselin-Trupin *et al.* (Allen & Holroyd, 1955; Sworski, 1954; Wasselin-Trupin *et al.*, 2002). Pour cette représentation, le rendement en eau oxygénée mesuré est représenté en fonction de la racine cubique de la concentration en espèce piègeuse, ce qui permet d'obtenir une tendance affine de la forme  $y = ax + b$ .

Le coefficient directeur, « a », représente l'impact de la capture sur  $G(H_2O_2)$  et dépendra du rayonnement ainsi que du piègeur utilisé. Il correspond à la capacité de capture de l'espèce piègeuse, notée « p ». L'ordonnée à l'origine, « b », correspond au rendement du peroxyde d'hydrogène sans piègeur. Cette relation permet de déterminer la concentration sans piègeur en évitant l'action du dihydrogène formé durant la radiolyse qui peut réagir avec  $HO^\bullet$  pour former plus d'eau oxygénée par l'intermédiaire de la réaction 3-23 qui serait comptabilisée lors d'une mesure directe, sans piègeur (Allen & Holroyd, 1955; Thomas *et al.*, 1966).



De cette façon, on pourra écrire :

Equation 3-24 
$$G_{[X]}(H_2O_2) = p \times \sqrt[3]{[X]} + G^\infty(H_2O_2) \quad (\text{Wasselin-Trupin et al., 2002})$$

Où :  $G_{[X]}(H_2O_2)$  est le rendement en  $H_2O_2$  (espèces/100 eV) mesuré pour une concentration  $[X]$  en espèce piègeuse de  $HO^\bullet$

$p$  est la capacité de capture de l'espèce x, facteur endémique défini comme le coefficient directeur de l'équation.

$[X]$  est la concentration en M de l'espèce X piègeuse de  $HO^\bullet$

$G^\infty(H_2O_2)$  est le rendement en  $H_2O_2$  sans piègeur dans la solution

Le fait que cette relation linéaire soit valable signifierait, d'après Sworski, que la constante de vitesse de la réaction entre l'espèce piègeuse et le radical hydroxyle est uniquement liée à la distance entre l'espèce et la zone d'ionisation (c'est-à-dire là où se forme  $HO^\bullet$ ). Il s'agit donc d'une réaction contrôlée par la diffusion.

## 2/ Discussion sur l'usage des sondes méthanol et KBr

Deux espèces piègeuses de  $HO^\bullet$  ont été utilisées pour les mesures de rendement radiolytique en eau oxygénée. La première est le méthanol, espèce la plus utilisée dans la littérature, et la seconde est KBr, largement utilisée au cours de nos expériences de mesures du rendement en radical hydroxyle. La première présente plusieurs défauts, allant de sa dangerosité chimique, sa volatilité, à sa relativement faible constante de vitesse avec  $HO^\bullet$  ( $k = 9.7 \times 10^8 M^{-1}.s^{-1}$  (Buxton *et al.*, 2009)), impliquant des concentrations très élevées pour des temps de capture courts. Les deux sondes ont été testées sous irradiation par des protons d'énergie 2 MeV, sous Argon, et les résultats sont présentés *Figure 3-10*. Une diminution du rendement pour des temps courts de capture de  $HO^\bullet$  est observée, ce qui montre bien qu'en capturant le radical hydroxyle de plus en plus tôt, la production d'eau oxygénée par recombinaison de ce dernier est bien empêchée. Les rendements obtenus avec le méthanol sont parfaitement en accord avec les résultats de Pastina et LaVerne, alors que les valeurs obtenues avec KBr chutent plus rapidement à faibles temps de capture.



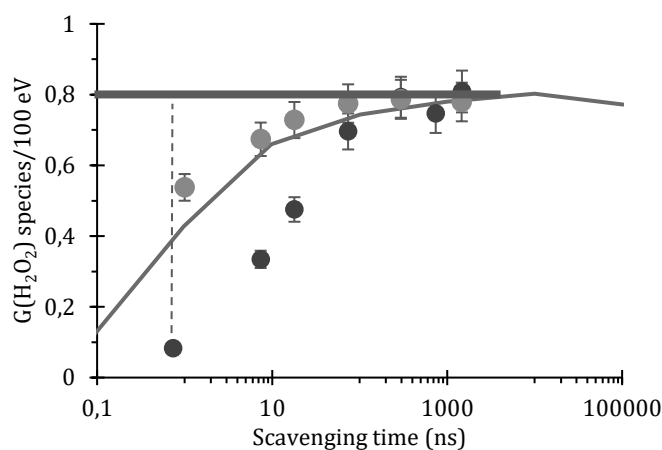
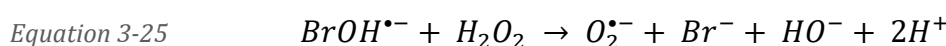


Figure 3-10 Evolution de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  en fonction du temps de capture en  $\text{HO}^\bullet$  sous irradiation par des protons de 2 MeV. Résultats obtenus en utilisant du méthanol (●), du KBr (●) et de l'étude de (Pastina & LaVerne, 1999) (ligne continue)

D'après Yamashita *et al.*, (Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008a), le composé formé suite à la capture de  $\text{HO}^\bullet$  par  $\text{Br}^-$ , considéré comme étant  $\text{BrOH}^{\bullet-}$  ou son « équivalent stœchiométrique », peut réagir avec l'eau oxygénée selon :



Le radical superoxyde ainsi formé peut alors se recombinaison avec sa forme protonnée pour former de l'eau oxygénée, comme évoqué précédemment (Equation 3-9). Ainsi, il faut tenir compte dans le bilan de la dégradation d'une demi mole d'eau oxygénée détruite par mole de radical  $\text{HO}^\bullet$  capté par l'ion bromure, ce qui diminue le rendement mesuré.

Ainsi, le rendement réel en eau oxygénée à un temps de capture  $t$ , noté  $G_t(\text{H}_2\text{O}_2)$  ne sera pas directement égal au rendement mesuré au même temps de capture avec  $\text{Br}^-$  comme piègeur du radical. Ce rendement pourra alors être noté  $G_{[\text{Br}^-]}(\text{H}_2\text{O}_2)$ .

Pour déterminer ce rendement réel, il faut alors ajouter la moitié de la différence entre le  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  mesuré à un temps de capture donné et le rendement à temps long,  $G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2)$ . Ce rendement radiolytique en eau oxygénée à temps long est alors soit obtenu par la représentation en fonction de  $\sqrt[3]{[X]}$ , soit à très faible concentration en espèce piègeuse d' $\text{HO}^\bullet$ .

En effet, la différence correspondra à la quantité d'eau oxygénée perdue par capture d' $\text{HO}^\bullet$  plus par la destruction par  $\text{BrOH}^{\bullet-}$ . La capture d'une mole d' $\text{HO}^\bullet$  par une espèce piègeuse du radical hydroxyle mènera alors à la perte d'une demi mole d'eau oxygénée, d'où l'Equation 3-26. Cependant, la formation d'une mole de  $\text{BrOH}^{\bullet-}$  dans les solutions de bromure mène à la perte d'une seconde demi-mole d'eau oxygénée. Comme  $\text{BrOH}^{\bullet-}$  provient de la capture de  $\text{HO}^\bullet$  par  $\text{Br}^-$ , son rendement est équivalent à la quantité d' $\text{HO}^\bullet$  capturé par  $\text{Br}^-$ . La perte d'une mole d' $\text{H}_2\text{O}_2$  provenant de la capture de deux moles d' $\text{HO}^\bullet$ , on aura :

$$\text{Equation 3-26} \quad G_t(\text{H}_2\text{O}_2) = G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2) - \frac{1}{2} G(\text{HO}^\bullet)_{\text{capté}}$$

$$\text{Equation 3-27} \quad G_{[\text{Br}^-]}(\text{H}_2\text{O}_2) = G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2) - \frac{1}{2} G(\text{HO}^\bullet)_{\text{capté}} - \frac{1}{2} G(\text{BrOH}^{\bullet-})_{\text{formé}}$$

Sachant que :

$$G(\text{HO}^\bullet)_{\text{capté}} = G(\text{BrHO}^{\bullet-})_{\text{formé}}$$

Il est possible d'écrire :

$$G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2) = G_{[\text{Br}^-]}(\text{H}_2\text{O}_2) + G(\text{BrHO}^{\bullet-})_{\text{formé}}$$

Et donc

$$G_t(\text{H}_2\text{O}_2) = G_{[\text{Br}^-]}(\text{H}_2\text{O}_2) + \frac{1}{2} G(\text{BrHO}^{\bullet-})_{\text{formé}}$$

Equation 3-28  $G_t(\text{H}_2\text{O}_2) = G_{[\text{Br}^-]}(\text{H}_2\text{O}_2) + \frac{1}{2} [G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2) - G_{[\text{Br}^-]}(\text{H}_2\text{O}_2)]$

Où :  $G_{[\text{Br}^-]}(\text{H}_2\text{O}_2)$  est le rendement en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (espèces/100 eV) mesuré pour une concentration correspondant à un temps de capture t en ions bromures, piègeurs de  $\text{HO}^\bullet$

$G_t(\text{H}_2\text{O}_2)$  est le rendement en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (espèces/100 eV) à un temps de capture t

Il est alors possible de déterminer le rendement réel en peroxyde d'hydrogène grâce à l'Equation 3-28. Ce rendement corrigé est représenté dans la Figure 3-11a. pour des protons de 2 MeV et dans la Figure 3-11.b pour des rayons X de 6 MeV. Les données ainsi obtenues sont tout à fait en accord avec les données publiées par (Pastina & LaVerne, 1999) validant ainsi notre méthode de correction du rendement mesuré par l'usage de KBr dans le cas de protons. Cette sonde présente toutefois un rendement trop élevé dans les temps de capture ultra-courts avec des RX, provenant probablement d'un mécanisme de réaction différent à très forte concentration en KBr (jusqu'à 250 mM). Il est en effet possible que la réaction de  $\text{BrOH}^\bullet$  avec l'eau oxygénée ne soit pas quantitative à ces temps courts, entraînant alors une sur-corrrection de l'action de ce dernier.

Il semble d'ailleurs que cette sur-corrrection n'apparaisse que pour les faibles TEL, ici avec les RX de 6 MeV.

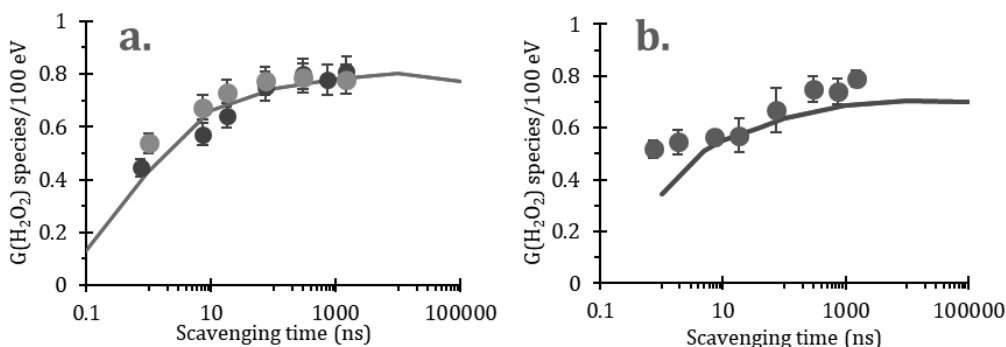


Figure 3-11 Evolution de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  en fonction du temps de capture en  $\text{HO}^\bullet$  sous irradiation par **a.** des protons de 2 MeV (méthanol (●), KBr (●) et Pastina & LaVerne, 1999 (—) et **b.** des Rayons X de 6 MeV (KBr (●) et Pastina & LaVerne, 1999 (—)).

La linéarité de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  avec  $\sqrt[3]{[\text{Br}^-]}$  ou  $\sqrt[3]{[\text{MeOH}]}$  a été vérifiée avec des protons de 2 MeV (Figure 3-12a.). La différence des pentes mesurées est liée à la valeur des constantes de vitesse avec  $\text{HO}^\bullet$  ( $k_{\text{Br}^-} = 1.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $k_{\text{MeOH}^-} = 9.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et (Buxton *et al.*, 2009).

Pour uniformiser cette représentation entre les différentes espèces piègeuses qui possèdent des constantes de vitesse différentes, la *Figure 3-12b*. représente l'évolution de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  en fonction de la racine cubique du pouvoir de capture,  $\sqrt[3]{k * [X]}$ . Cette représentation permet de visualiser directement si des mesures réalisées avec des sondes différentes donnent des résultats cohérents, ce qui est le cas ici, aux incertitudes de mesure près.

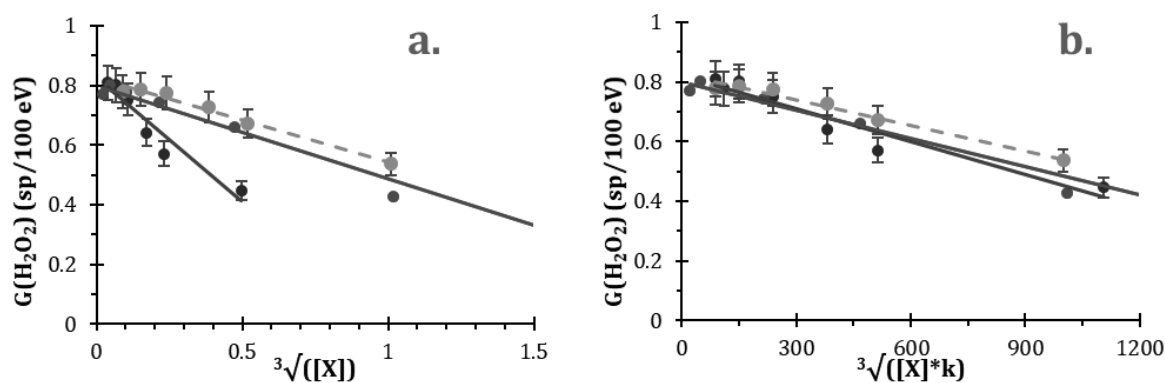


Figure 3-12 Evolution de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  sous irradiation par des protons de 2 MeV en fonction de **a.**  $\sqrt[3]{[X]}$  (méthanol (●), KBr (○) et Pastina & LaVerne, 1999 (—)) et **b.**  $\sqrt[3]{k * [X]}$  (KBr (●) et Pastina & LaVerne, 1999 (—)).

La sonde KBr, bien que semblant présenter une complexité importante aux temps de captures courts sera tout de même choisie pour les expériences présentées dans les chapitres suivants en raison de sa simplicité d'utilisation et de sa non volatilité évitant des fluctuations des concentrations lors du dégazage sous Argon. De plus, cela rend les expériences de mesure de  $\text{H}_2\text{O}_2$  possibles au HIMAC, où l'usage de méthanol est strictement interdit.

## C/ Toward a new measurement of the solvated electron by an indirect method

### 1/ Context and principle

The solvated electron, or the aqueous/hydrated electron in water ( $e_{aq}^-$ ) is a critical species of water radiolysis. Formed in same quantities overall as hydroxyl radical, it is a strongly reductive species.

As for hydrogen peroxide,  $e_{aq}^-$  needs to be quantified in the absence of oxygen, to prevent its scavenging by dioxygen (LaVerne et al., 2005). This species presents very interesting spectroscopic properties allowing direct measurements way easier than for hydroxyl radical, with a maximum absorption wavelength of about 725 nm and an  $\epsilon$  of about  $18\,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Kimura *et al.*, 1994). Still, pulse radiolysis is needed for such measurements, with ns or shorter pulses, and fast acquisition setup. Thus, the scavenging method is very common for the measurements of  $e_{aq}^-$ , with different molecular probes.

Nitrate/phosphite system (Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008a), methyl viologen (Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Maeyama, *et al.*, 2008; Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, Murakami, *et al.*, 2008) or the Glycylglycine (Garrison *et al.*, 1973; LaVerne & Yoshida, 1993) have been commonly used for such measurements.

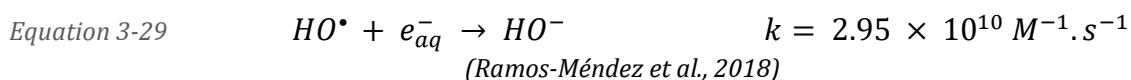
However, the need to be under strictly deaerated atmosphere, makes these measurements delicate, as solvated electron will readily react with any dioxygen molecule still dissolved (Yoshida *et al.*, 1990). Therefore, we aimed at developing a new method of measurement for  $e_{aq}^-$ , without degassing under argon or any inert gas.

When a formate solution is irradiated, aqueous electron is involved in the global  $H_2O_2$  measured yield (Equation 3-12).

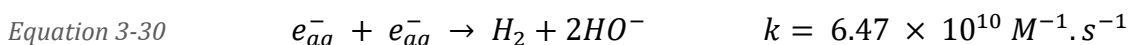
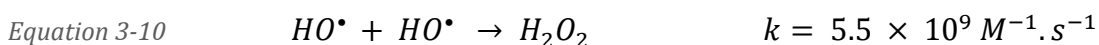
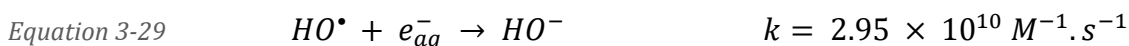
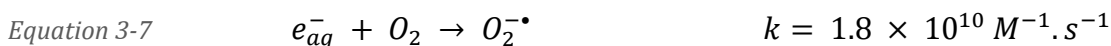
Equation 3-12

$$G(H_2O_2)_{Formate} = g(H_2O_2) + \frac{1}{2} [g(e_{aq}^-) + g(H^\bullet) + g(O_2^{\bullet-}) + g(HO_2^\bullet)] + \frac{1}{2}g(HO^\bullet)$$

Now, let's consider the reaction between  $e_{aq}^-$  and  $HO^\bullet$ :



The kinetic constant of this reaction is the highest between  $HO^\bullet$  or  $e_{aq}^-$  and any other species, which means that this reaction can be considered as the main pathway for the disappearance of both species. Then, before  $HO$  is scavenged by formate, the three reactions below occur:



This means that under these conditions,  $g(e_{aq}^-)$  in Equation 3-7 represents that of  $e_{aq}^-$  which has not reacted with  $HO^\bullet$  to form  $HO^-$  and that will then react with  $O_2$  to form later hydrogen peroxide. This amount can be noted  $g(H_2O_2)_{e_{aq}^-}^{O_2}$ . Also, before scavenging of  $HO^\bullet$  by the formate, the amount of  $H_2O_2$  formed by Equation 3-10 can be noted  $g(H_2O_2)_{HO^\bullet}^{HO^\bullet}$ .

After scavenging of  $HO^\bullet$  by formate, reactions 3-10 and 3-30 disappear, and  $H_2O_2$  is formed only through reaction 3-7 with  $e_{aq}^-$ .

When sodium nitrate is added in concentration high enough,  $e_{aq}^-$  can be scavenged at very short time (here 0.4 ns). Under these conditions, reactions 3-7, 3-29 and 3-30 do not occur anymore, before or after scavenging of  $HO^\bullet$  by formate. Therefore,  $HO^\bullet$  not consumed by reaction 3-29 is available for reaction 3-10, leading to an increase of  $H_2O_2$  by this pathway.

When we consider that  $\text{HO}^\bullet$  and  $e_{\text{aq}}^-$  form in comparable quantities through water molecule ionization (Choppin et al., 2013b), the additional amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  formed by 3-10 should be equal to that formed without nitrate by reaction 3-7. Therefore, overall, the quantities of  $\text{H}_2\text{O}_2$  formed are the same with and without nitrate, before formate scavenges  $\text{HO}^\bullet$ . This amount, formed by the enhanced quantity of  $\text{HO}^\bullet$  will be referred as  $g^{\text{NO}_3^-}(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{HO}^\bullet}$ .

We can then write the following expression:

$$\text{Equation 3-31} \quad g^{\text{NO}_3^-}(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{HO}^\bullet} = g(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{HO}^\bullet} + g(\text{H}_2\text{O}_2)_{e_{\text{aq}}^-}$$

However, now, after  $\text{HO}^\bullet$  has been scavenged by formate, no more  $\text{H}_2\text{O}_2$  is formed, as there is no remaining  $e_{\text{aq}}^-$  to react with dioxygen. Therefore, the difference between  $G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Formate}}$  and  $G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Formate}}^{\text{NO}_3^-}$  will correspond to half the amount of  $e_{\text{aq}}^-$  formed at a scavenging time equal to that of  $\text{HO}^\bullet$  by formate:

$$\text{Equation 3-32} \quad \frac{1}{2}g(e_{\text{aq}}^-) = G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Formate}} - G(\text{H}_2\text{O}_2)_{\text{Formate}}^{\text{NO}_3^-}$$

Therefore, kinetics of  $g(e_{\text{aq}}^-)$  should be measurable by difference of  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  between formate solution and formate/ $\text{NO}_3^-$  solutions at various concentrations in formate.

## 2/ First results

In order to compare our results with as much data as possible, experiments were performed at ICANS with 6 MeV X-rays, the ionizing radiation used for the benchmark of our methods because of relatively high availability of kinetic data with X-rays,  $\gamma$ -rays or high energy electrons in the literature.

### *Effect of sodium nitrate concentration*

The impact of solvated electron scavenging on the measured yield of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in sodium formate solutions was first studied. Scavenging of  $e_{\text{aq}}^-$  was performed with several  $\text{NaNO}_3$  concentrations in sodium formate solutions. Two formate concentrations were used, corresponding to scavenging times of 74 and 0.74 ns.

*Figure 3-13* presents the evolution of  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  with  $[\text{NO}_3^-]$  for the two  $\text{HO}^\bullet$  scavenging times (formate concentrations of 4.22 and 422 mM). As can be seen, scavenging of  $e_{\text{aq}}^-$  effectively reduces the observed yield of hydrogen peroxide. The yield decreases more for the shorter scavenging time (0.74ns) because of the higher  $e_{\text{aq}}^-$  yield at this time which is deduced to the observed yield of hydrogen peroxide as explained before. The scavenging progressively reduces the observed  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  until it reaches a plateau, at the same concentrations for the two sodium formate solutions. This shows that when  $e_{\text{aq}}^-$  is scavenged at short enough scavenging times, it will not react with  $\text{O}_2$  to form hydrogen peroxide.

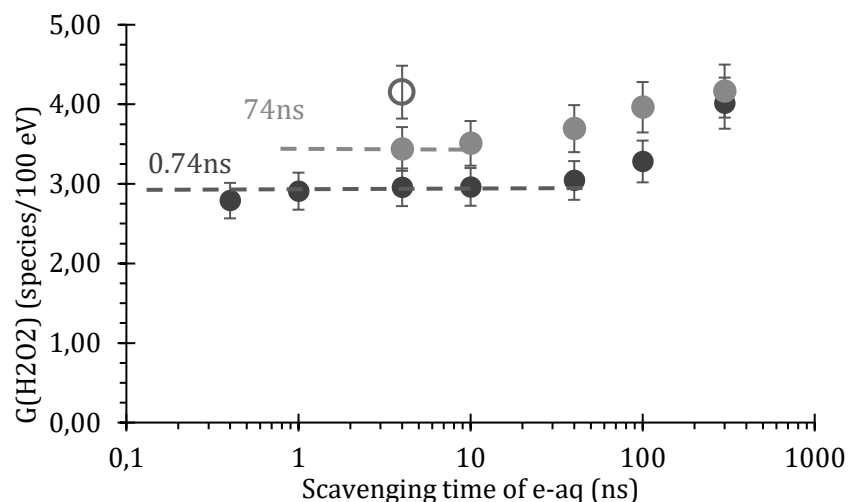
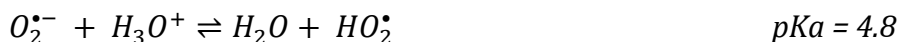


Figure 3-13 Evolution of the measured yield of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in formate solutions as a function of the scavenging time of e<sub>aq</sub><sup>-</sup> by NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. ● are yields measured at a HO• scavenging time of 74 ns and ● 0.74 ns. ○ was at a scavenging of 74 ns but saturated in oxygen.

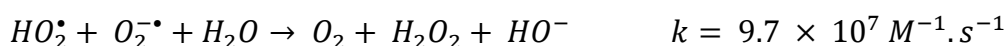
The increase can be seen as the beginning of the reactions with dioxygen to form O<sub>2</sub><sup>•-</sup> that will then form H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thus, the limit of the investigated scavenging time is placed at 300 ns, time at which e<sub>aq</sub><sup>-</sup> react quantitatively with O<sub>2</sub> according to Equation 3-7 (calculated after a dioxygen concentration in aerated solutions given at 240 μM, 9.1 mg/L (Bozorg-Haddad *et al.*, 2021)).



Equation 3-33



Equation 3-9



In order to visualize the effect of oxygen on hydrogen peroxide concentration, experiments were also performed in highly concentrated NaNO<sub>3</sub> solution ([NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 25 mM) saturated in pure oxygen. The yield of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was found almost equal to the one without scavenging of the solvated electron, as reaction with O<sub>2</sub> occurs faster than with nitrate under these conditions (Figure 3-13). This is surprising because at such concentrations of sodium nitrate it should still scavenge the electron before the dioxygen, even in saturated solutions.

We show here that the scavenging of e<sub>aq</sub><sup>-</sup> has a strong impact on G(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in irradiated sodium formate solutions. A plateau is reached when competition for e<sub>aq</sub><sup>-</sup> scavenging by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or O<sub>2</sub> is strongly in favour of the first in aerated conditions. Therefore, concentration of sodium nitrate used for g(e<sub>aq</sub><sup>-</sup>) determination will be that at the observed plateau. To be sure to scavenge very efficiently the solvated electron, a concentration of [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 250 mM, corresponding to a scavenging time of e<sub>aq</sub><sup>-</sup> of 0.4 ns, was chosen.

## Kinetic of the aqueous electron

Two series of eight aerated solutions of sodium formate were irradiated simultaneously by X-rays, corresponding to eight  $\text{HO}\cdot$  scavenging times between 1470 and 0.7 ns. In one series, sodium nitrate was added at  $[\text{NO}_3^-] = 250 \text{ mM}$ .  $G(e_{\text{aq}}^-)$  were determined from  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  measured in each series, by difference (Equation 3-32).

Results are presented in Figure 3-14, along with several experimental datasets from the literature obtained by direct measurements or by scavenging, or Monte-Carlo simulations. Our results are in a good agreement with the several datasets presented at short scavenging time ( $< 100 \text{ ns}$ ), especially with the latest direct measurements obtain by Wang *et al.* in 2018 on ELYSE platform (Wang *et al.*, 2018).

One can see that  $g(e_{\text{aq}}^-)$  determined do not pursue their decrease at scavenging times around and beyond the end of track expansion, i.e around 100 ns, and even that the yield increases for the long scavenging time (1480 ns). This can be seen as the limit of this indirect method, at times when the aqueous electron is quantitatively scavenged by oxygen.

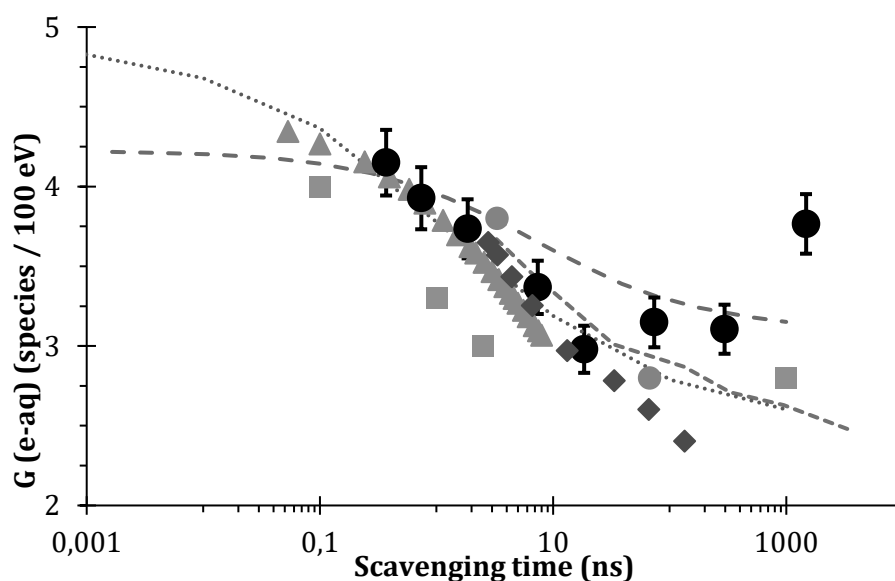


Figure 3-14 Evolution of the yield of  $e_{\text{aq}}^-$  as a function of the scavenging time in ns. Data points are experimental data : ● this study, ● from (Garrison *et al.*, 1973), ◆ from (Yoshida *et al.*, 1990) (both measured with Glycylglycine), ■ from (Baldacchino *et al.*, 2006) and ▲ from (Wang *et al.*, 2018) (both direct measurements). Continuous dashed lines, Monte Carlo simulations. ... from (Peukert *et al.*, 2018), GEANT4DNA code, --- from (LaVerne & Pimblott, 1991) and - - - from (Kreipl *et al.*, 2009).

We have presented here a new method to measure the yields of the aqueous electron in aerated solutions, which gave accurate results at short scavenging times, down to 0.37 ns, without needing any degassing of the solutions. However, this probe system, sodium formate and formate/ $\text{NO}_3^-$  is only useable in the inhomogeneous chemistry stage because of the quantitative scavenging of  $e_{\text{aq}}^-$  after 300 ns.

## Conclusion partielle

Le présent chapitre a présenté l'usage de sondes moléculaires pour la mesure des espèces de la radiolyse de l'eau. La mesure des trois espèces majoritaires,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  a pu être discutée et comparée à la littérature.

L'eau oxygénée, espèce moléculaire stable, peut être mesurée sans usage de sonde. Toutefois, afin d'étudier son évolution dans le temps, il faut capturer le radical hydroxyle, espèce responsable de sa formation dans de l'eau pure en l'absence d'oxygène. Dans ce chapitre, l'utilisation de KBr comme piègeur du radical hydroxyle a été discutée et validée par comparaison à la littérature et avec le méthanol. KBr représente un atout important d'un point de vue technique, simplifiant la mise sous argon et n'étant pas soumis à des limitations quant à son utilisation pour des raisons de sécurité. Ce piègeur de  $\text{HO}^\bullet$  sera par conséquent privilégié pour ces raisons dans les études de l'eau oxygénée selon les différents paramètres expérimentaux que sont le TEL et le débit de dose. D'autre part, les travaux sur la quantification de  $\text{HO}^\bullet$  ont montré un faible effet du débit de dose sur les rendements en  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de KBr.

Une nouvelle méthode de mesure de l'électron hydraté a été développée et testée dans des conditions de référence, des rayons-X de 6 MeV à débit de dose conventionnel. Bien que limitée à un temps de capture approchant au plus la centaine de nanosecondes, cette technique permet en revanche d'atteindre des temps de capture particulièrement courts, en dessous de la nanoseconde. Les résultats obtenus sont très encourageants, avec un excellent accord avec les différents sets de données issus de la littérature.

Enfin, dans un contexte de radiothérapie FLASH, l'étude de l'influence du débit de dose sur la radiolyse de l'eau devient de plus en plus critique. Parmi les sondes moléculaires utilisées pour la mesure de ce radical, la C3CA, TA et le système KBr/formiate, seul ce dernier s'est avéré exploitable pour une étude du radical hydroxyle à différents débits de dose. En effet, les deux premières sondes organiques ont montré une sensibilité de leurs mécanismes de radiolyse au débit de dose, indépendamment d'un potentiel effet sur le radical hydroxyle. Le système sonde de référence pour les mesures de  $\text{HO}^\bullet$  dans la suite de ce travail à différent débit de dose sera donc KBr/formiate.



---

## **Chapitre 4 - Les effets de TEL**

---

## Abstract

In a particle therapy context, the study of LET effects on the physico-chemical and chemical stages is particularly important, as they are the anchor point for all subsequent biological phenomena. The density of energy deposition, characterized by the LET among others, will have a strong impact on yields of water radiolysis species. Heavy and/or low energy ions deposit their energy with high LET, which leads to an increase in radical-radical recombination reactions. This parameter can also have an impact on the molecular mechanisms at play with organic molecules.

In this chapter, we will first discuss results of LET effects on water radiolysis species, in particular HO• and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the framework of this thesis. There are numerous reports in the literature on water radiolysis. The study of biomolecule radiolysis mechanisms in diluted conditions necessitate systematic determination of the water radiolysis species, in the very same conditions, in order to deconvolute LET or dose-rate effects on water radiolysis from that on biomolecule radiolysis. The results on water radiolysis were compared to literature, with a good agreement, whether with experimental data or Monte Carlo simulations.

Radiolysis products of several biomolecules were identified and quantified after irradiation by ions of different nature and energies, therefore LET. LET-specific mechanisms could be identified:

Production of methional, one of the most important radiolysis products of methionine, is strongly impacted by LET. Its formation rate for the reaction with HO• changes from 45 % at low LET to 100% with protons.

Tryptophan, an aromatic amino acid characterized by its indole cycle gives multiple radiolysis products. Under high-LET radiations, the formation of dimers was observed in aerated conditions, while they had been described only under deaerated conditions. Moreover, LET could have an impact on the regioselectivity of HO• attack on the molecule. At low LET, the HO• addition on the pyrrole part of the indole cycle is largely favoured. However, an increase of the LET has shown a decrease of the proportions of such additions on the pyrrole part of the indole cycle.

A small dipeptide containing a phenylalanine residue, aspartame, was also studied, with very similar results with phenylalanine amino acid (Phe). This shows that Phe radiolysis is not modified when the amino acid is involved in a peptide.

Le transfert d'énergie linéique (TEL) est au cœur de nombreuses études de radiolyse de l'eau par des ions accélérés. De par le caractère inhomogène du dépôt d'énergie, l'augmentation de cette grandeur, avec des ions lourds ou de basse énergie, entraînera ainsi une augmentation des réactions de recombinaisons radicalaires. Ces recombinaisons pourront aussi avoir un impact sur les mécanismes moléculaires mis en jeu sur des molécules organiques.

L'objectif de notre étude est d'étudier systématiquement la radiolyse de l'eau et de biomolécules protéiques dans les mêmes conditions, afin d'évaluer séparément l'impact du TEL sur la radiolyse des biomolécules et sur celle de l'eau. Ainsi, dans le cadre d'une étude des effets de TEL, un travail préalable sur la radiolyse de l'eau est nécessaire. Ce sont principalement les rendements radiolytiques des produits de radiolyse qui seront déterminés et étudiés pour ces études.

## A/ Les effets de TEL sur la radiolyse de l'eau

### 1/ L'eau oxygénée - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'eau oxygénée est impliquée dans la formation d'un des produits majoritaires de la méthionine, le sulfoxyde de méthionine (Schöneich, 2005). L'étude de cette espèce apporte donc des informations précieuses sur la radiolyse de l'eau, et sera cruciale pour l'étude de la méthionine.

Le peroxyde d'hydrogène étant une espèce moléculaire formée à partir d'espèces radicalaires, des conditions favorisant les recombinaisons radicalaires augmenteront son rendement final (Choppin et al., 2013b).

L'évolution temporelle du rendement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été présentée dans le chapitre précédent pour des rayonnements de faible TEL (RX) et des protons de 2 MeV, pour la validation de la méthode de mesure. L'effet du TEL sera discuté à la fois sur les cinétiques et sur le rendement à temps long, G<sup>∞</sup> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ainsi que l'influence de la présence d'oxygène dans la solution.

#### *Cinétiques de l'eau oxygénée*

Les ions carbone de 41 MeV correspondent au rayonnement ionisant ayant le plus haut TEL parmi ceux utilisés dans ce travail, avec un TEL moyen de 539 eV/nm (TEL obtenu par simulations SRIM (Ziegler *et al.*, 2010)). Les rendements mesurés avec ce rayonnement sont des rendements intégraux, suite au dépôt de toute l'énergie des ions dans la solution. Ce cas d'étude est donc un excellent exemple des TEL d'ions lourds dans le pic de Bragg, là où la densité de dépôt d'énergie est maximale. D'autre part, en exploitant des ions produits à 6 MeV/nu par l'accélérateur linéaire du HIMAC, l'influence d'éventuels fragments formés par réactions nucléaires dans les rendements mesurés est minimisées.

G(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a été mesuré à différents temps de capture en faisant varier la concentration en KBr, à l'aide d'une cellule d'irradiation PEEK à circulation. Des nitrates (nitrate de sodium) à une concentration de 25 mM étaient également présents en solution, pour capturer l'électron hydraté.

Ces mesures ont été réalisées en milieu aéré, la concentration en ions nitrates étant suffisante pour capturer efficacement  $e^-_{aq}$  et limiter sa réaction avec  $O_2$ . L'expérience a également été réalisée sous atmosphère d'argon pour le temps de capture de 74 ns.

Les résultats sont présentés dans la *Figure 4-1* ci-dessous. Les irradiations ont été réalisées à un flux d'ions de  $2.53 \times 10^9$  ions/cm<sup>2</sup>/s correspondant à un débit de dose de  $3.08 \times 10^6$  Gy/s.

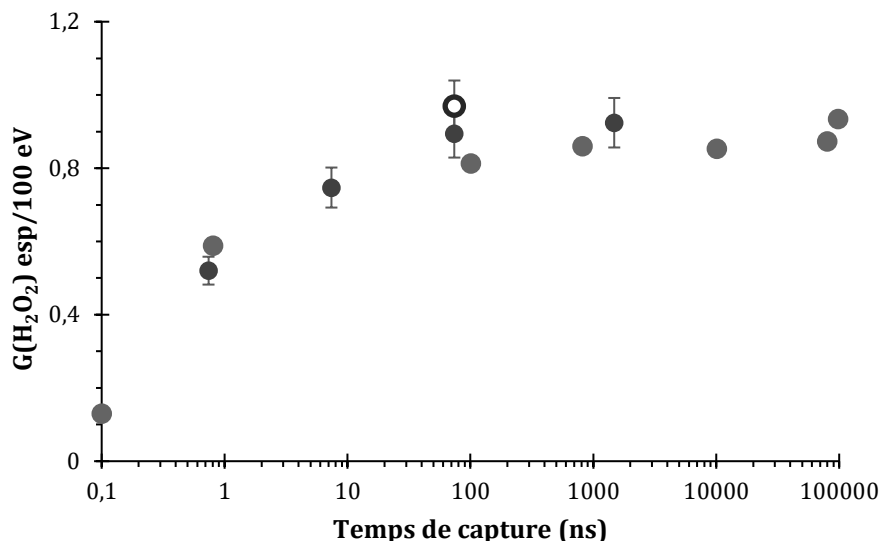


Figure 4-1 Evolution de  $G(H_2O_2)$  en fonction du temps de capture pour des C de 41 MeV en conditions aérées (●, cette étude) et sous Argon à un temps de capture de 74 ns (○, cette étude) et pour des C de 10 MeV sous Argon avec du MeOH (Pastina & LaVerne, 1999) (●).

Les rendements tels que mesurés et corrigés de l'action de  $BrHO^\bullet$  sont présentés dans la *Figure 4-1*, et comparés aux données de Pastina & LaVerne mesurées avec des ions similaires sous atmosphère inerte en utilisant du méthanol. Les valeurs obtenues sont très proches, avec une même évolution temporelle et un plateau observé entre 100 et 1000 ns. Ainsi, nos données obtenues sous air sont tout à fait similaires à des données obtenues sous Argon. Cela suggère alors qu'avec une capture à 4 ns de l'électron hydraté l'effet de l'oxygène est déjà suffisamment inhibé aux temps de captures étudiés.

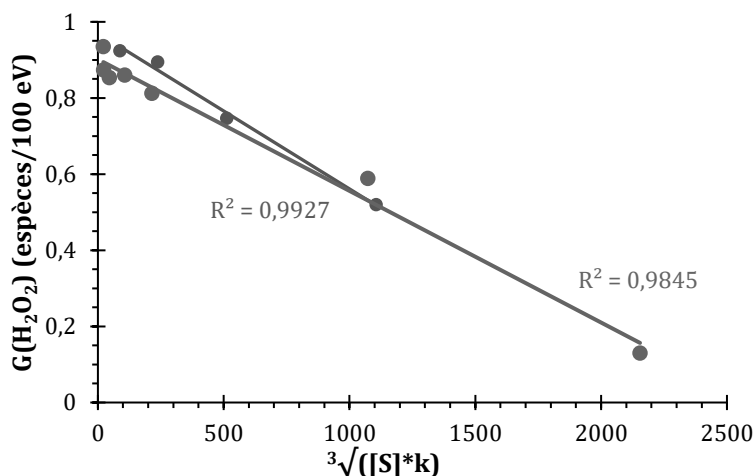


Figure 4-2 Evolution de  $G(H_2O_2)$  en fonction de  $\sqrt[3]{k * [X]}$  pour des C de 41 MeV en conditions aérées (●, cette étude) et pour des C de 15 MeV sous Argon (Pastina & LaVerne, 1999) (●)

L'évolution du rendement radiolytique peut aussi être représenté en fonction de  $\sqrt[3]{k * [X]}$  (et non pas  $\sqrt[3]{[X]}$  car il ne s'agit pas de la même sonde utilisée). Les résultats obtenus dans notre étude et celle de Pastina & LaVerne montrent alors une évolution linéaire qui est similaire (Figure 4-2). Cela nous permet également d'obtenir  $G^\infty (H_2O_2)$  pour ce rayonnement : 0.98 esp/100 eV.

Afin d'étudier l'effet du TEL sur les cinétiques de formation de l'eau oxygénée, nous avons comparé les données cinétiques obtenues pour différents rayonnements.

Les résultats sont présentés dans la Figure 4-3, avec l'évolution du rendement radiolytique de l'eau oxygénée en fonction du temps de capture et également l'évolution en fonction de  $\sqrt[3]{k * [X]}$ . Sur la Figure 4-3a, la chute de  $G(H_2O_2)$  avec la capture de  $HO^\bullet$  apparaît plus importante pour les rayonnements ionisants ayant un TEL faible ou modéré (0.2 eV/nm pour des RX de 6 MeV, 47 eV/nm pour des ions He de 230 MeV/nu, 11 eV/nm pour des ions C de 400 MeV/nu). Les rendements mesurés avec ces rayonnements sont de plus des rendements différentiels, là où les rendements mesurés avec les H de 2 MeV et les C de 41 MeV sont des rendements intégraux. Ainsi, en plus du TEL moyen plus élevé, le pic de Bragg de ces ions sera présent dans la solution. Une densité de dépôt d'énergie plus importante implique des recombinaisons radicalaires favorisées, ce qui est cohérent avec ce qui est observé ici : le rendement à temps court est plus important à TEL élevé car les réactions de recombinaisons, notamment  $HO^\bullet$  avec lui-même pour former  $H_2O_2$ , sont favorisées et se feront donc plus rapidement après l'interaction rayonnement-matière.

Les observations réalisées à partir de la Figure 4-3b, sont similaires. En effet, les pentes plus importantes observées pour les TEL faibles que pour les TEL élevés indiquent également une formation de l'eau oxygénée plus progressive dans ces conditions.

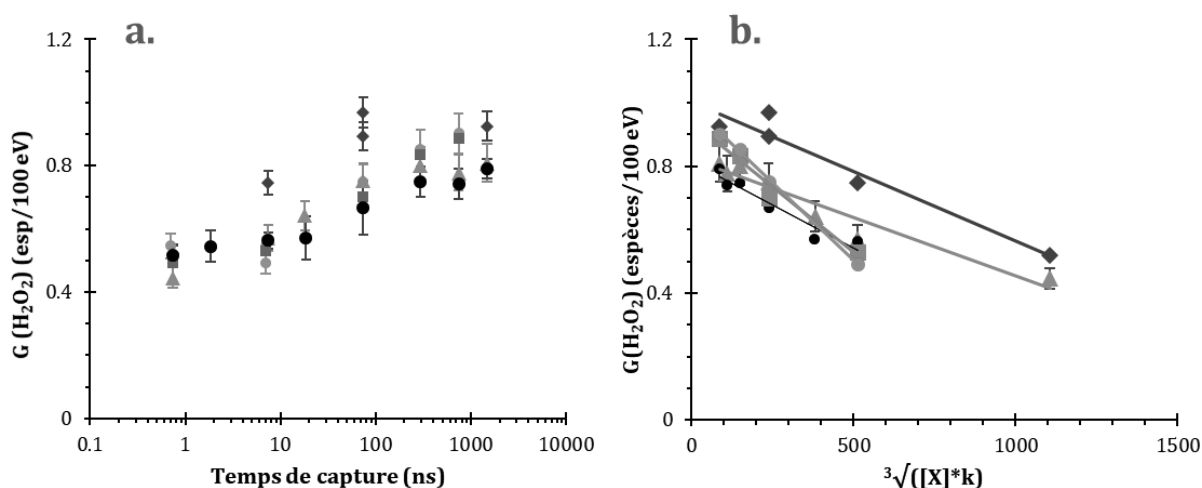


Figure 4-3a. Evolution de  $G(H_2O_2)$  en fonction du temps de capture pour des C de 41 MeV en conditions aérées (◆), des protons de 2 MeV (Argon, ▲), des C des 400 MeV/nu (Argon, ●), des He de 230 MeV/nu (Argon, ■) et des rayons X de 6 MeV (●).

b. 4-4 Evolution de  $G(H_2O_2)$  en fonction de  $\sqrt[3]{k * [X]}$  pour les mêmes rayonnements.

Les rendements mesurés à temps courts, c'est-à-dire 0.74 ns, sont étonnamment similaires entre tous les rayonnements, et semblent s'écarter de la tendance qui apparaît avec les autres temps de capture plus longs. Ce rendement semble alors trop élevé pour les TEL faibles. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce rendement élevé.

La première, évoquée dans le **Chapitre 3 - B/ 2/**, serait une sur-correction de l'action de  $\text{BrOH}^\bullet$ , qui est considérée comme quantitative avec l'eau oxygénée. Or, à ces temps courts et à faible TEL, la densité radicalaire pourrait être trop faible pour que cette réaction soit réellement quantitative. Ainsi, la quantité d'eau oxygénée détruite par  $\text{BrOH}^\bullet$  serait plus faible que la quantité formée de cette espèce, menant alors à une surestimation de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$ .

La seconde hypothèse, qui pourrait coexister avec la première, concerne la formation d'une espèce stable uniquement à haute concentration en  $\text{Br}^-$ , l'ion tribromure  $\text{Br}_3^-$  (Mirdamadi-Esfahani *et al.*, 2009). Cette espèce pourrait alors se former en quantité relativement importante dans nos solutions et oxyder  $\text{I}^-$  lors de la réaction avec le réactif de Ghormley, menant alors à une surestimation importante des ions triiodure et donc de l'eau oxygénée formée en solution.

#### Effet du TEL à temps long

Les rendements à temps long, soit  $G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2)$ , déterminés par la linéarité de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  en fonction de  $\sqrt[3]{k * [X]}$  obtenus dans cette étude en fonction du TEL des rayonnements utilisés sont présentés dans la *Figure 4-5*. Plusieurs jeux de données présents dans la littérature avec différentes espèces piégeuses de  $\text{HO}^\bullet$  utilisées sont également reportés. Toutes ces données correspondent à des irradiations sous atmosphère désoxygénée.

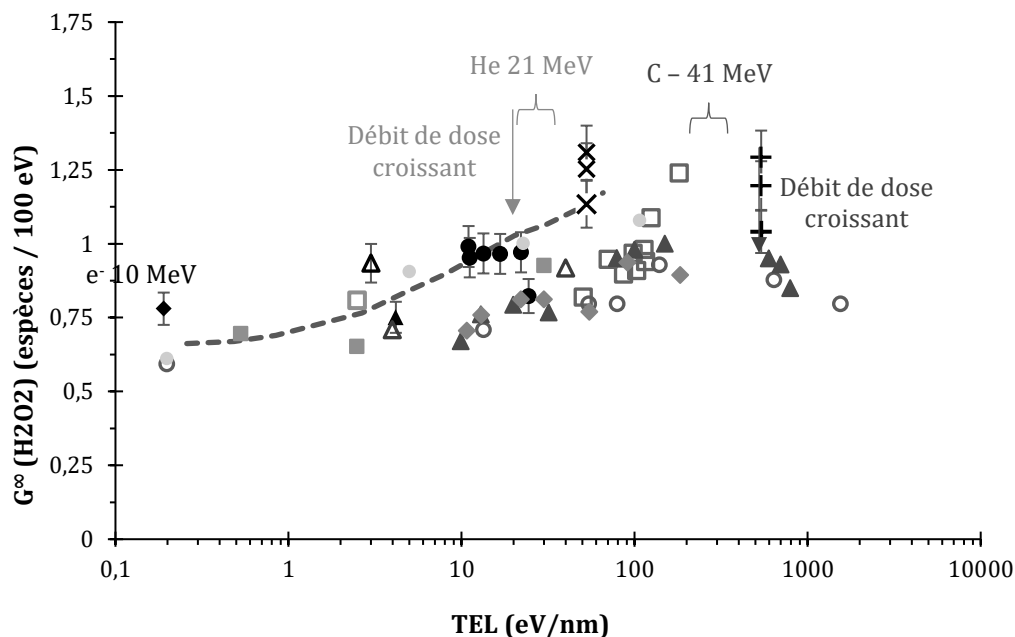


Figure 4-5 Evolution de  $G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2)$  en fonction du TEL, déterminés par la représentation en fonction de  $\sqrt[3]{[S]}$  ou à concentration très faible en piègeur de  $\text{HO}^\bullet$ . Les données de cette étude sont en noir, électrons de 10 MeV (◆), protons de 24 MeV (intégraux ▲ et différentiels △), He 230 MeV/nu (■); C 400 MeV/nu à différentes profondeurs dans l'eau (●), He 21 MeV (×), C 41 MeV (+). Les données en couleurs proviennent de la littérature. (Wasselin-Trupin *et al.*, 2002) (□ sonde MeOH et ■ sonde  $\text{NO}_2^-$ ), (Anderson & Hart, 1961) (□), (Burns & Sims, 1981) (○), (Schwarz *et al.*, 1959) (●), (Pastina & LaVerne, 1999) (▲), (Elliot *et al.*, 1996) (△), (Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008b) (◆), (Alanazi *et al.*, 2020) (---, simulation)

Les données obtenues montrent une augmentation de  $G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2)$  avec le TEL jusqu'à 53 eV/nm, et sont globalement en accord les données expérimentales et les simulations publiées dans la littérature.

Nos rendements sont cependant plus élevés pour les He de 21 MeV (TEL 53 eV/nm) et les C de 41 MeV (TEL 539 eV/nm).

Pour ces données, trois valeurs sont représentées, correspondant à trois débits de dose, les valeurs les plus élevées étant mesurées aux débits de dose les plus faibles. Les effets du débit de dose seront discutés plus en détail dans le **Chapitre 6 - B/ 1/**.

Ainsi,  $G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2)$  augmente avec le TEL du rayonnement ionisant, ce qui est communément observé et attribué à une augmentation de la recombinaison du radical  $\text{HO}^\bullet$  avec lui-même. Cependant, lorsque le TEL devient particulièrement élevé, au-delà de 100 eV/nm, plusieurs auteurs observent des rendements diminuant avec le TEL. Ce constat est similaire avec nos données. Bien qu'une diminution n'apparaisse pas clairement, les rendements cessent de croître entre les mesures sous ions He et C de moyenne énergie. La réaction de recombinaison du radical HO avec lui-même intervient avec une constante cinétique de  $0.55 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , sensiblement inférieure à celle entre HO et  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  ( $k = 3.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (Shin *et al.*, 2021). Ces deux réactions sont donc en compétition, La diminution relative observée à haut TEL pourrait ainsi être expliquée par une prépondérance de la réaction entre HO et l'électron hydraté. Une autre hypothèse pourrait être la formation de peroxyde d'hydrogène croissante dans la trace, qui entraînerait davantage de réactions entre la molécule et les radicaux issus de la radiolyse de l'eau, menant au final à une diminution du rendement observé.

L'influence de l'oxygène en solution sur les rendements mesurés a également été étudiée. Des irradiations ont été réalisées sur les mêmes systèmes, à savoir KBr à différentes concentrations dans des solutions de nitrate de sodium de concentration 25 mM, sous air et sous Argon. Pour tous les rayonnements considérés, c'est-à-dire pour des Rayons-X de 6 MeV, des protons de 2 MeV et des ions C de 41 MeV, les cinétiques de rendement de l'eau oxygénée sont très similaires dans les deux conditions (*Figure 4-6*). Dans le cas des C de 41 MeV, seul un temps de capture a été répété sous air et Argon pour un même débit de dose, donnant des résultats très similaires (*Figure 4-1*). Ceci s'observe donc sur une large gamme de TEL

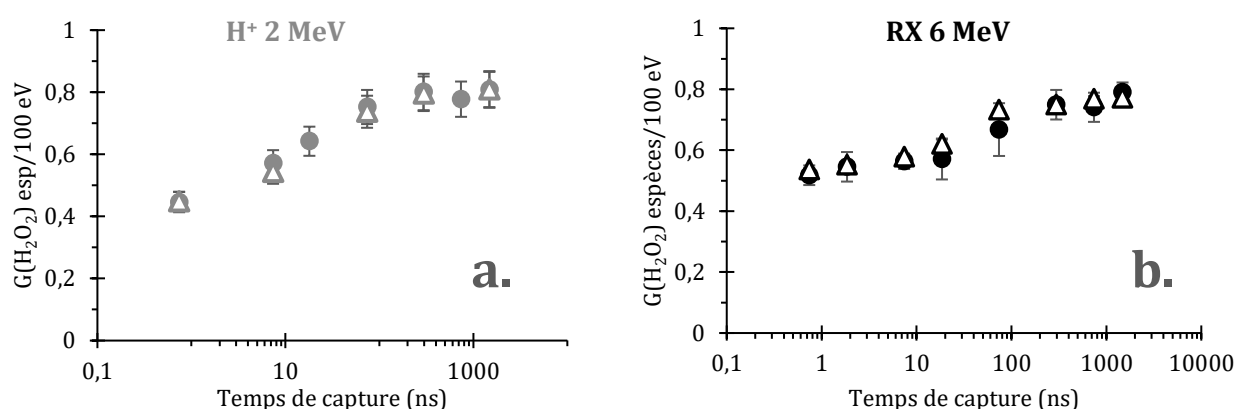


Figure 4-6.a. Evolution du rendement en eau oxygénée en fonction du temps de capture mesuré par la sonde KBr sous irradiation  $\text{H}^+$  2 MeV sous air ( $\Delta$ ) et sous argon ( $\bullet$ ).

b. Evolution du rendement en eau oxygénée en fonction du temps de capture mesuré par la sonde KBr sous irradiation RX 6 MeV sous air ( $\Delta$ ) et sous argon ( $\bullet$ ).

(Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008b) avaient observé une augmentation importante de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  en milieu aéré lors de leurs irradiations sous faisceaux d'ions lourds de TEL équivalents à ceux utilisés lors de ce travail de thèse.

L'augmentation observée, allant de +15 à +30% peut s'expliquer par la concentration en piègeur de l'électron hydraté. Pour ces expériences, les auteurs avaient utilisé une concentration de 2.5 mM d'ions nitrates pour piéger l'électron hydraté, soit un temps moyen de capture de 40 ns, assez proche de celui de la réaction avec  $\text{O}_2$ , ce qui peut expliquer l'effet observé en milieu aéré. Dans nos études, nous avons utilisé une concentration de 25 mM en nitrate de sodium, soit un temps de capture de 4 ns, piégeant  $e^-_{\text{aq}}$  largement avant qu'il ne réagisse avec l'oxygène.

Une autre explication de ces différences pourrait provenir du temps auquel  $\text{H}_2\text{O}_2$  est étudié. Dans notre cas, l'espèce est étudiée au plus tard à un temps de 1480 ns, là où Yamashita *et al.* n'ont pas utilisé de piègeur du radical hydroxyle.

## 2/ Le radical hydroxyle – $\text{HO}\cdot$

Produit majoritaire de la radiolyse de l'eau, avec l'électron hydraté, le radical hydroxyle est l'espèce responsable de la majorité des dégâts sur les biomolécules. Ainsi, l'étude de cette espèce est incontournable afin de mieux saisir chaque étape des mécanismes moléculaires impliqués dans la radiolyse de biomolécules, postérieurs à la production des espèces de radiolyse de l'eau et qui proviennent de l'action de ces dernières.

### *Effets sur les cinétiques du radical hydroxyle*

Les rendements radiolytiques en  $\text{HO}\cdot$  ( $G(\text{HO}\cdot)$ ) mesurés, obtenus à différents temps de capture en variant la concentration en sondes KBr/formiate, sont présentés dans la *Figure 4-7*. Celle-ci regroupe les résultats obtenus avec les principaux rayonnements ionisants utilisés, des rayons X de 6 MeV aux hélions de 21 MeV pour des TEL compris entre 0.2 et 53 eV/nm. On observe que  $G(\text{HO}\cdot)$  diminue avec le temps de capture, en raison des réactions radicalaires impliquant ce dernier. La recombinaison du radical hydroxyle avec lui-même est une des principales réactions impliquées, comme le montre l'augmentation concomitante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour les mêmes temps de capture.  $G(\text{HO}\cdot)$  diminue également significativement avec le TEL pour un temps de capture donné. On considère qu'immédiatement après l'interaction rayonnement-matière, le rendement radiolytique de  $\text{HO}\cdot$  est le même, quel que soit le type de rayonnement, autour de 5 esp/100 eV (Alanazi et al., 2020). Cependant, avec l'augmentation du TEL, les *spurs* d'espèces formées par la radiolyse de l'eau se rapprochent jusqu'à se recouvrir. Ceci entraîne alors une augmentation importante des réactions inter-radicalaires, menant à une chute beaucoup plus rapide des rendements radiolytiques des espèces radicalaires avec le temps. Dans cette étude, nous avons pu mesurer ces rendements à des temps de capture relativement précoces, inférieurs à la nanoseconde. Ces temps restent cependant trop élevés pour voir les rendements mesurés converger vers une même valeur, à des temps autour de la picoseconde (El Omar et al., 2011a). Le temps de capture de 74 ns correspond à un temps situé à la fin de l'expansion des traces et donc à la fin de l'étape de chimie inhomogène ce qui en fait un temps



très intéressant pour les études sur les biomolécules. A ce titre, les expériences portant sur l'étude des effets du TEL ou du débit de dose sur nos systèmes seront réalisées à ce temps de capture pour les différentes espèces étudiées. Il s'agit de plus d'un temps documenté dans la littérature pour la radiolyse de l'eau ( $\sim 100$  ns).

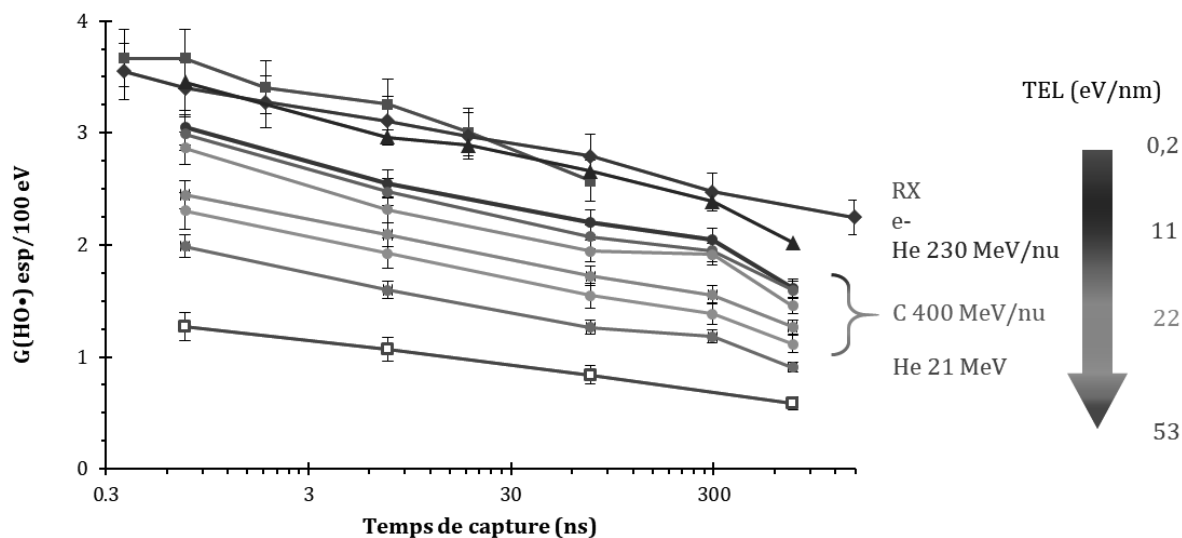


Figure 4-7 Evolution de  $G(\text{HO}\cdot)$  en fonction du temps capture mesurés par la sonde KBr/formiate pour différents rayonnements et différents TEL. RX 6 MeV (●), électrons 1 MeV (●), He 230 eV/nu (●), C 400 MeV/nu à différentes profondeurs (●●●●●), He 21 MeV (rendements intégraux, □)

#### Effets à 74 ns et comparaison avec la littérature – Rendements intégraux

Les rendements intégraux sont définis comme des rendements moyens le long de la trace de l'ion qui dépose toute son énergie en solution. Les rendements intégraux du radical hydroxyle obtenus sous faisceaux d'ions de faible ou moyenne énergie sont présentés dans la Figure 4-8. Les résultats sont présentés pour des protons de 24 à 6 MeV obtenus sur la plateforme Cyréc, des hélions de 21 MeV et des C de 41 MeV obtenus dans la MEXP du HIMAC. Des données à bas TEL obtenues avec des électrons de 1 MeV et des RX de 6 MeV sont également présentées ainsi que plusieurs sets de données issues de la littérature pour des ions similaires. Nos mesures ont été réalisées avec la sonde KBr/formiate. Les différents points pour un même rayonnement au même TEL correspondent à des débits de doses différents. Cet aspect sera discuté plus en détail dans le **Chapitre 6 - B/ 2/** mais il est déjà possible d'observer que pour chaque rayonnement où un effet est observé, le rendement du radical hydroxyle diminue lorsque le débit de dose augmente.

Les résultats présentés montrent clairement une diminution des rendements lorsque le TEL augmente, et ce pour tous les rayonnements utilisés ici. Lorsque le TEL augmente, la densité de radicaux produits dans la trace va augmenter elle aussi, menant alors à une augmentation des réactions de recombinaisons radicalaires des différentes espèces. Cette augmentation des recombinaisons entraîne la diminution observée des rendements radiolytiques.

Une discontinuité importante est observée entre les différents ions sur cette représentation en fonction du TEL, qui ne serait donc pas un paramètre optimal pour décrire le dépôt d'énergie global du rayonnement. En effet, une part importante de l'énergie est déposée autour de la trace par les

électrons secondaires. Pour des faisceaux d'ions de différente nature avec un TEL similaire, le faisceau d'ions plus lourds aura une énergie bien plus élevée ce qui entraînera des électrons secondaires d'énergie plus importante.

Ces électrons pourront alors parcourir une distance plus importante, ce qui aura pour effet de diminuer la densité de dépôt d'énergie autour de la trace.

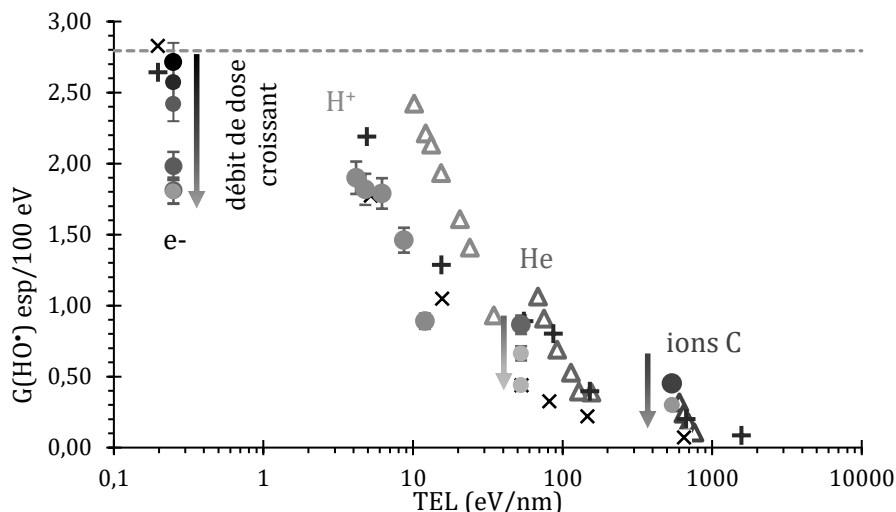


Figure 4-8 Evolution de  $G(\text{HO}^\bullet)$ , rendements intégraux, en fonction du TEL pour différents rayonnements. Cette étude : RX 6 MeV (---), électrons 1 MeV (●), H 24 MeV (●), He 21 MeV (●), C 41 MeV (●). Littérature : (Burns & Sims, 1981) (Plusieurs ions, +), (M. Smith et al., 2021) (H △, He △, C △) et (Schwarz et al., 1959) (modèle, x). Les flèches symbolisent un débit de dose croissant.

Les *spurs* formées dans ces traces  $\delta$  seront ainsi éloignées les unes des autres et de celles de la trace principale, amoindrissant alors les recombinaisons des radicaux et amplifiant les rendements de ces espèces. Le TEL, ou plus rigoureusement le pouvoir d'arrêt ( $-dE/dx$ ) ne représente la densité de dépôt d'énergie que sur une seule dimension et ne décrit pas le dépôt d'énergie autour de la trace par les électrons secondaires. Ceci explique les discontinuités observées pour les différents dans la représentation en fonction du TEL donnée dans la Figure 4-8. Un paramètre plus approprié pour ce type de représentation pourrait être  $(Z_{\text{eff}}/\beta)^2$ , qui tient compte de l'énergie du faisceau d'ions et donc de l'énergie des électrons secondaires (Katz, 1970).

De plus, la notion de « TEL moyen » utilisée ici pour des rendements intégraux est une approximation ne tenant pas correctement compte de la région à très haute densité dans le pic de Bragg des ions. Ces rendements n'ont ainsi qu'un sens modéré pour la radiolyse de l'eau seule. Néanmoins, ils seront très utiles par la suite pour les études de la radiolyse de biomolécules dans les mêmes conditions.

L'accord est modéré entre nos résultats et ceux obtenus par Smith *et al.* pour les protons, avec une tendance similaire mais des rendements plus bas au même TEL. Nos données sont toutefois proches des résultats obtenus par Burns *et al.* avec le même type de rayonnement ainsi qu'avec le modèle de diffusion de Schwarz. Cette différence entre les jeux de données pourrait provenir du système étudié. Smith *et al.* ont utilisé l'acide formique pour leurs mesures, alors que Burns *et al.* ont utilisé le formiate, et tous deux ont mesuré les quantités de  $\text{CO}_2$  formées lors de la radiolyse de leur système. L'estimation du TEL moyen, réalisé grâce à SRIM dans notre cas (Ziegler *et al.*, 2010), peut également justifier une partie des différences car il peut différer selon le code de simulation utilisé.

Les résultats obtenus avec des ions lourds sont toutefois beaucoup plus proches des données issues de la littérature.

Les rendements intégraux, de par leur nature de rendement moyen le long de la trace, représentés pour un TEL moyen ont ainsi un intérêt limité, car une part importante d'information est perdue par le dépôt d'énergie moyenné.

Les rendements différentiels, c'est-à-dire des rendements pour un TEL constant ou presque, ont nettement plus de sens. Cependant, pour des ions avec une profondeur de pénétration faible et un TEL très variable le long de leur trace, la mesure d'un rendement directement différentiel est très compliquée techniquement. La mesure de rendements intégraux est donc parfois inévitable. Ces rendements différentiels ont été déterminés pour les rayonnements présentés ci-dessus à l'exception des ions C.

#### *Effets à 74ns et comparaison avec la littérature – Rendements différentiels*

Les rendements différentiels ont pu être mesurés directement pour les protons de 24 MeV en utilisant des tubes fins de contenance 200µL. En effet, ceux-ci ont un diamètre maximal de 5 mm, et sont donc totalement traversés par les protons à cette énergie.

En revanche, des ions plus lourds ou de plus faible énergie, ont une profondeur de pénétration beaucoup plus faible, de l'ordre de 70 µm pour les ions C de 41 MeV par exemple. Une mesure directe des rendements différentiels devient alors extrêmement compliquée expérimentalement. Pour pallier cette difficulté, LaVerne *et al.* ont développé une méthode permettant de déterminer les rendements différentiels par traitement mathématique des mesures intégrales (LaVerne, 1989).

Le nombre total d'espèces de radiolyse formées le long de la trace d'un ion, noté  $N_{\text{esp/ion}}$ , peut être estimé à partir du rendement intégral  $G$  et de l'énergie  $E_0$  initial de l'ion par l'expression suivante :

$$\text{Équation 4-1} \quad N_{\text{esp/ion}} = \frac{G \cdot E_0}{100} = \frac{1}{100} \times \int_0^{E_0} G' \cdot dE$$

Où :  $N_{\text{esp/ion}}$  est le nombre d'espèces formées par ion en solution.

$G$  est le rendement intégral.

$G'$  est le rendement différentiel.

$E_0$  est l'énergie initiale du faisceau d'ions en entrant dans la solution.

Il est  
aussi  
lié au

rendement différentiel  $G'$ , qui représente le rendement pour un dépôt d'énergie infinitésimal  $dE$  le long de la trace, entre l'énergie d'entrée et le pic de Bragg. On peut donc estimer  $G'$  en différentiant le nombre  $N_{\text{esp/ion}}$  mesuré via le rendement intégral, par rapport à l'énergie de l'ion :

$$\text{Équation 4-2} \quad G' = 100 \times \frac{dN_{\text{esp/ion}}}{dE_0}$$

$N_{\text{esp/ion}}$  est mesuré pour plusieurs énergies  $E_0$ , et son évolution peut être modélisée mathématiquement (*Figure 4-9-a. fit CurveExpert (Hyams, 2010)*). La modélisation effectuée est purement empirique, de type  $y = ax^b$ . La dérivée de la fonction est calculée analytiquement, et les

rendements différentiels sont calculés à partir de l'Équation 4-2 sur toute la gamme d'énergie initiale (et donc de TEL) utilisée pour ces expériences.

Les résultats obtenus pour des protons de 24 à 6 MeV et pour des hélions de 21 à 6 MeV (à haut débit de dose) sont présentés dans la Figure 4-9-b.

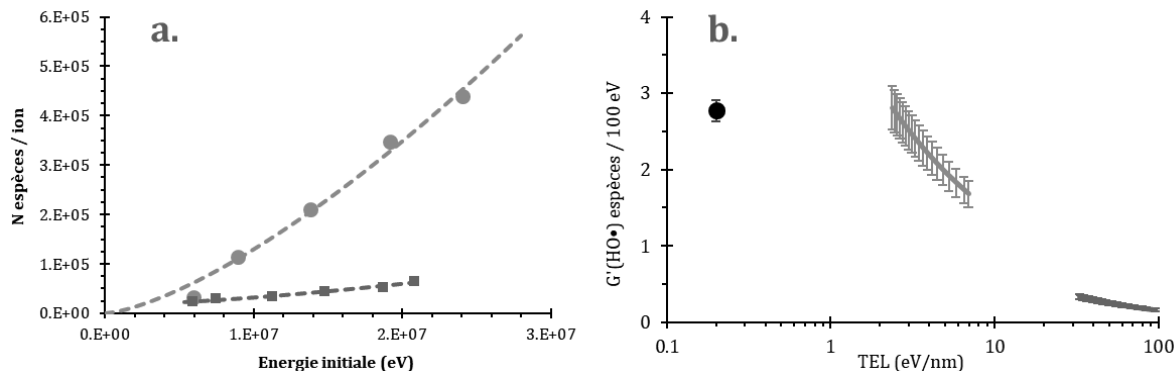


Figure 4-9-a. Evolution du nombre d'espèces formées par ion en fonction de l'énergie du rayonnement d'ions incident pour des protons (●) et des hélions (■) b. Evolution de  $G'(HO\bullet)$ , rendement différentiel obtenu par la méthode de différenciation, en fonction du TEL pour des électrons de 1 MeV (●), des protons (●) et des hélions (■).

Les résultats obtenus par cette méthode, ainsi que ceux mesurés directement dans le cas des protons de 24 MeV, sont présentés dans la Figure 4-10 accompagnés de données provenant de la littérature.

Les rendements différentiels obtenus pour les protons de 24 MeV par mesure directement différentielle (faible épaisseur) et par différenciation mathématique sont en très bon accord entre eux, validant ainsi la détermination mathématique des  $G'$ . La diminution observée des rendements avec le TEL s'explique comme pour celle observée pour les rendements intégraux : par une augmentation des réactions de recombinaisons *intra-trace*. En effet, une augmentation du TEL induit des réactions inter-*spurs* dans la trace du rayonnement par recouvrement de ces dernières (Pimblott *et al.*, 1992). Pour un TEL inférieur à environ 3 eV/nm, les *spurs* peuvent être considérés comme « isolées » (Chatterjee & Magee, 1987), et le TEL n'a pas d'influence, même à temps court ( $\sim$ ns). C'est d'ailleurs ce qui est observé sur la Figure 4-7 avec une diminution des rendements à tous les temps de capture à partir des ions C de 400 MeV/nu soit pour un TEL de 11 eV/nm, là où pour des TEL inférieurs à 3 eV/nm (H 24 MeV, He 230 MeV/nu ...) on mesure un même rendement, équivalent à celui obtenu avec des RX.

La comparaison entre les données obtenues pour des rendements intégraux et différentiels soulève un point important : les valeurs obtenues pour des rendements différentiels à un TEL donné ne sont pas équivalents à des rendements intégraux au même TEL moyen. Dans le cas des protons de 24 MeV, les rendements différentiels mesurés directement sont de 2.59 esp/100 eV pour un TEL de 3 eV/nm alors que les rendements intégraux pour un TEL de 4.2 eV/nm, donc très proche, descendent à 1.9 esp/100 eV. Une telle différence est également observée avec les rendements obtenus par la méthode de la différenciation mathématique (Figure 4-9) et lorsque les rendements différentiels obtenus par Yamashita *et al.* (2008) sont comparés avec les rendements intégraux. Cet écart provient certainement de la présence du pic de Bragg dans la solution, région où la densité d'ionisation en solution est particulièrement importante.

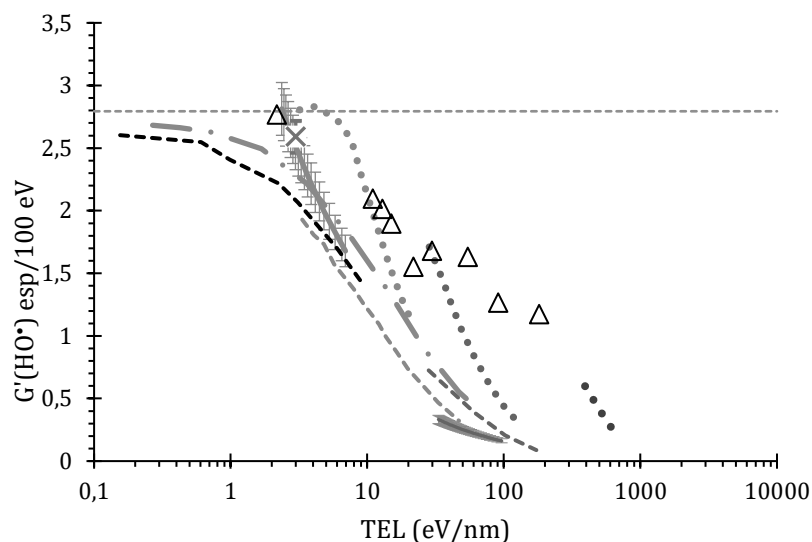


Figure 4-10 Evolution de  $G'(HO^\bullet)$ , rendements différentiels, en fonction du TEL pour différents rayonnements. Cette étude : RX 6 MeV (---), H 24-6 MeV par la méthode de différentiation (—), H 24 MeV mesurés directement (X), He 21-6 MeV (—). Littérature : (Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008b) (Plusieurs ions,  $\Delta$ ), (M. Smith et al., 2021) (H  $\bullet$ , He  $\bullet$ , C  $\bullet$ ), (Shin et al., 2021) (simulation Geant4DNA, e- (---), H<sup>+</sup> (---) et He (---)) et (Alanazi et al., 2020) (simulation, — • —).

Cet écart semble d'autant plus important pour les TEL modérés, là où les rendements différentiels sont sur la valeur plateau des faibles TEL, c'est-à-dire les rendements obtenus avec des photons énergétiques. Ainsi, même si le TEL moyen figure dans la gamme dans laquelle les rendements sont attendus comme constants, la présence de TEL élevés en fin de parcours créera des régions de forte densité d'ionisation, ce qui diminuera inévitablement le rendement. Le TEL moyen calculé sur une trace contenant le pic de Bragg n'a donc que peu de sens pour représenter les rendements mesurés.

Les rendements mesurés avec des hélions de faibles énergies sont particulièrement faibles comparés aux données de la littérature obtenues avec des ions similaires (M. Smith et al., 2021). Cette différence peut s'expliquer par le débit de dose particulièrement élevé utilisé lors de ces expériences. En effet, comme observé pour les rendements intégraux, le rendement en radical hydroxyle pour les ions He de 21 MeV diminuent lorsque le débit de dose augmente. Or, les rendements différentiels déterminés ici l'ont été pour le débit de dose le plus élevé des ions He de moyenne énergie (flux de  $1.97 \times 10^{10}$  ions/cm<sup>2</sup>/s correspond à un débit de dose de  $2.32 \times 10^6$  Gy/s).

Une différence importante subsiste entre nos données et celles de Smith *et al.*, bien qu'elle soit inférieure à celle observée pour les rendements intégraux. L'accord avec les résultats d'Alanazi *et al.*, (2020) obtenus par simulations Monte Carlo, également avec des protons, est bien meilleur. Il est aussi excellent pour les valeurs obtenues par simulation avec le code Geant4-DNA par Shin *et al.* (2021).

Bien que ce ne soit pas un paramètre optimal pour représenter la densité de dépôt d'énergie d'un rayonnement dans l'eau, le TEL reste très révélateur des effets de cette dernière sur la radiolyse de l'eau.

Lorsque le TEL augmente, la proximité accrue des espèces radicalaires formées par la radiolyse de l'eau entraîne une augmentation de leurs recombinaisons à temps courts, diminuant alors la quantité d'espèces disponibles pour réagir avec des solutés présents dans le milieu, comme pour les biomolécules dans un contexte biologique.

Cette densité de dépôt d'énergie accentuée pourrait par ailleurs avoir un impact important sur les mécanismes moléculaires induits par l'action des espèces issues de la radiolyse de l'eau en augmentant la densité locale d'intermédiaires réactionnels radicalaires produits lors des premières étapes des réactions. La mesure de la radiolyse de l'eau dans les mêmes conditions permet alors de mettre en avant ces différences, sans que les résultats ne soient biaisés par une simple modification de la quantité d'espèces radicalaires à l'origine des produits formés.

## **B/ Les effets de TEL sur les biomolécules protéiques**

Afin d'étudier les effets de TEL sur la radiolyse de petites biomolécules protéiques en solution, deux acides aminés ont été choisis. Le premier est la méthionine (Met), dont la réactivité est principalement due à son groupement thioéther. Le second est le tryptophane (Trp), caractérisé par un cycle indole. Enfin, un dipeptide contenant une phénylalanine (Phe), l'aspartame, a été étudié afin d'initier la recherche à une échelle de taille supérieure.

### **1/ La méthionine**

D'après les études disponibles dans la littérature, le sulfoxyde de méthionine (MetO) et le méthional sont les produits de radiolyse majoritaires de la méthionine libre (Barata-Vallejo *et al.*, 2010). Cependant, ces études proviennent uniquement d'irradiations par des photons, aucune donnée n'existe avec des ions.

Des solutions aqueuses de méthionine ont été irradiées sous faisceaux d'électrons de 1 MeV et de protons de 2 et 24 MeV, afin de déterminer l'effet du TEL sur la radiolyse de la méthionine et ses produits de radiolyse.

Les deux produits majoritaires, à savoir le méthional et MetO, ont ainsi pu être identifiés et quantifiés dans toutes les irradiations réalisées grâce aux méthodes analytiques développées et optimisées présentées au chapitre 2. Aucun produit autre que ceux-ci n'a pu être détecté. La sulfone étant considérée comme un produit de sur-oxydation, il est possible qu'elle puisse se former à des doses plus élevées que celles utilisées lors de nos expériences (200 Gy maximum). Ces deux produits ont ainsi pu être quantifiés. Leurs rendements pondérés par ceux des espèces de radiolyse de l'eau responsables de leur formation ainsi que leurs rendements bruts sont représentés dans la *Figure 4-11*.

Concernant le méthional, l'évolution des rendements bruts en fonction du TEL est difficilement interprétable avec seulement trois points, car non régulière.

Les proportions formées par rapport à HO• sous faisceaux d'électrons sont de 42% par rapport à HO•. Elles sont similaires à celles reportées dans la littérature sous irradiations par des rayons  $\gamma$  (Barata-Vallejo *et al.*, 2010), seule valeur à laquelle nous pouvons nous comparer.

Ce rendement augmente à  $\sim 100\%$  (valeur dans la barre d'erreur) pour les deux faisceaux de protons. Le TEL du rayonnement incident a donc un impact particulièrement important sur les quantités de méthional formé, et la structure de la trace à ces TEL entraîne donc une hausse de son rendement par rapport à HO•.

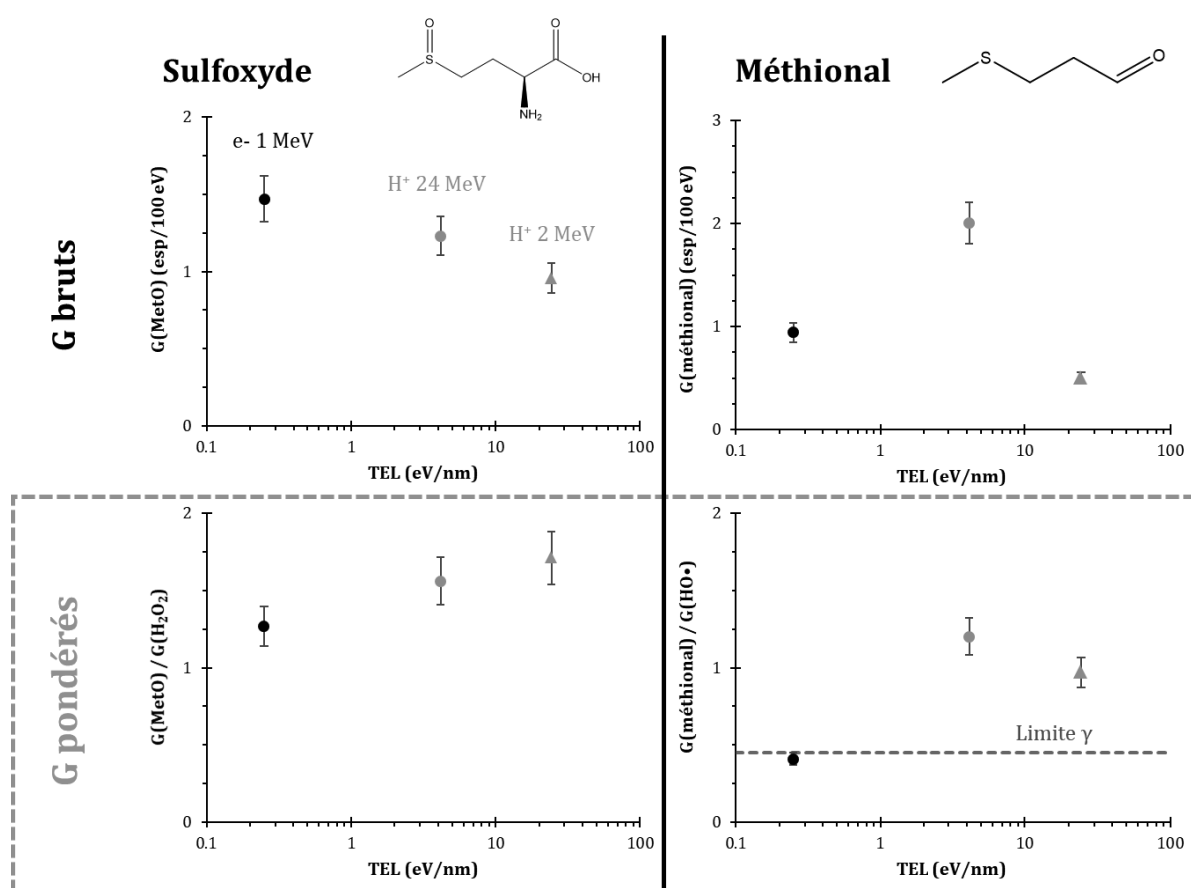


Figure 4-11 Evolution des rendements du sulfoxyde de méthionine (à gauche) et du méthional (à droite) en fonction du TEL. En haut, les rendements sont ceux mesurés directement, et les rendements en bas sont pondérés par les rendements des espèces responsables de leur formation :  $H_2O_2$  pour MetO et le HO• pour le méthional. pour des électrons de 1 MeV (●), des protons de 24 MeV (●) et des protons de 2 MeV (▲)

MetO se formant, d'après les données issues de la littérature, par l'action de deux produits de radiolyse de l'eau (HO• et  $H_2O_2$ ), la question du choix de l'espèce par laquelle pondérer le rendement radiolytique de MetO s'est posée. (Ignasiak *et al.*, 2011) ont montré que les quantités de sulfoxyde formées sous irradiation du peptide Met-Lys en présence de catalase, et donc en absence d'eau oxygénée, étaient réduites d'un facteur quatre par rapport aux quantités formées en absence de catalase. De plus, dans cette étude, les irradiations ont été réalisées sous  $N_2O$ , atmosphère sous laquelle l'électron hydraté est converti en radical hydroxyle en réagissant avec le gaz dissous, de sorte que les quantités d'HO• produites sont deux fois supérieures à celles présentes dans une solution aérée, comme c'est le cas lors de notre étude. On peut alors s'attendre à ce que les quantités de MetO formées par l'action du radical hydroxyle soient encore plus faibles en conditions aérées.

De plus, cette étude portant sur un dipeptide, dans lequel le méthional (un produit de la réaction de Met avec HO•) ne peut se former, il est probable que la différence de quantités formées en présence ou en absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soient encore plus importante dans le cas de la méthionine libre. Ainsi, il a été décidé de pondérer les rendements de production de MetO par les rendements de production de l'eau oxygénée, mesurés sous air.

Sous irradiation par des protons, il a été montré que le rendement pondéré en méthional est proche de 1. Cela signifie que dans ces conditions, la totalité du radical hydroxyle réagit très certainement avec Met pour former le méthional. Cela appuie encore, si besoin, le choix réalisé précédemment de pondérer le rendement en sulfoxyde de méthionine par le rendement en eau oxygénée mesuré dans les mêmes conditions.

Pour le sulfoxyde de méthionine, les rendements bruts mesurés diminuent avec le TEL. Ce produit se forme par action du peroxyde d'hydrogène. Comme les irradiations ont été réalisées en milieu aéré, la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à considérer est celle formée à l'air, sans capture de e<sup>-</sup><sub>aq</sub> à un temps de capture de 74 ns en HO•. Ce temps correspondant à celui de la réaction de la méthionine avec le radical hydroxyle. Ce rendement a été déterminé par irradiation d'une solution aérée de KBr de temps de capture 74 ns. L'eau oxygénée formée par recombinaison de HO• ne varie que très peu avec le TEL, comme cela a été montré précédemment. En conditions aérées, une part importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est formée par réaction entre e<sup>-</sup><sub>aq</sub> et O<sub>2</sub>. Or, une augmentation du TEL induit une diminution des espèces radicalaires, et donc la part d'eau oxygénée formée par cette réaction diminue de façon conséquente. L'électron hydraté peut également davantage réagir avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à haut TEL et en diminuer le rendement. Ainsi, on mesure dans ces conditions une diminution du rendement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le TEL.

Le rapport G(MetO)/G(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) augmente ainsi avec le TEL, là où le rendement en sulfoxyde brut diminue. Le rapport étant toujours supérieur à 1, une autre espèce que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est également responsable de la formation du sulfoxyde de méthionine.

A l'heure actuelle, l'étape du mécanisme qui pourrait être sensible au TEL n'est pas encore clairement établie. Le radical superoxyde, O<sub>2</sub>• se formant dans la trace des ions à TEL élevé pourrait intervenir lors d'une étape du mécanisme de radiolyse de la méthionine. Sa faible constante de vitesse avec la méthionine ( $k < 0.33 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (B. H. Bielski & Shiue, 1978)) rend très peu probable une oxydation directe de l'acide aminé, mais il pourrait réagir avec un des radicaux intermédiaires formés, et amplifier la formation des produits de radiolyse.

---

Contrairement à ce qui fut observé dans une étude précédente sur la phénylalanine (Ludwig *et al.*, 2018), aucun produit spécifique aux irradiations par des ions n'a été observé comme des dimères. Ces dimères semblant être engendrés par formation de liaisons au niveau des cycles aromatiques, il n'est pas surprenant de ne pas les observer pour un acide aminé aliphatique comme la méthionine (Garrison, 1987). Le TEL a donc un impact essentiellement quantitatif sur la radiolyse de la méthionine, et ce indépendamment de son effet sur les espèces de radiolyse de l'eau.



## 2/ Le tryptophane

### Identification d'espèces spécifiques

Parmi tous les produits de radiolyse du tryptophane, présentés dans le premier chapitre, l'un est très peu documenté dans la littérature et a été reporté uniquement dans quelques études récentes. Il s'agit d'un peroxyde en position 3 du cycle indole, évoqué comme intermédiaire réactionnel uniquement (Bellmaine *et al.*, 2020). Il se forme suite à l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur l'atome N en position 1 du cycle indole suivi d'un transfert de radical en position 3 (Carroll *et al.*, 2018) (*Figure 4-12*). Des études réalisées par simulations montrent que l'action de HO $\cdot$  mène à une addition du radical plutôt qu'à un arrachement d'hydrogène lorsque le site cible est un carbone du cycle indole. Lorsque l'action du radical se fait sur l'atome d'azote du cycle, la réaction préférentielle sera très majoritairement un arrachement d'hydrogène (Mujika *et al.*, 2013).

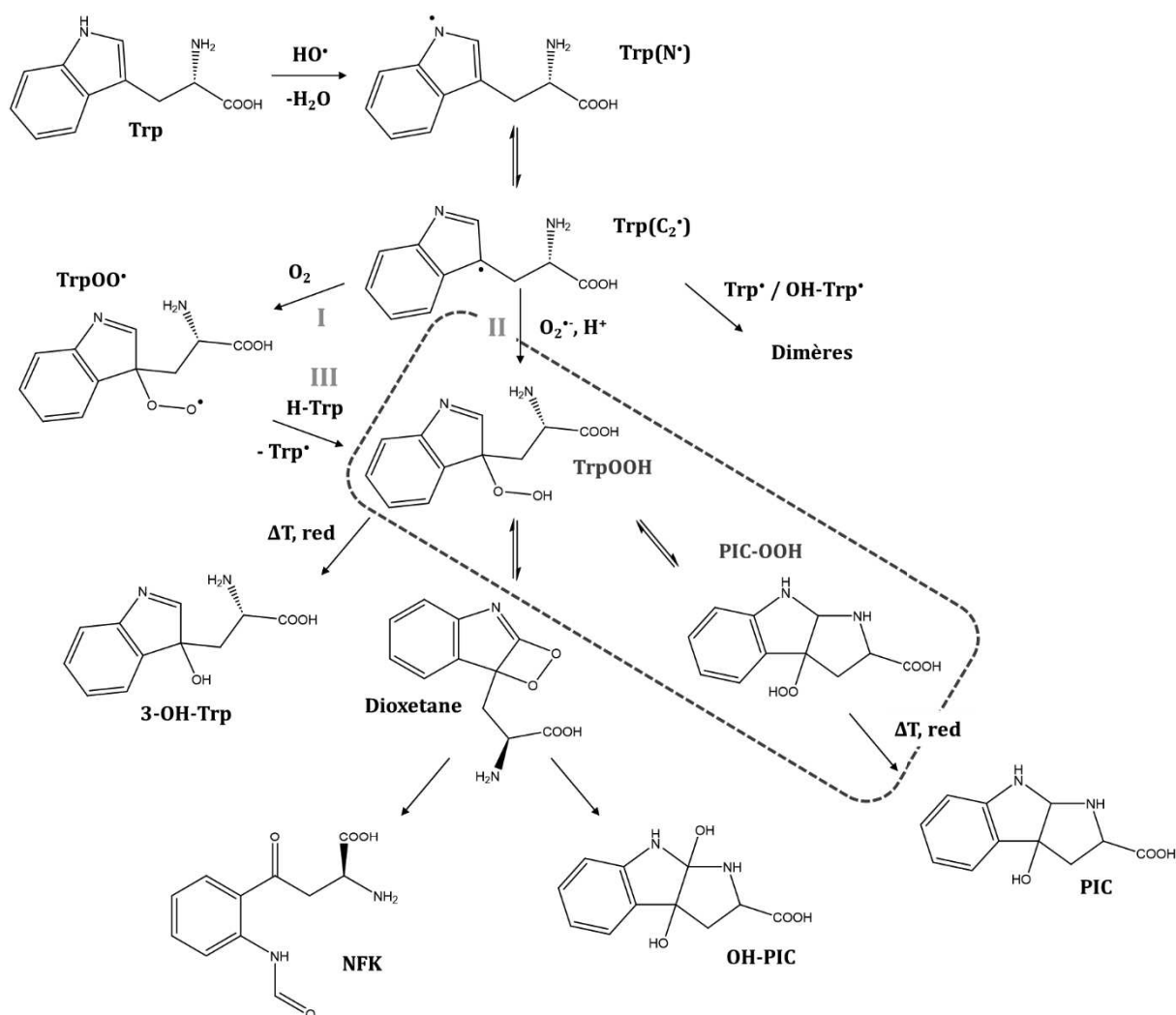


Figure 4-12 Schéma réactionnel de la formation du PIC-OOH et du TrpOOH et menant à la formation de produits ultérieurs en conditions spécifiques. Mécanisme proposé d'après (Bellmaine *et al.*, 2020 ; Carroll *et al.*, 2018).

Deux études théoriques ont été menées sur l'action du radical hydroxyle sur Trp, et donc sur cet arrachement d'hydrogène.

Toutes deux ont déterminé que cette action était particulièrement favorable thermodynamiquement, si ce n'est la plus favorable de toutes les réactions HO•-Trp (Mujika *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2016). Cependant, alors que la première étude a déterminé qu'elle était également très favorable cinétiquement et de façon comparable à l'addition en position 2 du cycle, la seconde conclut plutôt sur une barrière énergétique plus élevée que les additions de HO• sur les autres positions. Ces deux études aboutissent toutefois à la même conclusion concernant les additions de HO• : la position 2 est nettement favorisée par rapport aux autres.

Ce peroxyde peut exister sous deux formes d'après (Carroll *et al.*, 2018) et est relativement stable. Les conditions de sa conversion sont assez drastiques, à savoir température ou pH élevés, ou encore présence d'autres espèces chimiques (Bellmaine *et al.*, 2020). Il pourrait donc être observé comme produit de radiolyse, bien qu'aucune mention de ce composé sous irradiation n'ait été faite dans la littérature. Sur les chromatogrammes des solutions de tryptophane irradiées, deux pics de forte intensité apparaissent à des temps de rétention courts (4.5 et 6.2 min), caractéristiques de produits polaires (Figure 4-13).

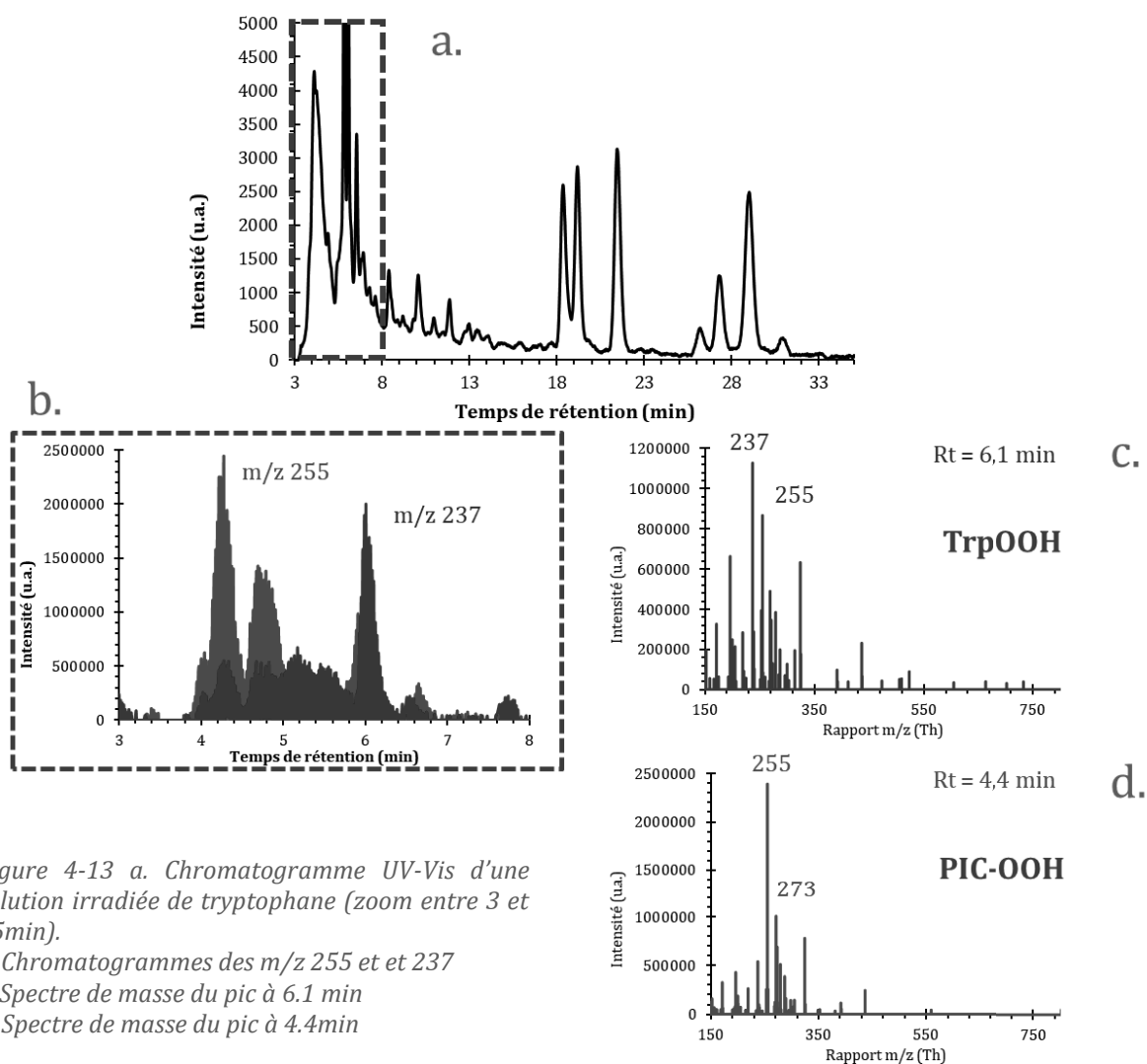


Figure 4-13 a. Chromatogramme UV-Vis d'une solution irradiée de tryptophane (zoom entre 3 et 35min).

b. Chromatogrammes des m/z 255 et et 237

c. Spectre de masse du pic à 6.1 min

d. Spectre de masse du pic à 4.4min

Les analyses par spectrométrie de masse montrent que ces signaux correspondent à des rapports masse/charge de 255 Thomson (Th) et 237 Th respectivement. 237 Th correspond au rapport attendu pour le peroxyde du tryptophane mais également à celui d'un produit doublement hydroxylé. Il est peu probable qu'il s'agisse du second type de composé car il nécessite une double hydroxylation. Ils ne devraient donc pas se former en quantité importante à bas TEL et à des doses modérées, comme c'est le cas pour ces composés. La différence de rapport m/z entre les deux pics correspond à celle d'une molécule d'eau, il est donc très probable que le second pic soit un peroxyde et le premier un peroxyde ayant formé un cluster avec une molécule d'eau. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que le fragment majoritaire de MS<sup>2</sup> du pic à 255 Th est justement d'un m/z de 237 Th.

Ce peroxyde existe sous deux formes, l'une « ouverte » (Trp-OOH) et l'autre « cyclique » (PIC-OOH) ayant une structure proche de celle du PIC. Ce dernier existe sous deux conformations (cis et trans) et est élué avant les produits mono-hydroxylés OH-Trp. Le pic à 6.2 min du chromatogramme peut correspondre à la forme ouverte, tandis que le pic à 4.5 min correspondrait à une coélution des deux formes cycliques du peroxyde. Par ailleurs, la spectrométrie de masse permet de visualiser deux pics de rapport m/z 255 qui n'en forment qu'un sur le détecteur UV-visible. Des pics à 273 Thomson sont également visibles, correspondant à un adduit à deux molécules d'eau.

Les analyses réalisées post-irradiation jusqu'à plusieurs heures voire jours après les irradiations n'ont pas montré de diminution significative de ce composé au profit d'autres produits, comme le PIC ou la NFK. Ce peroxyde, jusqu'ici jamais reporté comme produit final de radiolyse, semble donc suffisamment stable pour être considéré comme tel.

Aucun produit analogue à la 2,5-DOPA, observée dans le cas de la radiolyse de la phénylalanine sous faisceaux d'ions (Ludwig *et al.*, 2018), n'a été identifié dans le cas du tryptophane.

Cependant, comme pour Phe, des dimères se forment lors d'irradiations de Trp avec des ions en conditions aérées, alors qu'ils étaient jusque-là visibles uniquement lors d'irradiations sous atmosphère anoxique. Des dimères non hydroxylés et hydroxylés sont ainsi observés sur nos analyses, identifiés par spectrométrie de masse. Ceux-ci se forment très certainement au niveau des différentes positions du cycle indole (Garrison, 1987) suite à la rencontre de radicaux (OH-Trp<sup>•</sup>) ou Trp(C<sub>3</sub>)<sup>•</sup>. Ces espèces pourraient être particulièrement intéressantes dans un contexte biologique, ayant déjà été détectées dans des protéines et peptides (Carroll *et al.*, 2017).

Nous allons maintenant discuter de l'effet du TEL sur formation des produits de radiolyse de Trp, y compris le peroxyde identifié. Pour l'ensemble des sous chapitres traitants le sujet du tryptophane dans ce manuscrit, les différents composés seront regroupés selon le type d'attaque du radical hydroxyle menant à leur formation, selon le Tableau 4-1. Cela permettra de simplifier leurs représentations en raison du nombre important de produits de radiolyse du tryptophane.

Tableau 4-1 Tableau récapitulatif des produits de radiolyse majoritaires du tryptophane

Origine du composé	Produit de radiolyse	Acronyme
Arrachement d'H en position 1 (N) (=TrpOOH)	Peroxyde de tryptophane Peroxyde cyclique	TrpOOH
Addition de HO en position 2	N-Formyl-Kynurénine	NFK
	Kynurénine	Kyn
	1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-hydroxypyrrolo[2,3-b]-indole-2-carboxylic acid	PIC
	2-Hydroxy-Tryptophane Oxyindolalanine	2-OH-Trp
Addition de HO en position 4,5,6,7	4,5,6,7-Hydroxy-Tryptophane	4,5,6,7-OH-Trp
Dimérisation	Dimères	Trp <sub>2</sub>

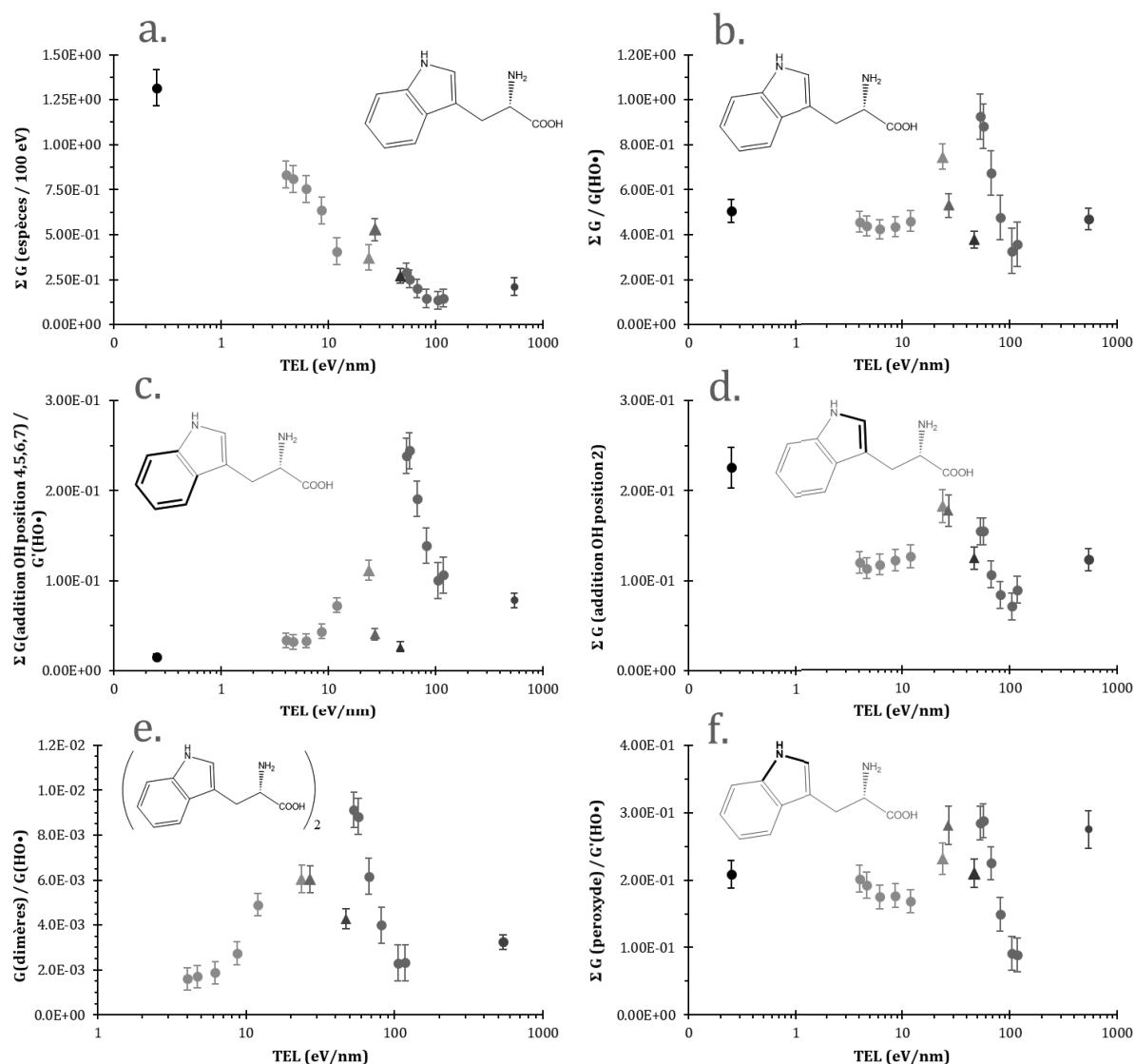
#### Les rendements intégraux - G

La Figure 4-14 présente l'évolution des rendements des différents produits de radiolyse du tryptophane, rassemblés selon la classification présentée dans le Tableau 4-1, en fonction du TEL et pour différents rayonnements ionisants. Les rendements présentés ici sont des rendements intégraux. Le graphique Figure 4-14-a. montre l'évolution de la somme des rendements « bruts ». Ces rendements diminuent fortement avec le TEL, et ce pour tous les rayonnements, de manière analogue à ce qui est observé pour HO•. La mesure dans les mêmes conditions de la radiolyse de l'eau et du tryptophane permet alors de représenter l'évolution de ces rendements pondérés par ceux de HO•, pour dissocier les effets spécifiques sur la radiolyse du tryptophane des effets sur le radical. Les autres rendements présentés sont les rendements pondérés par HO•, c'est-à-dire les rendements de la réaction avec le radical, car ayant plus de signification.

Pour la totalité des produits de radiolyse, un maximum de production semble être observé pour un TEL avoisinant les 80 eV/nm. Ce maximum est plus ou moins important selon le type de composé, en étant par exemple seulement un maximum local pour les produits issus d'une addition de HO en position 2. Le TEL optimum observé autour de 80 eV/nm concernant la production de produit de radiolyse s'approche d'un rendement de 100% par rapport à HO• pour la somme des rendements intégraux de tous les produits de radiolyse.

Les rendements obtenus pour les différents faisceaux sont en bon accord entre eux pour les différents produits de radiolyse, à l'exception des additions sur la partie benzénique du cycle indole.

Pour ces produits, les rendements obtenus avec les ions He et C d'énergie dégradée sont particulièrement faibles. Ces mesures ayant été réalisées à des débits de doses plus faibles que les autres mesures à TEL similaire (protons ou He de moyenne énergie), cela peut suggérer un potentiel effet du débit de dose très marqué sur ces composés.



La valeur de TEL observée pour l'optimum de rendement est similaire au TEL de l'optimum observé pour l'eau oxygénée, et rapporté dans la littérature. De plus, il est également similaire au TEL pour lequel la RBE (efficacité biologique relative) atteint son maximum (Weyrather & Kraft, 2004). Cette efficacité biologique optimale pourrait alors être corrélée à l'efficacité des altérations causées aux biomolécules par les effets indirects des rayonnements ionisants. De plus, la diminution observée après ce TEL fait écho au phénomène d'*overkill* considéré pour expliquer la diminution de la RBE pour des TEL plus élevés.

Comme évoqué dans la partie concernant la radiolyse de l'eau, les rendements intégraux pour un TEL moyen le long du parcours dans la solution n'a qu'un intérêt modéré, en raison de la grande variabilité du TEL en solution. Ainsi, les rendements différentiels, pour un TEL constant ou presque, apportent nettement plus d'informations.

### *Les rendements différentiels – G'*

La *Figure 4-15* présente l'évolution des rendements **différentiels** des produits de radiolyse du tryptophane en fonction du TEL et pour différents rayonnements ionisants. Les rendements mesurés avec des ions He et C de haute énergie ont été mesurés pour un TEL variant peu, et sont donc directement considérés comme différentiels. Les rendements différentiels pour les He et protons de moyenne énergie, représentés par une ligne continue, ont été obtenus par différenciation mathématique.

Ici encore, l'évolution des rendements tels que mesurés montrent une diminution similaire à celle observée préalablement sur HO•, mais ce sont bien les rendements pondérés par celui-ci qui nous apporteront le plus d'informations.

De manière globale, les observations à partir des rendements intégraux et des rendements différentiels ne sont pas les mêmes. Parmi ces rendements différentiels, les rendements obtenus par différenciation pour les He de moyenne énergie sont très différents des autres. La différence peut s'expliquer par le fort débit de dose utilisé avec ce faisceau, où la détermination des rendements différentiels a été réalisée au flux d'ions maximal de la MEXP du HIMAC ( $2.32 \times 10^6$  Gy/s). Ainsi, leur tendance particulière peut s'expliquer par un potentiel fort effet du débit de dose.

Concernant les autres rayonnements, l'effet est beaucoup plus modéré que pour les rendements intégraux, avec une gamme plus restreinte étudiée (jusqu'à 50 eV/nm ici pour 540 eV/nm pour les rendements intégraux). La somme des rendements ne semble ainsi pas être impactée du tout par une modification du TEL.

En revanche, des variations apparaissent tout de même lorsque l'on regarde les différentes catégories de composés.

Ainsi, une augmentation apparaît entre les électrons et les ions pour les produits issus d'une addition de OH sur le cycle benzénique et les dimères, et les rendements semblent se stabiliser pour les différents TEL étudiés avec les faisceaux de H<sup>+</sup>, He<sup>2+</sup> de haute énergie et C<sup>6+</sup>.

A l'inverse, les additions sur la partie pyrrolique diminuent entre électrons et ions et semblent se stabiliser ensuite. Les rendements du peroxyde semblent quant à eux augmenter légèrement et continuellement avec le TEL.

De façon globale, le TEL ne semble pas augmenter la quantité d'altérations produites sous irradiation sur le tryptophane. En revanche, le type d'altération et le site de celle-ci semblent être influencés par ce paramètre.

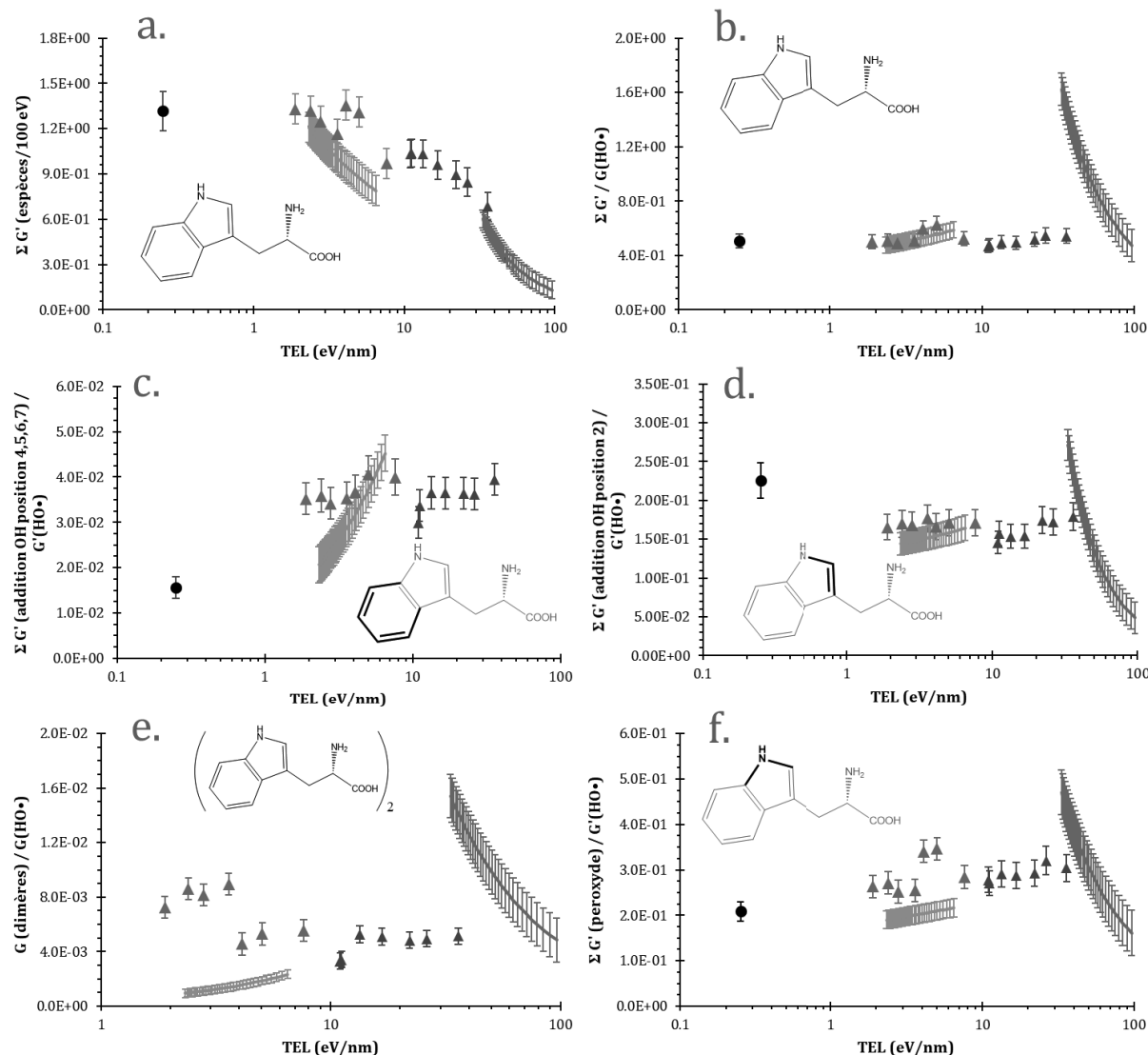


Figure 4-15 Evolution des rendements différentiels des produits de radiolyse de Trp regroupés par site d'action de HO• en fonction du TEL pour différents rayonnements : électrons de 1 MeV (●), protons de 24-6 MeV (ligne continue), He 6-21 MeV (ligne continue), He 230 MeV/nu à différentes profondeurs (▲), C de 400 MeV/nu à différentes profondeurs (▲)

- a. Somme des rendements bruts des produits de radiolyse  
 b. Somme des rendements des produits de radiolyse pondérés par  $G(\text{HO}\cdot)$   
 c. Somme des rendements des produits issus d'une addition de HO en position 4,5,6,7 pondérés par  $G(\text{HO}\cdot)$   
 d. Somme des rendements des produits issus d'une addition de HO en position 2 pondérés par  $G(\text{HO}\cdot)$   
 e. Somme des rendements des dimères pondérés par  $G(\text{HO}\cdot)$   
 f. Somme des rendements du peroxyde (arrachement d'H en position 1) pondérés par  $G(\text{HO}\cdot)$

### La régiosélectivité de l'action de HO•

Pour comparer la sélectivité des différentes attaques de HO• possibles sur les différentes positions du cycle indole, les proportions des différents produits sont présentées dans la Figure 4-16, pour des rendements différentiels.

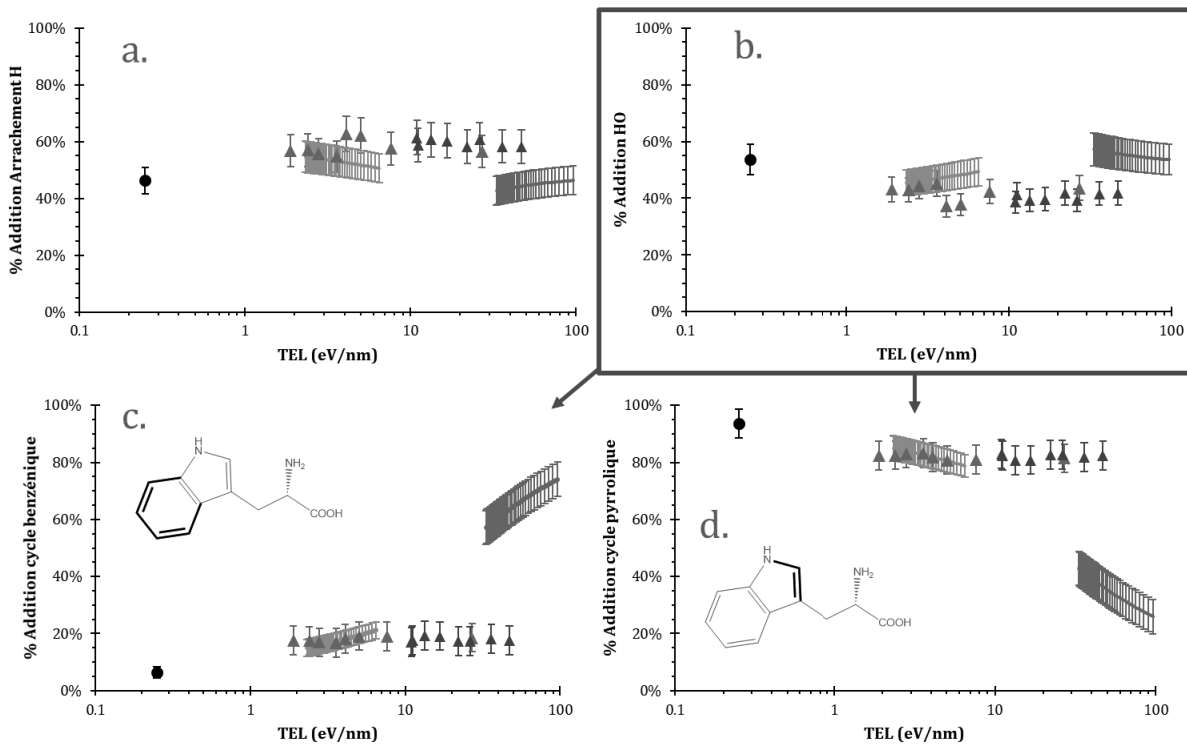


Figure 4-16 Evolutions des proportions des produits selon leur origine en fonction du TEL pour différents rayonnements : électrons de 1 MeV (●), protons de 24-6 MeV (ligne continue), He 6-21 MeV (ligne continue), He 230 MeV/nu à différentes profondeurs dans l'eau (▲), C de 400 MeV/nu à différentes profondeurs (▲)

a. Pourcentage d'arrachements d'hydrogène  
 b. Pourcentage d'additions de HO  
 c. Pourcentage d'additions en position 4,5,6,7 parmi les additions  
 d. Pourcentage d'additions en position 2 parmi les additions

Lorsque le TEL est faible, comme c'est le cas des électrons de 1 MeV ici, le ratio est approximativement de 50/50 entre additions de OH et arrachement d'un atome d'hydrogène en position 1. Dans ces conditions, la NFK est largement majoritaire parmi les produits résultant d'une addition, exactement comme cela est reporté dans les différentes études réalisées dans la littérature. Avec l'augmentation du TEL, les proportions des arrachements d'hydrogène en position 1 du cycle indole augmentent, de 46 à 58 %, au détriment des additions de OH sur le cycle.

A notre connaissance, le peroxyde (TrpOOH) n'a jamais été quantifié dans la littérature. Ainsi, pour pouvoir comparer nos résultats avec ces études, intéressons-nous aux proportions des additions de HO entre la position 2, soit sur la partie pyrrolique, et les positions 4,5,6,7, soit sur la partie benzénique.

A bas TEL, c'est-à-dire sous faisceau d'électrons de 1 MeV, 93% des produits de radiolyse provenant d'une addition découlent d'une localisation initiale de celle-ci en position 2 menant en grande partie à la formation de NFK qui représente plus de la moitié des additions à elle seule.

Lorsque le TEL augmente, les proportions de produits de radiolyse issus d'une addition changent, avec une diminution des produits présentant une altération sur la partie pyrrolique (2-OH-Trp, NFK, PIC) au profit de ceux présentant une hydroxylation sur le cycle benzénique (4,5,6,7-OH-Trp).



Ces produits représentant 7% du total des additions à bas TEL comptent pour 18% de celles-ci à 47 eV/nm. Encore une fois, les rendements obtenus par différenciation pour les hélions de moyenne énergie (ligne continue orange) sont complètement hors de gamme, et montrent un effet grandement amplifié. Le débit de dose pourrait, encore une fois, expliquer cette différence majeure suggérant alors un fort effet de ce paramètre d'irradiation sur la régiosélectivité de l'action de HO•, notamment concernant les additions sur le cycle indole ;

Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus par (Jovanovic & Kidri, 1983), où la NFK représentait 60% des produits de radiolyse quantifiés. D'autres études prenant en compte plus de produits de radiolyse ont montré des proportions de produits issus d'une addition de OH sur le cycle pyrrolique s'élevant à 80-90%, soit des valeurs très similaires à celles obtenues ici (van Wickern *et al.*, 1997). Comme déjà évoqué dans le premier chapitre de ce manuscrit, ces proportions ne sont toutefois pas en accord avec celles mesurées pour les intermédiaires réactionnels par Solar *et al.* sous faisceaux pulsés d'électrons de 3 MeV (Solar *et al.*, 1984b). Cela suggère ainsi qu'un réarrangement est possible suite à l'attaque de HO•.

Les effets de TEL ainsi étudiés sur le tryptophane semblent n'avoir qu'un effet modéré sur les altérations globales observées sur l'acide aminé. En revanche, la régiosélectivité des attaques du radical hydroxyle semble être affectée par des modifications de ce paramètre, avec une augmentation des additions de OH sur la partie benzénique du cycle indole. Cet effet semble grandement amplifié pour les rendements obtenus à très haut débit de dose, suggérant une potentielle forte influence de ce paramètre sur la régiosélectivité de l'action de HO•. Cet aspect sera traité en détail dans le **Chapitre 6** - de ce manuscrit.

### 3/ De l'acide aminé au peptide : L'aspartame

Dans le contexte d'une étude des altérations de la structure primaire des peptides et protéines sous irradiations de solutions aqueuses, l'étape suivant l'acide aminé est le petit peptide. L'aspartame, dipeptide constitué d'un résidu Phe C-méthylé et d'un résidu Asp est donc un candidat de choix pour débiter cette étude. L'objectif est ici de déterminer si les spécificités liées à la radiolyse par des ions de la phénylalanine persistent lorsque celle-ci est impliquée dans une liaison peptidique.

Les rendements de production des différentes espèces par rapport à HO• sous irradiation par des RX de 6 MeV et des H<sup>+</sup> de 2 MeV sont présentés dans la *Figure 4-17*. Les irradiations ont été réalisées en conditions aérées et au temps de capture habituel pour les biomolécules, 74ns.

Les rendements de production des tyrosines de la phénylalanine sont plus importants que ceux de l'aspartame, car ce dernier présente plus de sites de réactions potentielles du radical hydroxyle, malgré une compétition en faveur d'une attaque sur le cycle benzénique. Quelle que soit la molécule, les dimères sont absents lors des irradiations par des rayons-X et les trois DOPA ne sont formées qu'en très faibles quantités, probablement par suroxydation.

En revanche, sous irradiation par des protons de 2 MeV, des dimères sont observés pour l'aspartame, ainsi qu'une quantité importante de 2,5-DOPA, qui devient alors un des produits majoritaires de la radiolyse du petit peptide, exactement comme pour la phénylalanine. Les autres DOPA restent formées en faible quantité.

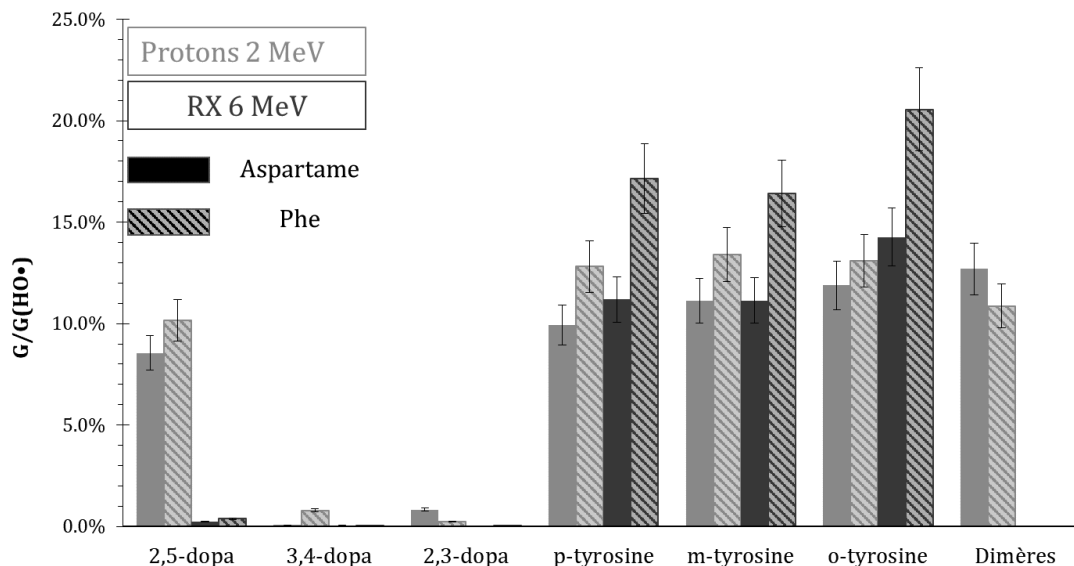


Figure 4-17 Histogramme représentant les rendements de production ( $G(x)/G(HO\bullet)$ ) des produits de radiolyse de l'aspartame (rectangles hachurés) et de Phe (rectangles pleins) sous irradiation par des protons de 2 MeV (en orange) et pas des rayons X de 6 MeV (en bleu).

Ceci suggère que la 2,5-DOPA se forme par un mécanisme spécifique sous irradiation par les ions à TEL élevé pour justifier une quantité aussi élevée. Dans le cas de la phénylalanine, l'espèce identifiée comme responsable de cette augmentation importante était le radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ .

En effet, à TEL élevé, la densité importante de radicaux favorise les recombinaisons radicalaires, donc avec  $O_2^{\bullet-}$ , lequel provient de la capture de  $e_{aq}^-$  par le dioxygène ou éventuellement de l'ionisation multiple de l'eau qui survient alors (Meesungnoen & Jay-Gerin, 2005b).

Le radical superoxyde pourra alors réagir avec le radical hydroxycyclohexadiényle, radical intermédiaire résultant de l'action du radical hydroxyle sur le cycle benzénique du résidu phénylalanine, pour former de la 2,5-DOPA, de façon analogue au mécanisme proposé pour la phénylalanine (Ludwig, 2018; Ludwig *et al.*, 2018). L'augmentation très significative des quantités de dimères mesurées est également liée à la densité de radicaux, les dimères résultants directement d'une réaction radical-radical.

Cette étude nécessitera d'être approfondie pour déterminer précisément les mécanismes de formation des produits de radiolyse de l'aspartame. Les premiers résultats obtenus ici suggèrent que les mécanismes de radiolyse de la phénylalanine avec des ions ne sont pas fondamentalement modifiés lorsque celle-ci est incluse dans un peptide, ou du moins dans un peptide de cette taille. L'étude de systèmes comportant un plus grand nombre de résidus pourra aussi apporter plus de réponses.

## Conclusion partielle

Le présent chapitre détaille une étude systématique des effets du TEL sur la radiolyse de petites biomolécules protéiques en milieux aqueux.

La première partie est consacrée à l'étude de la radiolyse de l'eau, et plus particulièrement aux deux oxydants forts que sont le radical hydroxyle et l'eau oxygénée. Ces derniers sont à l'origine de la formation de produits de radiolyse sur les biomolécules. Ainsi, leur étude est essentielle afin d'étudier les effets spécifiques sur ces biomolécules.

Les effets observés ont été comparés à la littérature et ont montré un excellent accord avec les résultats déjà publiés. Ainsi, le TEL impacte grandement les rendements mesurés du radical hydroxyle, avec une réduction de ce dernier suite à des réactions de recombinaisons des espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau. Toutefois, le TEL ne semble pas être parfaitement représentatif du dépôt d'énergie en solution. En effet, une grande partie de l'énergie est déposée par les électrons secondaires émis lors de l'interaction entre le rayonnement primaire et la matière, dont le TEL ne tient pas compte.

Parallèlement, l'eau oxygénée étant un produit moléculaire issu de la recombinaison des espèces radicalaires, son rendement augmente avec le TEL. Cette augmentation n'est toutefois pas continue, car au-delà d'un certain TEL seuil, les rendements diminuent légèrement. Cette espèce est toutefois nettement moins sensible aux effets du TEL que le radical hydroxyle, laissant supposer que la recombinaison de HO• avec lui-même n'est pas la réaction principale menant à la diminution de son rendement lorsque le TEL augmente.

Concernant les biomolécules en solution, cette étude est la première portant sur les effets du TEL sur le tryptophane et la méthionine.

Le TEL a un fort impact sur les rendements du méthional, l'un des deux produits majoritaires de la radiolyse de la méthionine libre en solution. Il intervient également dans la production du sulfoxyde de méthionine, dont la quantité augmente avec le TEL, à quantité d'eau oxygénée égale. L'augmentation conjuguée de ces deux espèces, atteignant voire dépassant pour le sulfoxyde un rapport de 1/1 suggère alors que d'autres espèces interviennent dans la formation de ces produits à haut TEL.

Un produit jusqu'ici jamais quantifié dans la radiolyse du tryptophane a pu être identifié et quantifié dans cette étude, il s'agit d'un peroxyde formé en position 1 du cycle indole de Trp provenant d'un arrachement d'hydrogène sur l'atome d'azote situé en position 2.

D'après les résultats obtenus pour des mesures intégrales, un maximum de production de produits de radiolyse est observé pour un TEL de 80 eV/nm. Ce TEL étant celui où l'efficacité biologique des rayonnements ionisants est maximale, cette efficacité pourrait alors être liée aux rendements de production des produits de radiolyse. Les rendements différentiels ne présentent pas cet optimum de production de produits de radiolyse, et les effets observés sont beaucoup plus modérés.

Lorsque le TEL augmente, les proportions des différents produits sont modifiées, avec une augmentation des produits issus d'une addition de OH sur la partie benzénique du cycle indole du tryptophane au détriment des additions en position 2.

Cet effet est toutefois à relativiser, car il est surtout marqué pour les expériences où le débit de dose, en plus du TEL, était très élevé. Ce paramètre d'irradiation pourrait donc avoir une influence très marquée sur ce système, qui sera discutée en détail dans le **Chapitre 6**.

Lorsque la phénylalanine est impliquée dans un peptide, comme c'est le cas dans l'aspartame, nos expériences ont montré qu'on retrouvait des mécanismes similaires, avec la formation de produits spécifiques aux ions accélérés, la 2,5-DOPA et les dimères, dans des proportions très similaires à l'acide aminé isolé.

---

**Chapitre 5 - Evolution des rendements le long  
de la courbe de Bragg - Etude de la  
fragmentation des faisceaux d'ions**

---

## Abstract

Interaction of ions with matter leads to the production of secondary particles, whether by fragmentation of the target or by fragmentation of ions themselves. These fragments are emitted at various angles around the primary beam and as they are of smaller LET they can penetrate further than the Bragg peak of the primary beam. This fragmentation can create complications during treatments and must then imperatively be taken in account.

The present chapter aims to study the evolution of the radiolytic yields of different species of water radiolysis ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  during the PhD work of S. Chefson) and biomolecules all along the Bragg curve. We used 400 MeV/nu Carbon ions in the BIOROOM of HIMAC and 230 MeV/nu Helium ions in the physics room. These two beams can penetrate deeply in matter, and radiolytic yields were measured along their path and after the Bragg peak, using multiple PMMA UV cells. We measured this evolution for the three main species in the same conditions, and at several scavenging times. While hydrogen peroxide yield was not clearly modified along the track, solvated electron and hydroxyl radical showed a joined evolution with depth and LET. This evolution, correlated to the flat trend of hydrogen peroxide, suggests that the recombination of  $\text{HO}^\bullet$  and  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  is the main reaction responsible for the diminution of their radiolytic yields.

After the Bragg peak, measurements allowed to evaluate the impact of fragmentation on water radiolysis and protein biomolecules radiolysis with the model amino acid tryptophan. Yields were determined thanks to dose measurements using an ionizing chamber all along the path of the ions. Yields obtained after C-ions Bragg peak were similar to that measured with He ions at the same depth.

With He ions, fragmentation on a polyethylene target was studied at angles from  $5^\circ$  to  $30^\circ$ , with sensitive chemical dosimeters. Radiolysis products of C3CA and phenylalanine were measured, formed by water radiolysis caused by the fragments.

## A/ Etat de l'art sur la fragmentation des ions

Durant leur pénétration dans la matière, et donc durant un traitement, une fraction des ions lourds fragmente par réactions nucléaires. Ceci induit un changement de la composition du faisceau le long de la courbe de Bragg ainsi qu'un dépôt de dose après le pic de Bragg, notamment dans le cas des ions carbone (Hartmann *et al.*, 2017).

Ainsi, après ce pic de Bragg se trouvera en réalité un dépôt de dose potentiellement non négligeable issu de particules secondaires provenant du faisceau initial, plus légères, et qui auront donc une profondeur de pénétration supérieure. Cette fragmentation est d'autant plus importante que l'énergie du faisceau d'ions est élevée et donc la profondeur traversée l'est également.

Avec des ions carbone d'énergie 290 MeV/nu, la majeure partie de l'énergie déposée au-delà du pic de Bragg provient d'ions bore et hélium, qui présentent par ailleurs un maximum de dépôt d'énergie à la même profondeur (Ying *et al.*, 2017). Les proportions en nombre sont toutefois différentes. Ainsi, en quantité totale, les protons sont les fragments les plus représentés, suivis de près par les hélions. Lesdits fragments sont émis dans différentes directions autour de la trace de l'ion initial (angle < 10°), et à un angle inférieur à 3.5 degrés ce sont les hélions qui sont les fragments les plus représentés (Haettner *et al.*, 2013). Parmi ces hélions, les <sup>4</sup>He sont largement majoritaires, et les <sup>3</sup>He représentent 20 % des He totaux (H.-F. Ou *et al.*, 2017).

Cette même étude a démontré qu'un faisceau d'ions carbone de 200 MeV/nu aboutit à un taux de fragmentation de 30% dans le pic de Bragg, qui atteint 70% pour des faisceaux d'ions C de 400 MeV/nu. Immédiatement après le pic de Bragg, la dose déposée par les fragments représente 10 % de la dose dans le pic de Bragg, et ce dépôt est encore de 5% 10 cm après le pic de Bragg. Ceci induit un dépôt de dose non négligeable dans les tissus sains situés au-delà du volume tumoral (H.-F. Ou *et al.*, 2017).

La fragmentation dépend bien entendu fortement du Z du rayonnement initial. Ainsi, les faisceaux d'He fragmentent peu, ce qui fait d'eux des candidats potentiellement plus intéressants pour la thérapie qu'initialement escompté (Zeitlin & La Tessa, 2016).

Il est important de considérer également la fragmentation des tissus cibles. Ainsi, même si les protons ne fragmentent pas, ils engendreront des particules secondaires par fragmentation des tissus en les traversant. Ils ne sont donc pas totalement exempts du phénomène de fragmentation qui peut avoir un réel effet durant un traitement (Bellinzona *et al.*, 2021).

Des études de radiobiologie ont été réalisées sur les effets biologiques de ces particules secondaires, qui valident les risques qu'ils représentent. Ainsi, l'existence d'une dose létale a été observée après le pic de Bragg dans des expériences *in vitro* (Buglewicz *et al.*, 2019). Des dommages à l'ADN ont été mesurés après le pic de Bragg, jusqu'à une distance d'au moins 10% de la profondeur de pénétration, avec des ruptures doubles brins, donc des altérations difficiles à réparer et pouvant causer des tumeurs radio-induites (H. Ou *et al.*, 2018).

A ce jour et à notre connaissance, aucune caractérisation des effets chimiques sur des biomolécules n'est abordée dans la littérature. La plupart des études portent sur des caractérisations physiques de ces fragments.

Les travaux portant sur la radiolyse sont rares et restent focalisées sur la radiolyse de l'eau, notamment sur la production du radical hydroxyle. (Appleby & Christman, 1985) ont observé que les rendements le long de la courbe de Bragg d'ions C, Néon (Ne) et Ar étaient plus élevés qu'en théorie ou sous irradiation par des ions produits directement à la même énergie, donc sans fragmentation. Ceci confirme des effets chimiques de la fragmentation du faisceau durant le parcours dans la matière. Aucune mention n'est faite des fragments après le pic de Bragg dans cette étude. Seule l'étude de (Maeyama, Yamashita, Taguchi, *et al.*, 2011) s'y est intéressé, en quantifiant précisément le rendement de HO• sur quelques millimètres avant et après le pic de Bragg. Celui-ci s'est avéré plus élevé que le rendement mesuré dans le faisceau, en accord avec un TEL plus faible des fragments légers.

## B/ Radiolyse de l'eau dans la trace

Nous avons mesuré des cinétiques d'évolution des rendements en HO•,  $e^-_{aq}$  et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les principales espèces réactives engendrées par radiolyse de l'eau, le long de la trace d'ions carbone 400 MeV/nu, parfois avec plusieurs sondes moléculaires. Les rendements en HO• et  $e^-_{aq}$  ont été déterminés à un temps de capture de 74ns le long de la trace d'hélium de 230 MeV/nu. Ces mesures simultanées des espèces, dans des conditions identiques, pourront être très utiles pour la simulation de la radiolyse de l'eau sous irradiation par des ions. Nous les avons utilisés également pour mieux comprendre les mécanismes de radiolyse des biomolécules qui nous intéressent.

### 1/ Dépôt de dose mesuré et simulé

Pour réaliser les irradiations par des ions lourds de haute énergie au HIMAC, les échantillons ont été placés dans le portoir nommé Le PEIGNE. Les rendements des espèces d'intérêt ont pu être mesurés le long de la courbe de Bragg des ions et au-delà, avec une résolution de 1 cm. Celle-ci est adaptée dans le plateau, mais englobe tout le pic de Bragg dans un seul échantillon en fin de parcours. Comme précisé dans le **Chapitre 2 - C/** de ce manuscrit, la détermination de la dose a été réalisée à l'aide de chambres d'ionisation (CI) pour les faisceaux C de 400 MeV/nu et He de 230 MeV/nu.

Des simulations SRIM avaient été réalisées au préalable pour estimer les doses théoriques dans les différentes cuves (Ziegler *et al.*, 2010). Elles avaient également pour but de s'assurer que le pic de Bragg se trouvait bien au sein d'une cuve, et non dans une paroi de cuve en PMMA.

La reconstruction de la courbe de dose réelle présente un maximum de dépôt d'énergie à une profondeur plus faible que celle estimée par nos calculs (*Figure 5-1*). Les simulations SRIM ont été réalisées en considérant un dépôt dans de l'eau pure, après avoir tenu compte de la distance d'air parcourue.



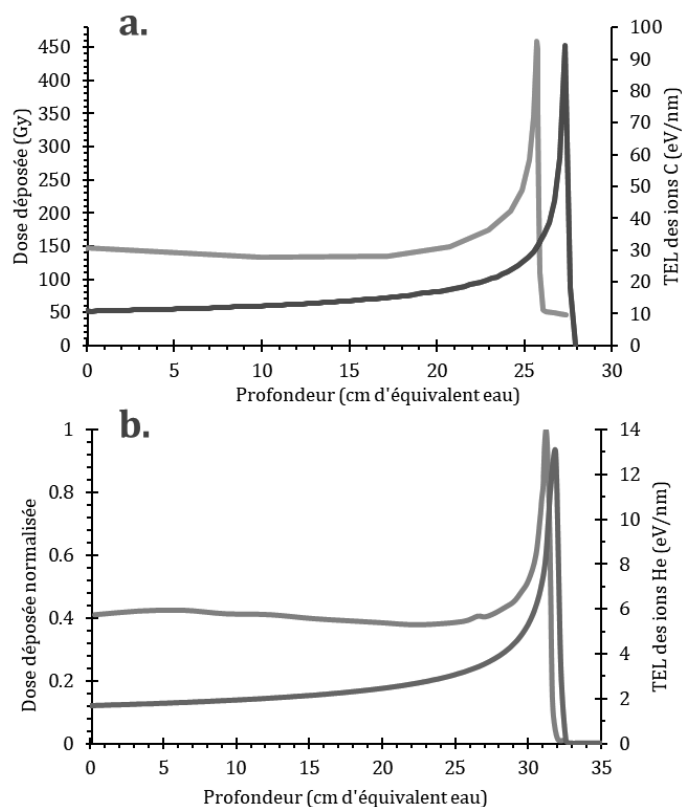


Figure 5-1 Comparaison de la courbe Bragg par simulation SRIM et du dépôt de dose réel pour a.) Des ions C de 400 MeV/nu (Simulation en rouge et dépôt de dose en bleu) b.) des ions He de 230 MeV/nu (Simulation en orange et dépôt de dose en bleu)

Ainsi, pour des ions C de 400 MeV/nu, la profondeur que nous avons estimée était de 27.5 cm, valeur tout à fait en accord avec ce qui peut être trouvé dans littérature pour ce type de faisceau (Francis *et al.*, 2014). Pourtant, le maximum de dépôt déterminé par la CI se trouve à 25.9 cm pour le même faisceau. De plus, alors que la différence de TEL entre le plateau et le pic de Bragg est d'un facteur 10 (d'après SRIM et avec la précision utilisée à cette échelle de profondeur), on retrouve seulement un facteur 3 avec la chambre d'ionisation. Cette différence entre le plateau et le pic de Bragg s'explique par la diffusion et la fragmentation des ions C qui est extrêmement importante sur des faisceaux de cette énergie, comme l'avaient montré Haettner *et al.* en 2013, avec 30% d'ions C restant au niveau du pic de Bragg. La fragmentation réduit considérablement le dépôt de dose en substituant les ions C par des ions plus légers. (Maeyama, Yamashita, Taguchi, et al., 2011) ont également mesuré expérimentalement la position du pic de Bragg du même faisceau dans une épaisseur d'équivalent eau et ont également obtenu un maximum de dépôt d'énergie localisé légèrement avant 26 cm, et ces expériences ont aussi été réalisées dans la BioRoom du HIMAC. Ainsi, la différence de profondeur pourrait provenir de l'énergie des ions qui n'est pas tout à fait de 400 MeV/nu, probablement en raison du traitement du faisceau, comme les mesures avec une chambre d'ionisation en amont de la zone d'irradiation.

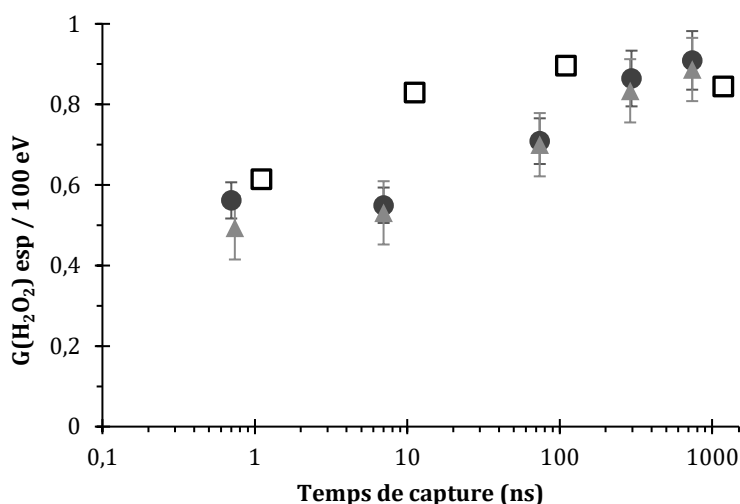
Pour les hélions, la différence entre la position du pic de Bragg simulée et le maximum de dépôt de dose est plus faible que pour les ions C.

Dans les deux cas, les données expérimentales des chambres d'ionisation ont été utilisées.

## 2/ L'eau oxygénée - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les irradiations réalisées dans la BioRoom du HIMAC par des ions C de 400 MeV/nu ont permis d'étudier les rendements de production de l'eau oxygénée le long de la courbe de Bragg à différents temps de capture (0.74, 7.4, 74, 296 et 740 ns) du radical hydroxyle, à l'aide de Br<sup>-</sup> comme piègeur de HO<sup>•</sup>, en présence de nitrate de sodium (25mM) et sous argon. Il a ainsi été possible de retracer la cinétique de formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> le long de la courbe de Bragg. Les résultats à une profondeur de 24 cm (TEL = 36 eV/nm) sont présentés dans la *Figure 5-2* et sont comparés à des données issues de la littérature avec des ions carbonés de TEL similaire (TEL = 30 eV/nm, énergie 1,14 GeV), mais non fragmentés (Wasselin-Trupin *et al.*). Les rendements mesurés avec des ions He de 230 MeV/nu sont également représentés. Il s'agit ici de rendements différentiels, les ions traversent complètement la cellule avec une variation de TEL suffisamment faible pour que celui-ci soit considéré comme constant.

Comme attendu, le rendement en eau oxygénée diminue aux temps courts à partir d'une capture à 300ns, car HO<sup>•</sup> est capturé avant de pouvoir recombiner avec lui-même pour former H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



*Figure 5-2 Evolution de G(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en fonction du temps de capture pour des ions C à une profondeur de 24 cm (TEL = 36 eV/nm) (cette étude, ●), des ions He de 230 MeV/nu (cette étude, ▲) et des ions C de 1140 MeV (TEL = 30 eV/nm, □, (Wasselin-Trupin et al., 2002))*

Les données obtenues pour les ions C sont en très bon accord avec la littérature pour les rendements mesurés à temps long et à temps très court. La cinétique que nous avons mesurée montre toutefois des rendements augmentant plus lentement pour atteindre le plateau des temps longs. Il est à noter que le TEL utilisé ici pour le faisceau est calculé sur SRIM, qui ne tient pas compte de la fragmentation des ions C. Le TEL « moyen » à une même profondeur est en réalité plus faible et donc potentiellement plus proche du TEL des ions C « purs » de l'étude Wasselin-Trupin *et al.*

Concernant les ions He, il s'agit ici d'ions purs, non dégradés, ayant un TEL calculé à 1.7 eV/nm. La cinétique obtenue est très similaire à celle obtenue avec les ions C. Ceci montre que les rendements ne sont que peu impactés par le TEL et la nature des ions dans cette gamme.

La *Figure 5-3* présente l'évolution du rendement radiolytique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  le long de la trajectoire des ions C dans l'eau, aux différents temps de captures investigués. Quel que soit le temps de capture, le rendement est constant jusqu'à une profondeur de 25 cm, puis il chute au niveau du pic de Bragg, et atteint au-delà du pic de Bragg des valeurs supérieures à celles mesurées dans le plateau.

L'eau oxygénée est une espèce relativement peu sensible aux variations du TEL, ou en tout cas beaucoup moins que les espèces radicalaires comme  $\text{HO}^\bullet$ . D'après (Pastina & LaVerne, 1999),  $G^\infty(\text{H}_2\text{O}_2)$  vaut 0.7 esp/100 eV pour des rayons  $\gamma$  et atteint seulement 0.9 esp/100 eV pour des  $\text{C}^{6+}$  ayant un TEL de 700 eV/nm (rendements intégraux), avec un rendement maximum de 1.0 esp/100 eV pour des hélium ayant un TEL moyen de 150 eV/nm.

Le rendement stable de cette espèce observé sur le plateau de la courbe de Bragg n'est donc pas surprenant, les variations de TEL restant modérées sur cette portion, de 11 eV/nm dans la première cuve à 31 eV/nm dans la cuve précédant le pic de Bragg.

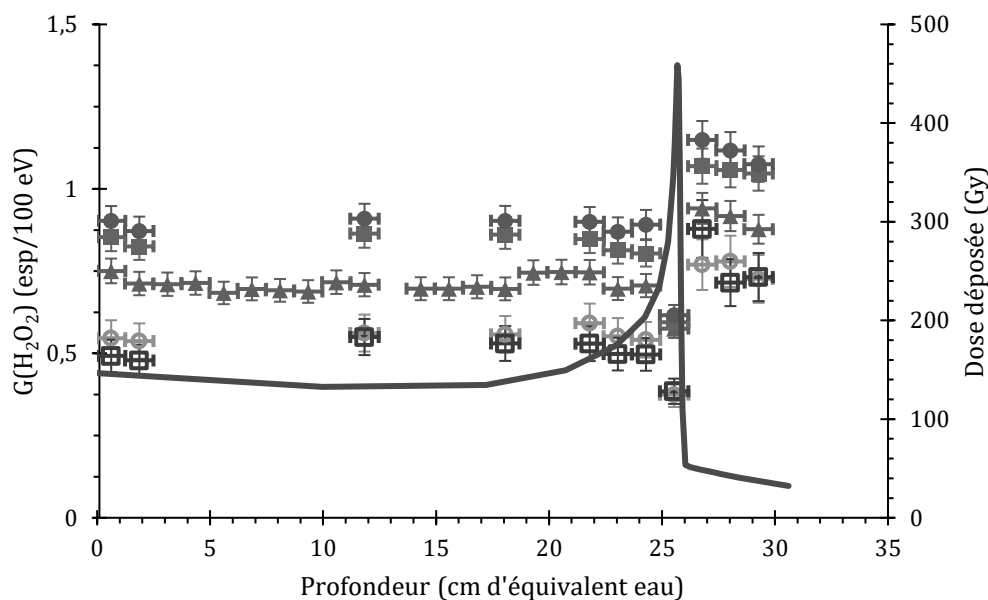


Figure 5-3 Evolution de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  le long de la courbe de Bragg (en rouge, dépôt de dose mesuré par les opérateurs du HIMAC) à différents temps de capture, 740 ns ( $\bullet$ ), 296 ns ( $\blacksquare$ ), 74 ns ( $\blacktriangle$ ), 7.4 ns ( $\circ$ ) et 0.74 ns ( $\square$ ).

La diminution du rendement observée dans la cuve du pic de Bragg est plus étonnante. En effet, le mécanisme majoritaire de formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sous atmosphère inerte est la recombinaison  $\text{HO}^\bullet + \text{HO}^\bullet$ , qui devrait être favorisée par une densité d'énergie déposée plus élevée. Ainsi,  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  augmente avec le TEL jusqu'à atteindre un seuil critique à partir duquel le rendement diminue (Pastina & LaVerne, 1999), comme illustré sur la *Figure 4-5* du chapitre précédent. Ce TEL seuil n'est pas clairement défini, mais semble se situer à une centaine d'eV/nm. Cette valeur seuil est nettement plus élevée que le TEL moyen des ions C dans la cuve associée au pic de Bragg, estimé à 47 eV/nm. Cependant, comme cela a été discuté, le TEL moyen a une représentativité très limitée. Ainsi, les ions C atteignent dans cette cuve leur TEL maximum, qui est supérieur à 900 eV/nm, d'après les simulations SRIM. Le TEL varie donc très fortement sur une faible profondeur, et le seuil critique est donc probablement atteint.

Les rendements étant stables en amont de la cuve du pic de Bragg, cette diminution observée uniquement dans celle-ci pourrait également s'expliquer par une estimation difficile de la dose dans cette cuve à l'aide des données de la chambre d'ionisation, menant à une sous-estimation.

Au-delà du pic de Bragg, le dépôt de dose provient de particules secondaires (ions/électrons) issues de la fragmentation du faisceau d'ions C. Ces fragments ont ainsi un TEL bien plus faible que les ions du faisceau primaire. Pour l'eau oxygénée, un rendement plus faible que celui mesuré le long de la trajectoire aurait été attendu. Cependant, les rendements mesurés sont au contraire plus élevés, pour tous les temps de capture (*Figure 5-3*). Une première hypothèse serait de supposer une sous-estimation de la dose mesurée par la chambre d'ionisation dans la zone des fragments. Si celle-ci ne tenait pas compte de certains fragments, ceci pourrait expliquer les rendements importants mesurés. Ceci pourrait être le cas si des fragments de la cible (eau ou PMMA) étaient produits, avec des énergies trop faibles pour pénétrer la chambre d'ionisation. Cependant, l'homogénéité des rendements mesurés dans les trois cuves (> 3 cm en équivalent eau) n'est pas compatible avec des fragments de très faibles énergies, qui ne pourraient pas dépasser la première cuve.

Lorsqu'on compare les cinétiques d'évolution du rendement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le plateau, dans la cuve du pic de Bragg et dans la région des fragments, on remarque que les cinétiques du plateau et des fragments ont la même évolution avec une différence constante en eau oxygénée, de 0.2 esp/100 eV (*Figure 5-4*). Cette différence, déjà présente au temps le plus court étudié, 0.74 ns, indique que le rendement plus important mesuré dans la zone des fragments pourrait provenir de réactions à temps très courts, inférieur à 0.74 ns. Cette observation n'explique cependant pas à ce stade les rendements supérieurs obtenus dans une zone irradiée a priori par des particules de TEL plus faibles. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer l'origine de cette production importante d'eau oxygénée, par rapport à l'énergie déposée, après le pic de Bragg.

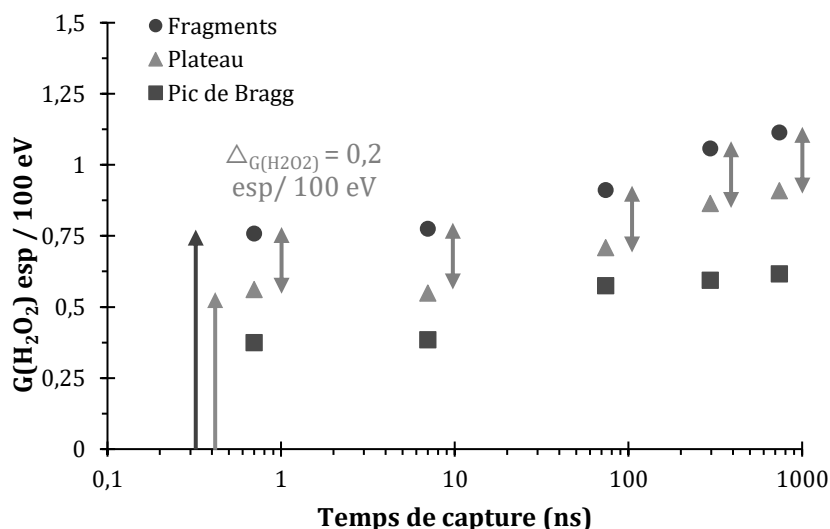


Figure 5-4 Evolution de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  en fonction du temps de capture dans le plateau de la courbe de Bragg (▲), dans le pic de Bragg (■) et dans les cuves irradiées par les fragments du faisceau primaire (●). La Double flèche Turquoise indique la différence constante entre les rendements mesurés dans le plateau et au niveau des fragments.

### 3/ Le radical hydroxyle - HO•

Comme pour le peroxyde d'hydrogène, la mesure du rendement radiolytique de HO• a été réalisée dans la BioRoom du HIMAC avec un faisceau d'ions C de 400 MeV/nu, à différents temps de capture, tout le long de la courbe de Bragg.

Pour ce radical, trois sondes ont été utilisées simultanément : KBr/formiate, TA et C3CA. La mesure des rendements a également été réalisée le long de la trajectoire d'ions He de 230 MeV/nu, au seul temps de capture de 74ns. Des données ont également été acquises pour la mesure de l'électron hydraté, dans le cadre de la thèse de Séverine Chefson, afin d'avoir une vision globale des espèces majeures de la radiolyse de l'eau.

#### *Les ions C de 400 MeV / nu*

Les cinétiques du rendement en radical HO• mesurées pour différentes profondeurs de pénétration du faisceau d'ions sont présentées dans la *Figure 5-5 (a.-c.)*. Comme escompté,  $G(\text{HO}\cdot)$  diminue avec le temps de capture, en raison des recombinaisons du radical avec lui-même ou par réactions avec d'autres espèces au cours du temps. Concernant l'inter-comparaison des sondes, la C3CA et le système KBr/formiate ont permis d'obtenir des rendements tout à fait similaires. La sonde TA montre également un excellent accord avec les deux autres dès lors que le taux de production du 2-OH-TA, c'est-à-dire de la réaction de TA avec HO•, est réévalué à haut TEL (*Figure 3-9*). Le bon accord avec la littérature à pleine énergie des ions carbone, que ce soit avec des données expérimentales, mesurées avec la C3CA, ou de simulation, valide également les résultats obtenus avec les trois sondes. La *Figure 5-5-e.* représente l'évolution de  $G(\text{HO}\cdot)$  le long de la trajectoire des ions C pour les trois sondes à un temps de capture de 74 ns. Le rendement observé est stable sur plusieurs cm, avant de diminuer progressivement jusqu'à une chute brusque au niveau du pic de Bragg. Comme pour l'eau oxygénée, le rendement mesuré est plus faible que ceux de la littérature, si on considère un TEL moyen de 47 eV/nm. Ainsi, Maeyama et al. obtiennent un rendement de 1,2 esp/100 eV à ce TEL (Maeyama, Yamashita, Baldacchino, *et al.*, 2011), à comparer à la valeur de 0,72 esp/100 eV mesurée ici avec la sonde KBr/formiate. Ici encore, cela pourrait s'expliquer par le fait que considérer le TEL moyen n'est pas adapté en raison de la variation trop importante de TEL dans la cuve de 1 cm.

Pour la sonde TA, nous avons montré que le taux de production du 2-OH-TA diminuait avec le TEL dans le **Chapitre 3** - Dans la cuve où se produit le pic de Bragg, les rendements obtenus avec les sondes organiques sont plus faibles que les rendements radiolytiques obtenus avec la sonde KBr/formiate, ce qui pourrait également s'expliquer par le TEL maximal très élevé qu'atteignent les ions Carbone dans cette zone.

Dans leur étude montrant la stabilité du taux de production de la 7OH-C3CA avec le TEL, (Maeyama, Yamashita, Baldacchino, *et al.*, 2011) ont réalisé des mesures avec des ions qui traversaient totalement les solutions, à l'exception des ions Xe, pour lesquels le pic de Bragg était atteint en solution. Il est fait mention du taux de production de la 7-OH-C3CA qui évoluerait pour les TEL « extrêmement élevés », ce qui s'accorde bien avec les résultats observés dans notre étude.

Les données obtenues avec la sonde KBr/formiate, indépendante des variations de TEL, apparaissent donc comme étant les plus représentatives de l'évolution de  $G(\text{HO}\cdot)$  dans la dernière cuve.

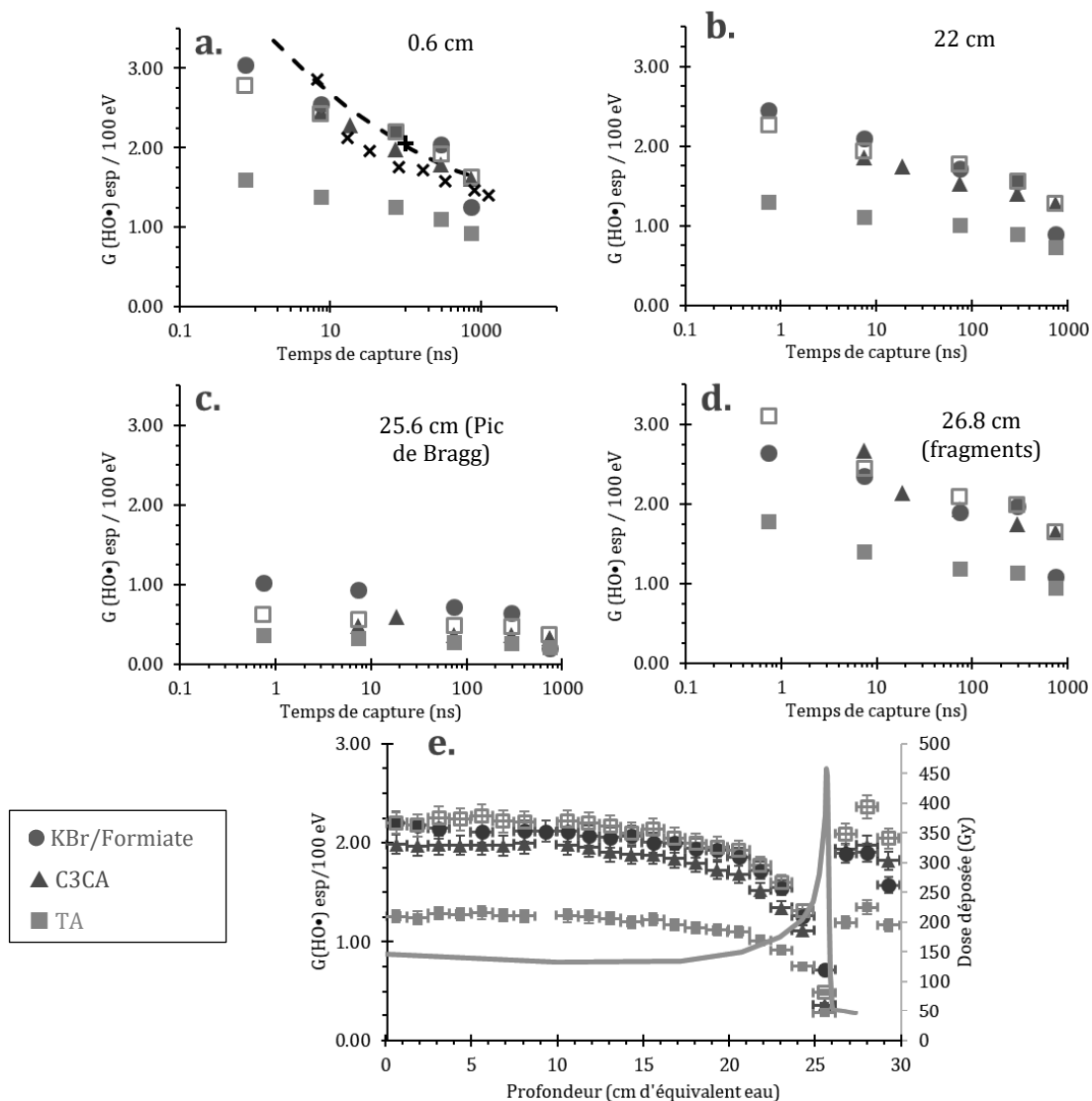


Figure 5-5 a-c. : Cinétiques du radical hydroxyle pour les différentes sondes : KBr/formiate (●), C3CA (▲), TA ( $\gamma=20\%$ , □) et TA ( $\gamma=35\%$ , ■) ; Les données en noir sont des données de la littérature avec ions C de 400 MeV/nu à savoir (Baldacchino et al., 2009) × (Yamashita, Katsumura, Lin, Muroya, Miyazaki, & Murakami, 2008a) + et --- (simulations). Les différents graphiques correspondent à différentes profondeurs. a. à 0.6cm (première cuve), b. à 22cm, c. à 25.6 cm (pic de Bragg) et d. à 26.8 cm (fragments).

e. : évolution des rendements le long de la courbe de Bragg (en bleu) pour les différentes sondes à un temps de capture de 74ns. Les barres d'erreur en x représentent l'épaisseur d'une cuve.

D'autres études expérimentales ont été réalisées le long d'une partie de la trace d'ions carbone (Maeyama, Yamashita, Taguchi, et al., 2011)(Appleby & Christman, 1985), avec lesquelles nos données peuvent être comparées (Figure 5-6).

Maeyama *et al.* ont réalisé en 2011, une étude portant sur la fragmentation des faisceaux d'ions C de 400 MeV/nu, avec des mesures réalisées en amont et en aval du pic de Bragg, avec la sonde C3CA, à un temps de capture de 100 ns. Appleby *et al.*, quant à eux, ont réalisé des mesures sur la fin du plateau d'ions carbone de 400 MeV/nu, à l'aide de la sonde KBr/formiate, à différents temps de capture.

Comme présenté sur la *Figure 5-6*, nos données sont en très bon accord avec ces deux études, et les complètent le long de la trace, dans la zone des fragments, et avec des mesures à d'autres temps de capture.

Dans la zone des fragments, située après le pic de Bragg, on mesure des rendements de HO• quasi-identiques avec toutes les sondes, et en accord avec les données de Maeyama *et al.* (Maeyama, Yamashita, Taguchi, et al., 2011). Ceci confirme la robustesse des données obtenues. Malgré des doses relativement faibles, les mesures ont pu être réalisées avec une bonne sensibilité, notamment pour les sondes organiques. L'accord entre les sondes et avec la littérature élimine d'autre part l'hypothèse, évoquée dans le chapitre ci-dessus sur la production d'eau oxygénée, d'une mauvaise estimation de la dose par la chambre d'ionisation. Les rendements en HO• sont plus élevés qu'à proximité du pic de Bragg, et proches de ceux mesurés dans le plateau, quel que soit le temps de capture. Ce résultat est en accord avec des fragments de TEL plus faibles que des ions carbone, induisant moins de recombinaisons inter radicalaires. Cependant, il rend d'autant plus complexes à interpréter les rendements élevés obtenus avec l'eau oxygénée dans la même zone.

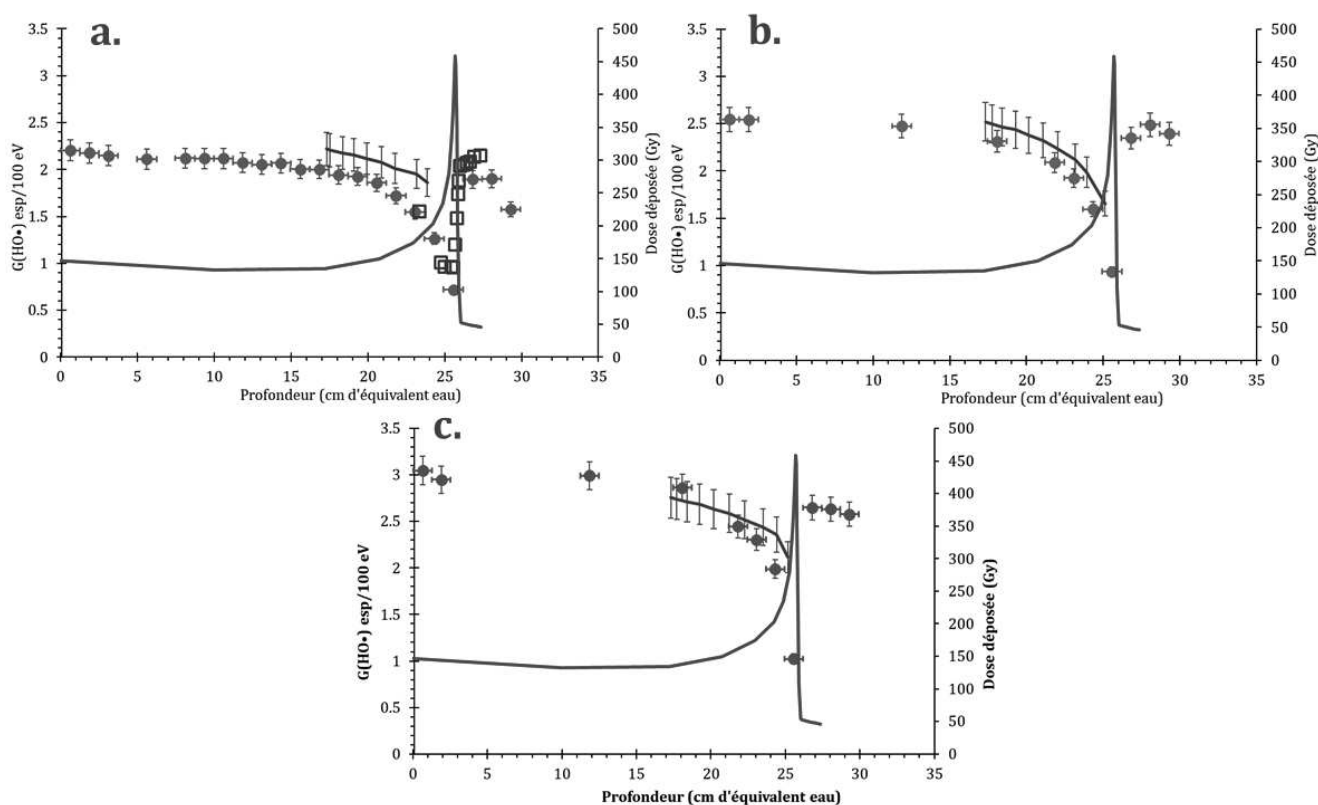


Figure 5-6 Evolution de  $G(\text{HO}\bullet)$  le long de la courbe de Bragg (en rouge) à différents temps de capture et pour différents sets de données : cette étude (●), (Appleby *et al.*, 1985)(-) et (Maeyama, Yamashita, Taguchi, et al., 2011)(□)  
 a. A un temps de capture de 74 ns (cette étude), 90 ns (Appleby) et 100 ns (Maeyama *et al.*)  
 b. à un temps de capture de 7.4 ns (cette étude) et 9 ns (Appleby *et al.*)  
 c. à un temps de capture de 0.74ns (cette étude) et 0.9 ns (Appleby *et al.*)

Les rendements ont été mesurés tout le long de la courbe de Bragg à différents temps de capture allant de 0.74 ns à 740 ns (TA et KBr/formiate) et de 7.4 à 740ns pour la C3CA, couvrant donc une partie importante de la chimie inhomogène jusqu'au début de l'étape de chimie homogène.

L'évolution en fonction du temps de capture peut être reliée à une distance par rapport à la trace du faisceau d'ions C en considérant le coefficient de diffusion de HO• ( $D_{HO\bullet} = 2.8 \times 10^{-9} m^2.s^{-1}$  (Peukert *et al.*, 2018)) (Équation 5-1)

$$\text{Équation 5-1} \quad t = x^2 / 6D \quad \text{Soit} \quad x = \sqrt{6Dt}$$

Où :  $t$  Est le temps de capture considéré en secondes

$x$  La distance à laquelle se trouve l'espèce de son lieu de formation, donc de la trace

$D$  Est le coefficient de diffusion de l'espèce considérée en  $m^2.s^{-1}$

Il est alors possible de représenter l'évolution des rendements radiolytiques du radical hydroxyle spatialement autour de la trace d'un ion, le long de sa trajectoire. Cette représentation est apparait dans la *Figure 5-7*. On observe une chute importante du rendement dès quelques nm autour de la trace. Ceci permet d'estimer la taille d'une trace « chimique » des ions carbone, en ce qui concerne le radical HO•.

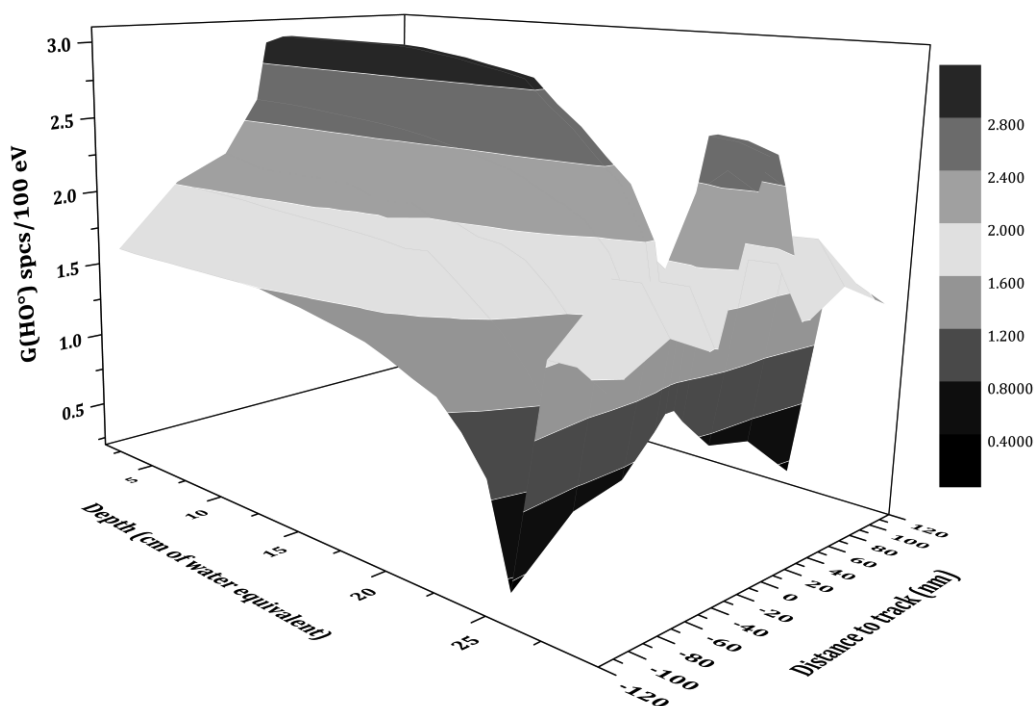


Figure 5-7 Représentation 3D de l'évolution de  $G(HO\bullet)$  en fonction de la profondeur dans l'eau et en fonction de la distance de la trace calculée à partir du temps de capture.

#### Les ions He de 230 MeV / nu

Le faisceau d'ions He de 230 MeV/nu utilisé étant d'un diamètre de 22 mm couvrant une seule cuve, moins d'expérience ont pu être réalisées qu'avec les ions carbone. Une seule cinétique a donc été reconstruite avec les trois sondes, à l'énergie maximale.



L'évolution des rendements le long de la trajectoire des ions a été mesurée à un unique temps de capture de 74ns, avec les sondes C3CA et KBr/formiate.

Comme précédemment, les sondes présentent une très bonne cohérence entre elles, à nouveau en considérant le rendement de 2-OH-TA à « haut TEL » (Figure 5-8-c.) avec un rendement tout à fait cohérent en considérant le TEL du faisceau à pleine énergie. Les évolutions le long de la courbe de Bragg obtenues en utilisant tant la C3CA que la sonde KBr/formiate sont également tout à fait similaires, y compris dans la cuve associée au pic de Bragg (Figure 5-8-a). Le TEL maximal atteint par les ions He étant plus faible que celui des ions C dans le pic de Bragg (200 eV/nm contre 900 eV/nm), la similarité maintenue entre les deux sondes peut s'expliquer par un TEL suffisamment faible pour que le taux de production de la 7-OH-C3CA reste constant. En revanche,  $G(\text{HO}\cdot)$  obtenu dans cette cuve est également plus faible qu'attendu en considérant le TEL moyen dans la cuve.

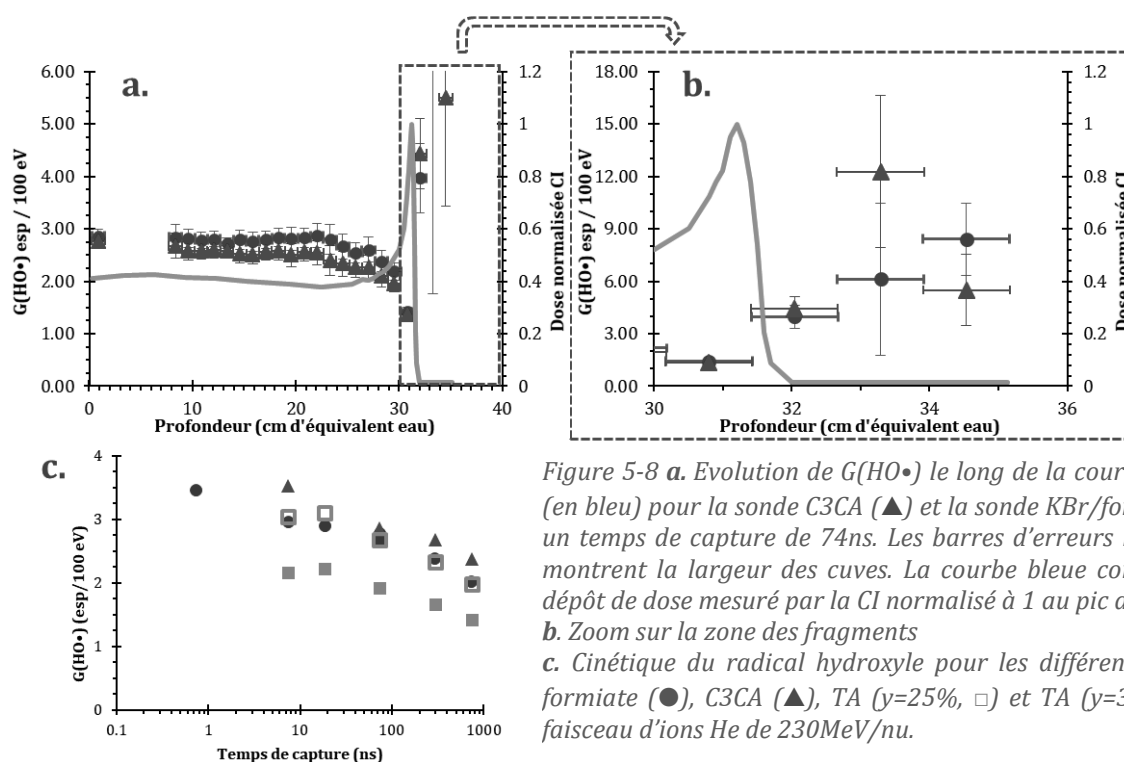


Figure 5-8 **a.** Evolution de  $G(\text{HO}\cdot)$  le long de la courbe de Bragg (en bleu) pour la sonde C3CA (▲) et la sonde KBr/formiate (●) à un temps de capture de 74ns. Les barres d'erreurs horizontales montrent la largeur des cuves. La courbe bleue correspond au dépôt de dose mesuré par la CI normalisé à 1 au pic de Bragg. **b.** Zoom sur la zone des fragments **c.** Cinétique du radical hydroxyle pour les différentes sondes : formiate (●), C3CA (▲), TA ( $\gamma=25\%$ , □) et TA ( $\gamma=35\%$ , ■) sous faisceau d'ions He de 230MeV/nu.

Dans la première cuve, située à une profondeur équivalente en eau de 32 cm, une partie de la dose est déposée par les ions He en fin du pic de Bragg. Au-delà, toute la dose est déposée par les fragments. A ces profondeurs d'eau, après le pic de Bragg, la chambre d'ionisation indique une dose extrêmement faible, de l'ordre de 1% de la dose dans le pic de Bragg. Ceci pourrait être une raison pour laquelle les rendements calculés se retrouvent particulièrement élevés, avec des valeurs atteignant les 12 esp/100 eV pour la C3CA.

A ce stade, la raison pour laquelle ces rendements théoriques en  $\text{HO}\cdot$  obtenus dans la zone des fragments sont aussi élevés n'est pas claire. La relative concordance entre les sondes indique qu'il ne s'agit a priori pas d'un effet lié à leur mécanisme de radiolyse. On peut toutefois en conclure que l'effet chimique dans la zone de fragmentation est très important par rapport à l'effet physique, la dose mesurée.

Cette première étude devra être approfondie, par exemple avec une meilleure résolution spatiale autour du pic de Bragg, et en couplant les mesures à une dosimétrie chimique telle que le dosimètre de Fricke.

#### Comparaison des deux rayonnements

Les ions He de 230 MeV/nu et les ions C de 400 MeV/nu ayant tous deux des profondeurs de pénétration proches, il est possible de comparer les évolutions de  $G(\text{HO}\cdot)$  le long du parcours des deux faisceaux. Cette comparaison est illustrée sur la *Figure 5-9*. Les rendements obtenus dans la zone du plateau des ions He sont nettement plus élevés que pour les ions C, en accord avec leur TEL plus faible. On observe des tendances très similaires pour les deux faisceaux, avec un rendement quasi-constant dans le plateau puis une diminution progressive à l'approche du pic de Bragg suivie d'une chute brusque dans la cuve du pic de Bragg.

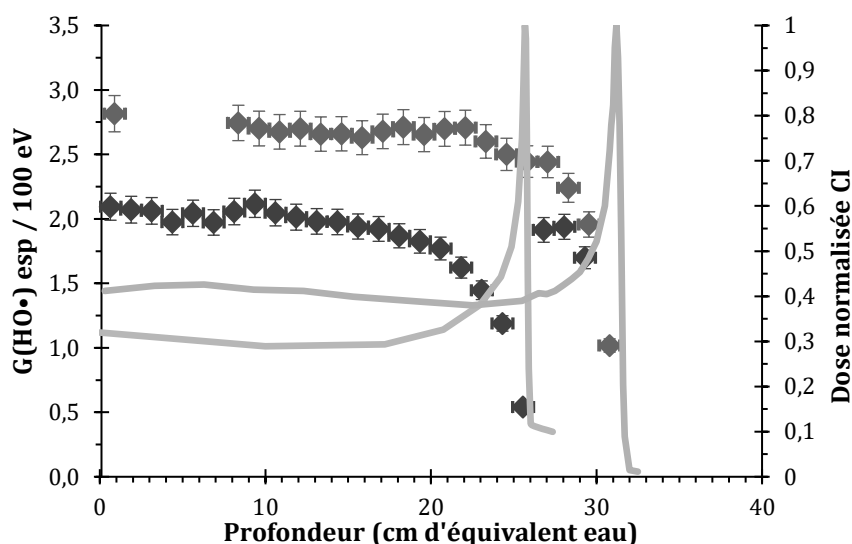


Figure 5-9 Evolution de  $G(\text{HO}\cdot)$  en fonction de la profondeur le long de la courbe de Bragg d'ions C (en bleu) et d'ions He (en orange). Les points de données sont la moyenne des sondes C3CA et KBr/formiate et correspondent au temps de capture de 74ns.

L'observation la plus intéressante découlant de cette comparaison est très certainement la mise en évidence des fragments des ions C après le pic de Bragg, et au fait que les rendements obtenus soient tout à fait comparables aux rendements mesurés à la même profondeur pour des ions He en fin de parcours.

Les ions He sont les fragments majoritaires des ions C lors de leur pénétration dans la matière (Haettner *et al.*, 2013), et sont responsables de la majorité de la dose déposée par les particules secondaires.

Le rendement observé est plus faible que celui obtenu dans le plateau des hélions car d'autres ions plus lourds sont également responsables d'une part du dépôt de dose, comme les ions bore. Il est aussi très probable que ces hélions aient une énergie différente de ceux du faisceau primaire à une même profondeur. Sur la *Figure 5-10*, les données précédentes sont représentées en fonction du TEL, en

considérant celui des ions dans chaque cuve traversée. Ceci permet une comparaison directe avec des données de la littérature. Les rendements obtenus dans les cuves où se produit le pic de Bragg n'ont pas été représentés sur cette figure, le TEL des particules variant fortement dans celles-ci.

On observe une évolution régulière avec le TEL pour un même type d'ion. La continuité entre les rendements mesurés avec les ions C et les ions He n'est pas parfaite, le TEL n'étant pas le paramètre unique décrivant les rendements d'espèces de radiolyse de l'eau, qui dépendent également de la nature des ions, et de leur fragmentation ici.

Les données de la littérature auxquelles nous nous sommes comparés (Maeyama, Yamashita, Taguchi, et al., 2011) et (Appleby & Christman, 1985), sont également des rendements obtenus après dégradation, et donc fragmentation des ions. Comme on peut le constater, nos données à 74 ns sont en très bon accord avec celles des deux études aux mêmes TEL.

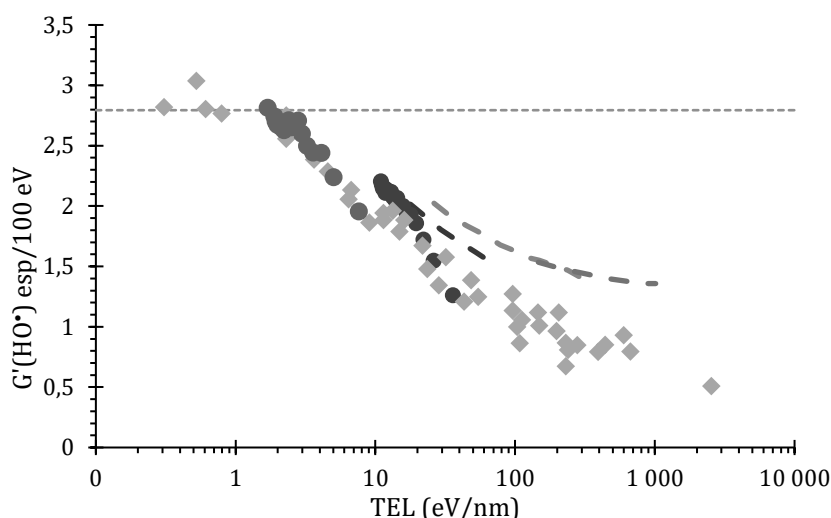


Figure 5-10 Evolution de  $G'(HO^\bullet)$ , rendements différentiels, en fonction du TEL pour différents rayonnements. Cette étude : RX 6 MeV (---), He 230 MeV/nu à différentes profondeurs (●), C 400 MeV/nu à différentes profondeurs (●). Littérature : (Maeyama, Yamashita, Baldacchino, et al., 2011; Maeyama, Yamashita, Taguchi, et al., 2011) (Plusieurs ions, ◆), (Appleby & Christman, 1985) (C 400 MeV/nu ---, Ne 370 MeV/nu ---, Ar 450 MeV/nu ---)

#### 4/ Vision globale de la radiolyse de l'eau

L'originalité des expériences réalisées sur la radiolyse de l'eau repose sur une mesure simultanée des principales espèces, et de leurs cinétiques avec les ions carbone, le long de la trajectoire d'ions. Les mesures de rendement le long de la courbe de Bragg ont ainsi été réalisées pour  $HO^\bullet$  et  $H_2O_2$  dans le cadre de ma thèse. Les rendements de l'électron hydraté ont été mesurés dans le cadre de la thèse de S. Chefson au cours de ces expériences. Le détail de la mesure de  $e_{aq}^-$  et de la comparaison avec les données de la littérature fait donc partie de son travail de thèse, et nous nous contenterons ici de comparer les données des différentes espèces entre elles.

Les résultats obtenus avec les ions C de 400 MeV/nu pour les trois espèces sont présentés sur la Figure 5-11 à différents temps de capture.

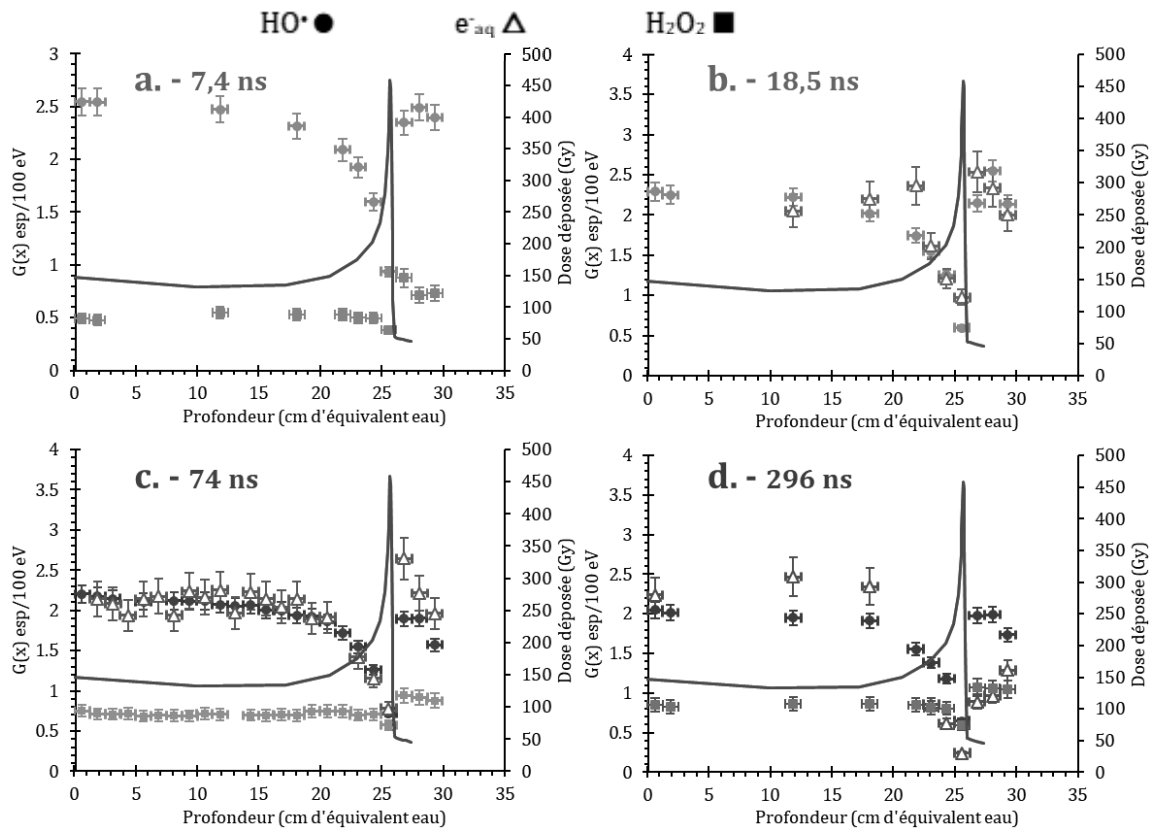
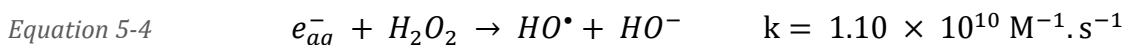
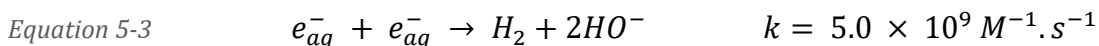
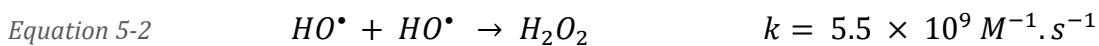
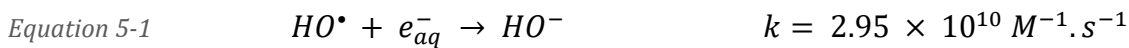


Figure 5-11 Evolution du rendement radiolytique du radical hydroxyle (●), de l'électron hydraté (Δ, Thèse de S. Chefson, en cours) et du peroxyde d'hydrogène (■) le long de la courbe de Bragg (en rouge) à différents temps de capture sous faisceau d'ions C de 400 MeV/nu. Les différents temps de capture sont 7.4 ns (en vert, a.), 18.5 ns (en orange, b.), 74 ns (en bleu, c.) et 296 ns (en violet, d.).

Pour de mêmes temps de capture (18.5, 74 et 296 ns), on observe des rendements en  $HO^\bullet$  et en  $e^-_{aq}$  très similaires, et suivant des évolutions quasi-identiques le long de la trajectoire des ions. Au-delà du pic de Bragg, dans la zone des fragments, les rendements mesurés sont encore très similaires entre les deux espèces, aux temps les plus courts. On observe un écart significatif pour un temps de capture de 296 ns. La source principale de ces deux espèces est la réaction d'ionisation de l'eau, et leurs rendements mesurés à bas TEL sont donc généralement très proches, comme observé ici. Pour expliquer la diminution des espèces radicalaires à l'approche du pic de Bragg, trois réactions doivent être considérées principalement (Shin et al., 2021) :



Si la réaction du radical hydroxyle avec lui-même pour former du peroxyde d'hydrogène était la réaction principale responsable de la diminution de  $G(HO^\bullet)$ , on devrait observer une augmentation importante de  $G(H_2O_2)$ . Or les rendements mesurés pour  $H_2O_2$  restent relativement stables jusqu'au pic de Bragg.

L'évolution identique avec la profondeur de pénétration des deux espèces radicalaires couplée à une absence d'augmentation claire sur l'eau oxygénée suggère donc plutôt que la réaction prépondérante est  $e_{aq}^- + HO^\bullet$  (Equation 5-1). Ceci est en accord avec la constante de vitesse de cette réaction ( $k = 2,95 \times 10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$  (Shin et al., 2021)), l'une des plus élevées de la radiolyse de l'eau.

Cependant,  $HO^\bullet$  et  $e_{aq}^-$  ne sont vraisemblablement pas formés au même endroit dans les *spurs*, de par l'énergie initiale de l'électron hydraté, qui implique un éloignement de ce dernier avant de thermaliser et d'être solvaté (Wasselin-Trupin *et al.*, 2002).

Avec une énergie initiale moyenne de quelques dizaines d'eV (Pimblott & LaVerne, 2007; Scifoni *et al.*, 2010) et une distance entre les paires d'ions formées sous un faisceau d'ions de l'ordre du nanomètre, (Choppin *et al.*, 2013b) l'électron peut probablement thermaliser au niveau d'une *spur* voisine de celle dont il provient. En effet, des électrons ayant une énergie de cet ordre de grandeur pourront se déplacer sur une distance de l'ordre de la dizaine de nanomètres (Meesungnoen *et al.*, 2002; Watt, 2014). Ainsi, la recombinaison entre  $HO^\bullet$  et  $e_{aq}^-$  peut certainement se faire efficacement inter-*spur*.

De plus, l'étude de (Pimblott & LaVerne, 1998) sur les réactions responsables de la consommation des espèces radicalaires montre que la réaction entre  $HO^\bullet$  et  $e_{aq}^-$  est importante pour les deux espèces. Ils ont ainsi montré que 34% de la consommation de  $HO^\bullet$  provient de cette réaction pour des électrons de 200 eV. Cette proportion augmente avec l'énergie des électrons, jusqu'à 43% pour des électrons de 100 keV. On peut donc supposer qu'avec des ions de très haute énergie, pour les raisons évoquées ci-dessus, ces proportions pourraient être encore plus importantes.

La Figure 5-12 représente les cinétiques des rendements des trois espèces, mesurés avec des ions C de 400 MeV/nu. Il apparaît que la diminution du rendement en radical hydroxyle est nettement plus importante que l'augmentation de  $2xG(H_2O_2)$ . En effet, alors que  $G(HO^\bullet)$  diminue de 1.4 esp/100 eV entre 0.7 et 740 ns (double flèche bleue),  $2xG(H_2O_2)$  n'augmente que de 0.7 esp/100 eV. Ainsi, seulement 0.7 esp/100 eV de radical hydroxyle ont recombinaison pour former de l'eau oxygénée, signifiant donc que la moitié de la perte du radical provient de la réaction avec l'électron hydraté. Cela montre bien l'importance de la réaction  $e_{aq}^- + HO^\bullet$ .

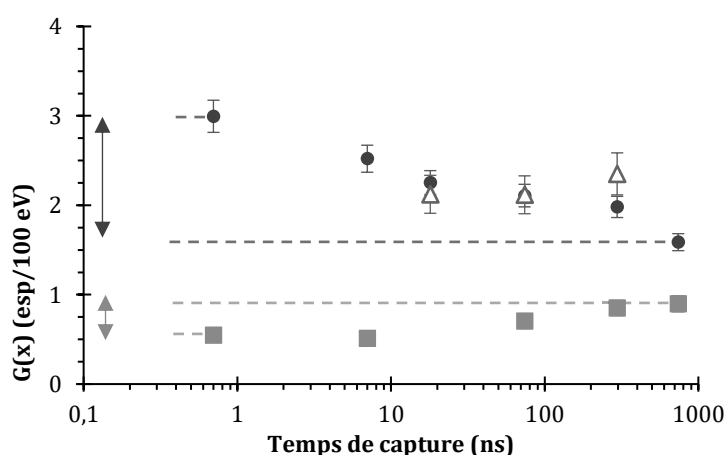


Figure 5-12 Evolution du rendement radiolytique en fonction du temps de capture de  $HO^\bullet$  (●),  $e_{aq}^-$  (△) et  $H_2O_2$  (■) sous faisceau d'ions C de 400 MeV/nu.

La molécule de  $H_2O_2$  formés par recombinaison de 2  $HO\bullet$ , peut également réagir avec  $e_{aq}^-$  ( $k_{e_{aq}^-}^{H_2O_2} = 1,10 \times 10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$  ((Shin et al., 2019)), ce qui aboutit à la formation de superoxyde  $HO_2\bullet$ , lequel formera statistiquement  $\frac{1}{2}$  molécule d'eau oxygénée. Pour que cette réaction se fasse efficacement, il faudrait là aussi que l'électron hydraté se trouve spatialement proche de  $H_2O_2$ . Or, dans ces conditions les constantes de vitesses et quantités de produits présents favorisent largement une recombinaison électron-radical hydroxyle.

La Figure 5-13 montre une superposition des rendements de  $HO\bullet$  et  $e_{aq}^-$  mesurés à 74 ns avec des ions C de 400 MeV/nu et des hélions de 230 MeV/nu. Les évolutions sont à nouveau très similaires entre les deux espèces, avec des rendements plus élevés avec les ions He de TEL plus faibles que les ions C, comme évoqué plus haut. Lorsqu'on s'intéresse à la zone des fragments des ions C, on observe que les rendements en  $e_{aq}^-$  mesurés sont très proches de ceux obtenus avec les hélions à une même profondeur, comme déjà observé pour  $HO\bullet$ .

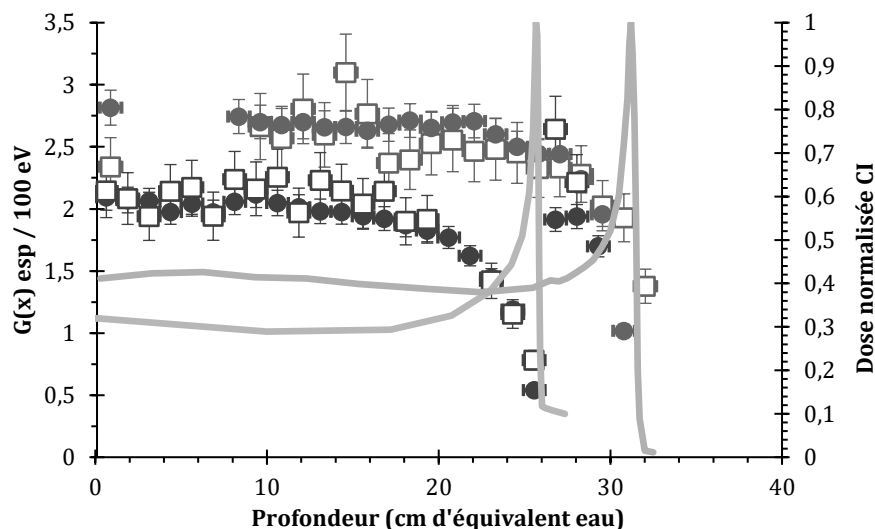


Figure 5-13 Evolution de  $G(HO\bullet)$  (●) et  $G(e_{aq}^-)$  (□, thèse de S. Chefson, en cours) en fonction de la profondeur le long de la courbe de Bragg d'ions C de 400 MeV/nu (en bleu) et d'ions He de 230 MeV/nu (en orange) à un temps de capture de 74 ns.

Nous avons ainsi pu reconstituer l'évolution des rendements en  $HO\bullet$  et  $e_{aq}^-$ , le long de la trajectoire d'ions He et C de haute énergie, ainsi que de l'eau oxygénée et leurs cinétiques avec les ions C. Les rendements relativement élevés mesurés jusqu'à 3 cm au-delà du pic de Bragg traduisent un impact chimique important des fragments, qui peut avoir un impact en thérapie.

Les expériences réalisées sur la quantification d'espèces de radiolyse de l'eau sont ainsi riches en informations, et seront également exploitées dans notre étude sur la radiolyse de biomolécules.

## C/ Radiolyse de biomolécules le long de la trace d'ions – Cas du tryptophane

Afin d'étudier l'évolution des rendements des produits de radiolyse de biomolécules le long de la courbe de Bragg ainsi que l'effet de la fragmentation des faisceaux d'ions lourds de haute énergie à travers la matière sur la radiolyse de biomolécules en milieux aqueux, le tryptophane a été choisi ici comme modèle d'étude. L'ensemble des rendements des différents produits de radiolyse de cet acide aminé sont représentés dans la *Figure 5-14*. Ceux-ci sont regroupés selon le type de réaction avec  $\text{HO}^\bullet$  à l'origine de leur formation (Cf. Chapitre 4, *Tableau 4-1*).

Les résultats sont présentés à la fois pour les rendements mesurés bruts, et pour des rendements pondérés par ceux du radical  $\text{HO}^\bullet$  déterminés dans les mêmes conditions expérimentales.

Jusqu'au pic de Bragg, l'évolution des rendements bruts est dominée par celle du radical hydroxyle pour tous les composés. Les rendements obtenus pour des ions C de 400 MeV/nu sont ainsi également inférieurs à ceux obtenus pour les particules alpha de 230 MeV/nu. Les différences entre les deux faisceaux sont similaires à celles déjà observée pour  $\text{HO}^\bullet$ , avec une diminution à l'approche du pic de Bragg et un minimum atteint dans la cuve où celui-ci se produit.

Les rendements mesurés dans la zone des fragments avec les ions C de haute énergie sont très proches de ceux rendements obtenus avec les ions He de haute énergie à une même profondeur, quel que soit le produit de radiolyse du tryptophane considéré, comme c'était le cas pour  $\text{HO}^\bullet$ .

Le produit majoritaire est le peroxyde, suivi des produits issus d'une addition en position 2 du cycle indole, particulièrement la NFK. Les produits issus d'une addition de  $\text{HO}^\bullet$  sur le cycle benzénique restent minoritaires.

La partie droite de la *Figure 5-14* montre l'évolution des rendements au-delà de la réaction avec le radical hydroxyle, après normalisation par  $G(\text{HO}^\bullet)$ . Ces rendements relatifs, ou pondérés, sont donc décorrélés des variations du radical hydroxyle.

Quel que soit le produit de radiolyse, les rendements pondérés ne varient plus avec la profondeur dans le plateau de la courbe de Bragg. Leur diminution est donc uniquement liée à celle de  $\text{HO}^\bullet$ . D'autre part, les valeurs obtenues sont identiques entre les ions C et les ions He, à l'exception des rendements pondérés des dimères. Seuls ces derniers varient donc avec le TEL entre les deux types d'ions. Pour tous les composés, dans le cas des irradiations sous ions C, les rendements pondérés diminuent dans la cuve où se produit le pic de Bragg. Une telle observation pour la totalité des composés est surprenante, car les produits de radiolyse de Trp ont montré une évolution différente selon le TEL dans le chapitre précédent. Cette diminution étant toutefois modérée, une répétition de l'expérience serait nécessaire pour la valider ou non.

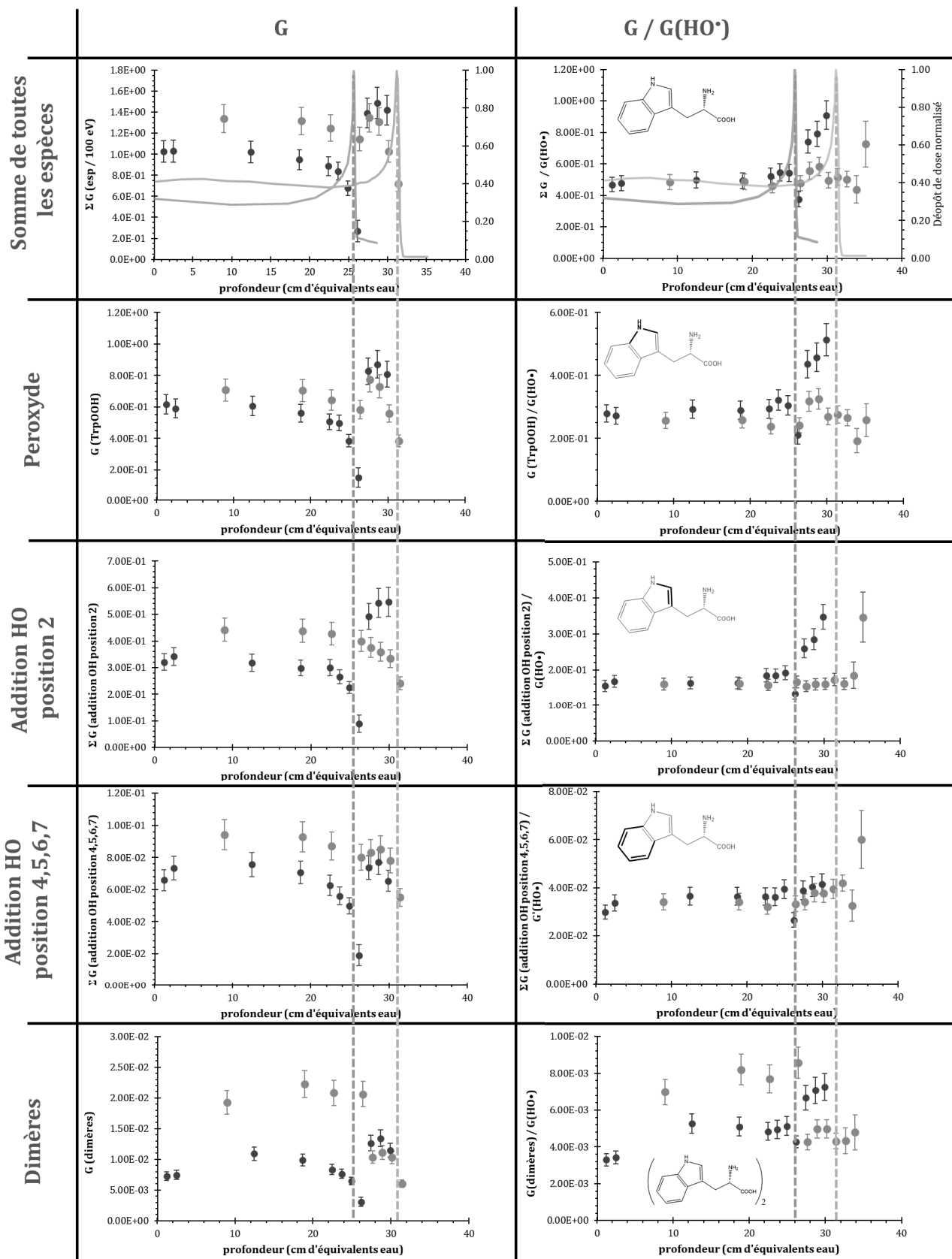


Figure 5-14 Evolutions des rendements des différents produits de radiolyse du tryptophane selon la profondeur de pénétration d'un faisceau d'ions C de 400 MeV/nu (●) et d'un faisceau d'ions He de 230 MeV/nu (●). La colonne de gauche présente les rendements tels que mesurés directement tandis que la colonne de droite présente les rendements pondérés par ceux de HO•. Les courbes représentent le dépôt de dose mesuré par CI, pour les ions C en bleu et pour les ions He en orange.



Les produits de radiolyse formés par une attaque sur le cycle indole voient leurs rendements pondérés augmenter de façon significative par rapport au plateau dans la zone des fragments des ions C. L'étude de la radiolyse du tryptophane en fonction du TEL du chapitre précédent avait montré une augmentation des produits d'attaque sur le cycle indole à bas TEL. L'augmentation de leurs rendements dans la zone des fragments est donc cohérente avec les bas TEL des particules secondaires formées.

Les rendements bruts obtenus au-delà du pic de Bragg des ions He sont très élevés, comme ce qui a été observé avec le radical hydroxyle. Ceux-ci n'ont pas été représentés sur la *Figure 5-14*. Une hypothèse proposée est une sous-estimation de la dose par la chambre d'ionisation dans cette zone. La pondération par les rendements d' $\text{HO}^\bullet$  permet justement de s'affranchir de la dose déposée. Lorsqu'on considère les rendements relatifs obtenus avec les ions He (*Figure 5-14*), ceux-ci sont maintenant très proches de ceux dans le plateau et dans le pic de Bragg, à l'exception de la dernière cuve. On n'observe donc a priori pas de modification particulière des mécanismes de radiolyse dans la zone des fragments avec les ions He, sauf peut-être dans cette dernière cuve.

Globalement, le rendement pondéré des différentes espèces reste presque constant aux différentes profondeurs et surtout **il est équivalent pour les ions C et les ions He**, signe que l'effet de TEL à la fois entre les deux rayonnements et lors de la pénétration du rayonnement dans la matière est faible. La formation des dimères, par réaction entre deux radicaux issus du tryptophane, semble être la seule réaction sensible à la densité de dépôt d'énergie dans cette gamme de TEL.

## D/ Fragmentation sur une cible mince

Parallèlement aux mesures effectuées le long de la trace des ions He de 230 MeV/nu dans la Physics-Room, nous avons étudié les rendements en espèces de radiolyse de l'eau et en produits de radiolyse d'une biomolécule engendrés par les fragments produits suite à l'impact du faisceau d'ions He sur une cible mince de polyéthylène (PE).

Les systèmes chimiques étudiés furent la C3CA, comme sonde du radical hydroxyle, et la phénylalanine. Les doses attendues à ces angles étant faibles, le choix de ces systèmes s'explique par leur sensibilité élevée et la stabilité des produits de radiolyse observés, c'est-à-dire la 7-OH-C3CA et les tyrosines. Les mesures ont été réalisées au temps de capture caractéristique de 74 ns.

Les mesures ont été réalisées pour des angles de 5 à 30° par pas de 5° ( $\pm 2.5^\circ$ ) ainsi qu'à 90°. Les cuves UV ont été placées sur un support où les positions ont été fixées pour que toutes les cuves soient à distance égale de la cible (24 cm). Les solutions de C3CA et Phe ont été placées de part et d'autre du faisceau, à des angles identiques (*Figure 5-15*). Les cuves ont été laissées durant toute la nuit d'irradiation, afin d'accumuler suffisamment de dose pour les quantifications.



Figure 5-15 Photographie du dispositif utilisé pour la mesure des fragments aux différents angles.

Comme expliqué dans le chapitre de matériel et méthode, la dosimétrie fut assurée par une chambre d'ionisation de Markus, placée derrière la cuve à 20° contenant la C3CA. Des détecteurs de traces nucléaires par fluorescence (FNTD), petites plaquettes de 1 mm d'épaisseur d'oxydes d'aluminium, ont été placés derrière toutes les autres cuves. La dose fut estimée à chaque angle à l'aide de l'évolution du signal des FNTD et de la dose mesurée à 20°. L'évolution de cette dose fut d'ailleurs tout à fait linéaire durant la totalité des expériences. Cette évolution ainsi que les images des FNTD sont disponibles en *Annexe 11 & Annexe 13*.

## 1/ Fragments et radical hydroxyle en fonction de l'angle

De par la sensibilité élevée des mesures avec la sonde C3CA, liée au rendement quantique de fluorescence élevé de la 7-OH-C3CA, il fut possible de quantifier précisément le radical hydroxyle produit dans les cuves placées à chaque angle.

La *Figure 5-16* présente l'évolution du nombre total de radicaux HO• formés en solution,  $N(\text{HO}\bullet)$ , en fonction de l'angle, ainsi que l'évolution de la dose déterminée par CI-FNTD.

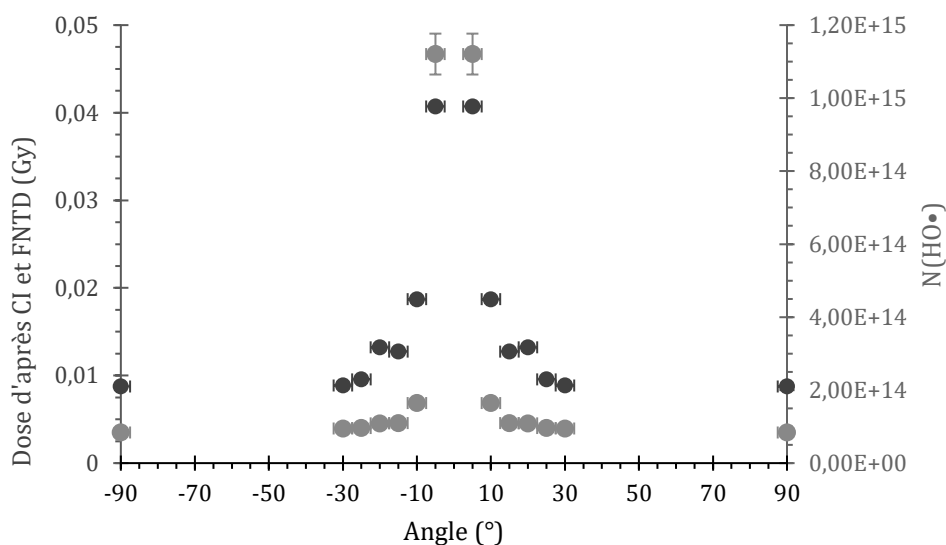


Figure 5-16 Evolution selon l'angle de la dose mesurée par chambre d'ionisation (●, axe de gauche) et du nombre de HO• formés (●, axe de droite).

On observe de fortes variations de la dose et du nombre de radicaux formés avec l'angle. Ceci est en accord avec la distribution angulaire attendue pour des fragments formés par réaction nucléaire avec une cible (Haettner *et al.*, 2013). L'énergie cinétique très élevée des ions incidents induit une densité de fragments d'autant plus forte que l'angle par rapport au faisceau est faible.

$N(\text{HO}\cdot)$  et la dose déposée diminuent conjointement, et dans des proportions comparables avec l'angle par rapport à l'axe du faisceau incident. Toutefois, on observe un écart notable à  $5^\circ$ .

En effet, le nombre d'espèces formées à  $5^\circ$  est près de 10 fois plus élevé qu'à  $10^\circ$ , là où la dose mesurée par la CI n'augmente que d'un facteur 2. Cela pourrait suggérer une surestimation de la quantité de  $\text{HO}\cdot$  formée dans la cuve placée à  $5^\circ$  de la zone d'impact entre le faisceau et la cible. Celle-ci pourrait provenir de la diffusion du faisceau primaire en raison de la proximité entre la cuve et celui-ci. Il est également possible que le signal des détecteurs FNTD placés à  $5^\circ$  présente une saturation, induisant une sous-estimation de la dose déposée à cette position.

Avec les doses estimées et les quantités de radical mesurées, les rendements radiolytiques atteindraient jusqu'à 100 esp/100 eV, même à des angles importants, ce qui est impossible. Ainsi, la mesure de la dose donnée par la chambre d'ionisation et les FNTD n'est pas représentative de la dose déposée dans les cuves. Au temps de capture de 74 ns, le rendement maximal attendu est de 2,8 espèces pour 100 eV déposés, mesuré avec des RX ou des électrons.

En considérant ce rendement maximal, il est possible d'estimer une dose minimale déposée dans nos échantillons pour former la quantité de produits mesurée. Les doses ainsi estimées sont présentées dans le Tableau 5-1, comparées à celles estimées par chambre de Markus/FNTD. Les pourcentages indiqués dans le tableau représentent les rapports entre ces doses et la dose totale déposée dans la cible par le faisceau incident, soit 1448 Gy.

Tableau 5-1 Dose en Gy et pourcentage de la dose dans le faisceau, calculées pour un rendement en radical hydroxyle de 2.8 esp/100 eV et d'après les mesures de la Chambre d'ionisation.

Angle ( $^\circ$ )	5	10	15	20	25	30	90
Dose calculée d'après C3CA (Gy)	6.41	0.94	0.63	0.62	0.55	0.54	0.48
% Dose faisceau calculée	0.44	0.065	0.043	0.043	0.038	0.038	0.033
Dose d'après CI (mGy)	40.7	18.7	12.7	13.2	9.56	8.86	8.75
% Dose faisceau CI ( $\times 10^3$ )	0.0281	0.0129	0.0088	0.0091	0.0066	0.0061	0.0060

Les doses estimées par voie chimique sont ainsi plusieurs ordres de grandeurs supérieures à celles déterminées par la chambre d'ionisation. Sur le montage expérimental, la CI et les FNTD avaient été placés derrière les cuves contenant les solutions. En effet, la majeure partie des fragments étant

attendue d'énergies de l'ordre de celle du faisceau incident, ceux-ci auraient traversé la cuve pour être détectés par la CI.

Dans ces conditions, l'hypothèse la plus vraisemblable est donc celle de fragments d'énergies suffisantes pour pénétrer dans les cuves mais s'arrêtant complètement dans celles-ci. Ainsi, leur dépôt d'énergie ne serait alors mesuré ni par la CI ni les FNTD, placés derrière les cuves.

Kodaira *et al.* ont caractérisé des particules secondaires issues d'une cible de CR-39 de 0,9 mm d'épaisseur pour des ions He de 145 MeV/nu (Kodaira *et al.*, 2019). Celles-ci ont des TEL pouvant atteindre et dépasser 15 eV/nm, et étaient responsables d'un dépôt de dose important, de l'ordre de 0.7% de la dose déposée par le faisceau primaire. Une simulation SRIM faite à partir de ces données montre que des ions de ce TEL, notamment des hélions, peuvent pénétrer les solutions dans les cuves et s'y arrêter complètement. Ceci pourrait expliquer les quantités importantes de radical hydroxyle mesurées, provenant de particules secondaires non détectées par la CI ou les détecteurs FNTD. Ces fragments pourraient alors être les fragments issus de la cible et non pas du faisceau.

### **1/ Fragments et phénylalanine**

Au-delà de la radiolyse de l'eau, et afin d'étudier les effets de la fragmentation sur des biomolécules, nous avons également étudié la radiolyse de la phénylalanine. Il s'agissait aussi de permettre une autre mesure que celle du radical hydroxyle, permettant une comparaison, même sans connaître précisément la dose déposée.

Les tyrosines, produits de radiolyse majoritaires de Phe, sont les seuls à avoir été détectés et quantifiés avec confiance. Aucun dimère n'a été détecté, et les analyses ont certainement été réalisées trop longtemps après les irradiations pour permettre de détecter la 2,5-DOPA. En effet, celle-ci se dégrade au-delà d'une vingtaine d'heures. Ainsi, cette dernière, dont le rendement relatif varie avec le TEL et qui aurait pu être intéressante pour caractériser la distribution des fragments aux différents angles, ne sera pas discutée ici.

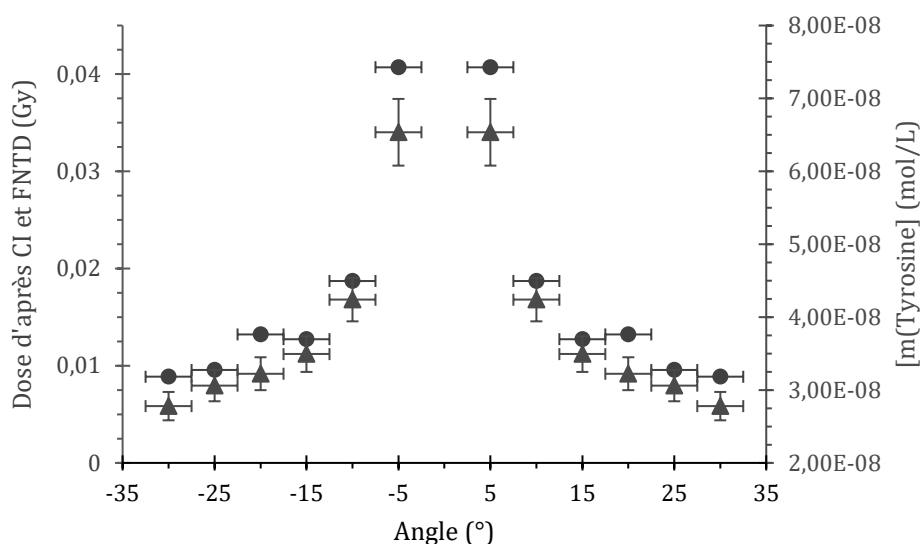


Figure 5-17 Evolution selon l'angle de la dose mesurée par chambre d'ionisation (●, axe de gauche) et de la concentration en méta-Tyrosine formée (▲, axe de droite).

La *Figure 5-17* présente l'évolution de la concentration en méta-tyrosine mesurée en fonction de l'angle autour du faisceau, ainsi que la dose mesurée par l'association CI/FNTD. La mesure à 90° n'a pas pu être exploitée.

Contrairement au nombre de radicaux HO• formés, l'évolution relative de la quantité de méta Tyrosine avec l'angle est très proche de celle de la dose estimée. La cuve contenant la solution de phénylalanine à 5° était placée à l'exact opposé de celle de C3CA au même angle, ce qui remet en question les hypothèses de la diffusion ou de la mesure par FNTD, émises pour HO•, car les mêmes effets seraient observés pour la C3CA et Phe.

La mesure simultanée dans des conditions identiques du rendement en radical hydroxyle et des produits de radiolyse de Phe permet alors de représenter le rapport des quantités d'espèces mesurées. Le rapport  $G(\text{Tyro})/G(\text{HO}\bullet)$  pour une condition donnée permet de s'affranchir de cette incertitude, car la dose déposée est la même dans chaque condition.

La *Figure 5-18* présente ainsi l'évolution des rendements des trois tyrosines pondérés par ceux de HO• en fonction de l'angle autour de la zone d'impact entre le faisceau et la cible. Les valeurs à 0° représentent ici les rendements obtenus dans le faisceau d'ions He de 230 MeV dans la première cuve. Les lignes hachurées représentent les valeurs obtenues pour des rayons X de 6 MeV.

On observe des rendements proches entre ceux mesurés dans le faisceau primaire He de 230 MeV/nu et les rayons X, dans la marge d'incertitude. Ceci est en accord avec le TEL faible des ions He à cette énergie (1,7 eV/nm).

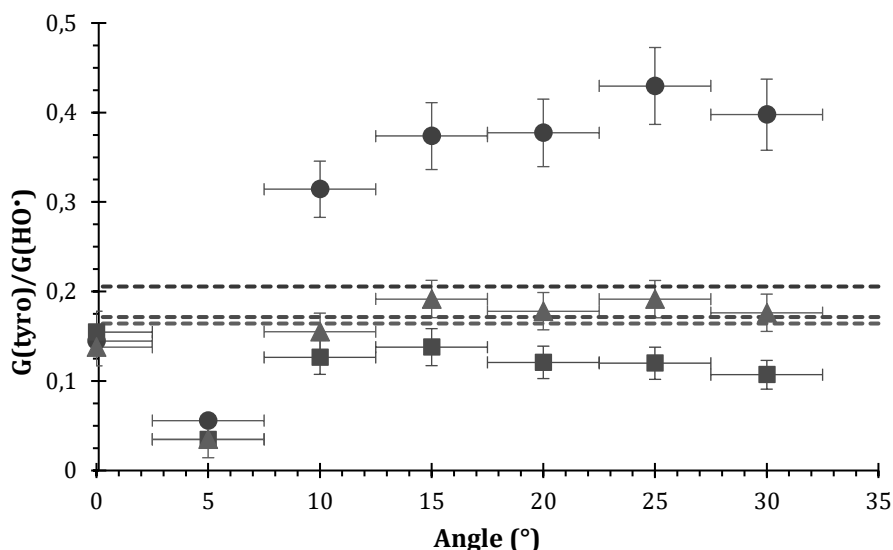


Figure 5-18 Evolution du rendement des différentes tyrosines décorrélé du rendement du radical hydroxyle, m-tyro (▲), p-tyro (●) et o-tyro (■). Les lignes hachurées correspondent aux valeurs obtenues pour des RX de 6 MeV et la valeur à 0° au ratio mesuré dans le faisceau d'ions He.

En revanche, dans le cas des rendements obtenus dans les cuves des fragments aux différents angles, les observations diffèrent sensiblement. Tout d'abord, les rendements relatifs déterminés à 5° sont particulièrement bas, ce qui renforce l'hypothèse d'une surestimation de la quantité de HO• formée à 5°.

D'autre part, bien que les rendements relatifs en meta-tyrosine (m-tyro) et ortho-tyrosine (o-tyro) soient très proches de ceux mesurés avec des RX ou les ions He dans le faisceau, ceux de la para-tyrosine sont nettement plus élevés, d'un facteur 2, et semblent augmenter avec l'angle par rapport au faisceau.

Un effet chimique spécifique apparaît alors clairement sur les proportions des différentes tyrosines. Cet effet n'a jamais été observé auparavant, ni dans la littérature, ni dans nos études, quel que soit le rayonnement ionisant utilisé. Ceci indique qu'il ne s'agit vraisemblablement pas d'un effet de TEL.

La présence simultanée de particules de nature (protons, hélions, électrons, gamma, neutrons) et d'énergies variables, peut aussi modifier les mécanismes de radiolyse. D'autres expériences sous champ de particules complexes engendrées par fragmentation d'ions seront nécessaires pour confirmer ces premières observations et proposer des explications aux phénomènes observés.

Bien que les particules secondaires n'aient pas été directement caractérisées ici, les sondes chimiques sensibles utilisées ont permis de détecter des effets chimiques en fonction de l'angle. Ces premières études seront approfondies par l'équipe, en réalisant des expériences conjointes avec nos collègues physiciens du groupe DeSIs (Dosimétrie Simulation Instrumentation) de l'IPHC, qui caractériseront précisément les fragments produits. Elles pourront également être reproduite avec des mesures de la dose par FNTD avant et après les cuves, et éventuellement directement par la CI à chaque angle.

## Conclusion partielle

Les expériences présentées dans ce chapitre ont permis d'étudier la radiolyse par des faisceaux d'ions de hautes énergies, incluant leur fragmentation tout au long de leur trace dans l'eau, comme en thérapie. Cette étude a pu être réalisée sur différents systèmes, allant des espèces primaires de la radiolyse de l'eau aux acides aminés. Les effets chimiques des fragments formés au-delà du pic de Bragg ont ainsi été mesurés, ainsi que ceux de fragments d'un faisceau d'ions hélium de 230 MeV/nu sur une fine cible de polyéthylène à différents angles.

Pour toutes les espèces sondées, les rendements radiolytiques mesurés sont stables sur la partie correspondant au plateau de la courbe de Bragg, et chutent à proximité du pic de Bragg pour les espèces radicalaires. Les évolutions identiques des rendements de formation du radical hydroxyle et de l'électron hydraté, pour les ions He ou C, couplées à l'absence d'augmentation de la quantité d'eau oxygénée suggèrent que cette diminution fait intervenir majoritairement la réaction entre HO<sup>•</sup> et e<sup>-</sup><sub>aq</sub>. Le tryptophane a montré un comportement tout à fait similaire, avec une diminution des rendements de ses nombreux produits de radiolyse dans le pic de Bragg. Alors que le TEL semble, d'après les résultats du chapitre précédent, impacter différemment les produits de radiolyse, aucun effet spécifique n'a été observé sur les rendements décorrélés de ceux du radical hydroxyle. Les rendements de formation des produits de radiolyse de l'eau et des produits de radiolyse d'acides aminés ont pu être quantifiés sous irradiation par les fragments des ions C, au-delà du pic de Bragg. Ceux-ci sont comparables à ceux mesurés avec des ions He de 230 MeV/nu à une profondeur similaire. Afin d'obtenir des résultats avec une meilleure résolution dans le pic de Bragg, des cellules plus fines que celles utilisées pour ces premières expériences sont envisagées.

Nous avons réalisé une première étude des effets chimiques des fragments formés dans une cible mince, en fonction de l'angle autour du faisceau d'ions He. Des quantités significatives de radical hydroxyle, et donc également de produits de radiolyse de biomolécules ont été mesurées. Ces quantités sont très importantes par rapport à la dose mesurée derrière les cuves. Les produits observés proviennent donc a priori de la radiolyse par des particules secondaires d'énergies relativement faibles, de profondeur de pénétration inférieure à 1 cm. D'autre part, un effet original sur les proportions des tyrosines formées a été observé, qui pourrait indiquer des modifications de mécanismes de radiolyse de la phénylalanine dans ces conditions. Ces résultats préliminaires seront complétés par des travaux réalisés en collaboration avec le groupe DeSIs de l'IPHC, pour la mesure et la caractérisation des fragments formés.

---

## **Chapitre 6 - Effets de débit de dose**

---



## Abstract

Since its breakthrough in 2014, the possibility of FLASH radiotherapy, i.e. radiotherapy performed at ultra-high dose-rate (UHDR, >40Gy/s), has been one of the most scrutinized topics in radiation research for health. Many studies are ongoing to clarify the mechanisms of the so-called FLASH effect, the sparing of healthy tissues at UHDR, from the physical aspects and the biological/clinical aspects. At this moment, there are only few studies at the molecular scale, whether on water or biomolecules radiolysis.

The present chapter will focus on dose-rate effect from a radiation chemistry point of view. First, the emphasis will be on water radiolysis, specifically on the yield of formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radical. Our experiments with different ionizing radiations showed a decrease of hydrogen peroxide yields with dose-rate. This agrees with the few studies already existing in the literature, even if these studies were performed in different conditions of scavengers or atmosphere.

A dose-rate effect has also been measured on HO• yields with 1 MeV electrons, with different thresholds depending on the scavenging time. Under 24 MeV protons irradiation, no dose-rate effect was observed, neither at 74 ns nor 296 ns scavenging times in the range investigated (0.1-450 Gy/s). With medium energy heavy ions (He 21 MeV and C 41 MeV), we observed a significant dose-rate effect at 74 ns. These experiments were performed with dose-rates several orders of magnitude higher than for the other radiations.

In this chapter, we also propose a chemical system based on organic scavenging probes and an oxidant species that could prevent specific dose-rate effects on organic molecular probes, with promising first results.

The study of dose-rate effect on amino acids, Met, Phe and Trp, gave interesting results. While Met is not very sensitive to dose-rate after reaction with HO•, an important effect is observed on methionine sulfoxide, a species formed mostly by reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Increasing dose-rate leads to an increase of 2,5-DOPA formation. This effect is similar to what is observed with LET, as 2,5-DOPA forms with high LET particles. Dose-rate effect on Trp radiolysis, which possess a more complex aromatic system than Phe, showed a different effect depending on the radiolysis products. Radiolytic yields of peroxides and products presenting an OH adduct on benzenic part of the indole ring increased with the dose-rate. On the other hand, products present on OH adduct on the position 2 didn't show any conclusive dose-rate effect.

## A/ Etat de l'art sur les effets de débit de dose

Depuis l'avancée majeure réalisée en 2014 suite aux travaux de (Favaudon *et al.*, 2014), la potentialité d'une radiothérapie FLASH (RT-Flash) est l'un des sujets suscitant le plus grand intérêt dans la recherche autour des rayonnements ionisants, dans un contexte de santé. Cependant, la majorité des études se faisant dans un contexte thérapeutique, elles sont principalement menées dans les domaines de la physique et de la biologie.

La radiothérapie FLASH se caractérise par un dépôt de dose rapide (supérieur ou égal à 40 Gy/s) (Figure 6-1). Les conséquences de cette nouvelle modalité d'administration de la dose, en particulier pendant l'étape chimique, peuvent être importantes. Les effets chimiques d'un débit de dose élevé peuvent survenir à deux stades : d'une part, en modifiant la formation de produits de radiolyse de l'eau, et d'autre part, en modifiant les mécanismes moléculaires de radiolyse de solutés, comme des biomolécules.

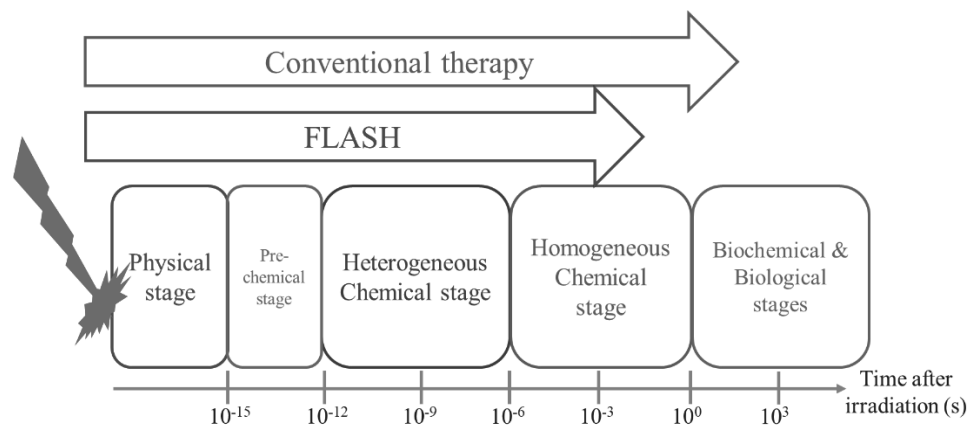


Figure 6-1 Dépôt d'énergie lors d'un traitement en RT-FLASH (de l'ordre de 10ms) et d'un traitement en thérapie conventionnelle (de l'ordre de la minute) à travers les différentes étapes suivant l'interaction rayonnement-matière (Kacem, Almeida, *et al.*, 2022).

On trouve encore peu d'études physico-chimiques sur cette thématique. La première partie de ce chapitre sera ainsi dédiée à un rapide état de l'art sur ce sujet.

### 1/ Radiolyse de l'eau

Les effets du débit de dose sur la radiolyse de l'eau ont été étudiés expérimentalement, notamment sur les rendements en  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou théoriquement par des simulations Monte-Carlo. A l'heure actuelle, l'accord entre données expérimentales et simulations n'est pas toujours bon.

Les rendements en radical hydroxyle, ont été mesurés à différents débits de dose sous irradiation par des protons (Kusumoto *et al.*, 2020), des ions carbone (Kusumoto *et al.*, 2022) et des électrons pulsés (Precek *et al.*, 2022), à l'aide de la C3CA comme sonde moléculaire. Les conclusions de ces études sont que les effets observés étaient liés à un effet sur le mécanisme de radiolyse de cette sonde elle-même. (Precek *et al.*, 2022) n'observent ainsi pas d'effet de débit de dose entre une irradiation conventionnelle et des électrons pulsés délivrant des débits de dose de l'ordre du TGy/s avec du téréphtalate et l'acide benzènetricarbolxylique.

Ceci souligne la nécessité d'identifier une sonde dont le mécanisme de réaction soit indépendant du débit de dose avant d'en aborder l'étude. C'est ce que nous avons réalisé dans le **Chapitre 3 - A/** .

Les études par simulation Monte-Carlo ne sont pas non plus toutes concordantes entre elles. Les plus récentes, réalisées avec le code Geant4-DNA (Chappuis *et al.*, 2022 ; Tran *et al.*, 2022), n'aboutissent à aucun effet du débit de dose avant  $\sim 100$  ns (a), tandis que (R. Watanabe & Saito, 2001), avec le code DBREAK, les observent à temps plus court. Dans les travaux de Alanazi *et al.*, 2021 (code IONLYS-IRT), un effet a pu être observé à des temps encore plus courts (*Figure 6-2c*). Cependant, le débit de dose le plus faible utilisé, exception faite de celui considéré pour des rayonnement  $\gamma$ , était de l'ordre de  $10^8$  Gy/s. Il s'agit d'une valeur nettement supérieure à celles correspondant au domaine de la thérapie FLASH, de l'ordre de 40 à 100 Gy/s. La notion de débit de dose n'est pas toujours clairement définie en simulation. Ainsi, dans l'étude de Watanabe & Saito et de (Chappuis *et al.*, 2022 ; Tran *et al.*, 2022), la variation de débit de dose a été obtenue en modulant la dose instantanée (en Gy/pulse), pouvant induire ainsi un effet de dose.

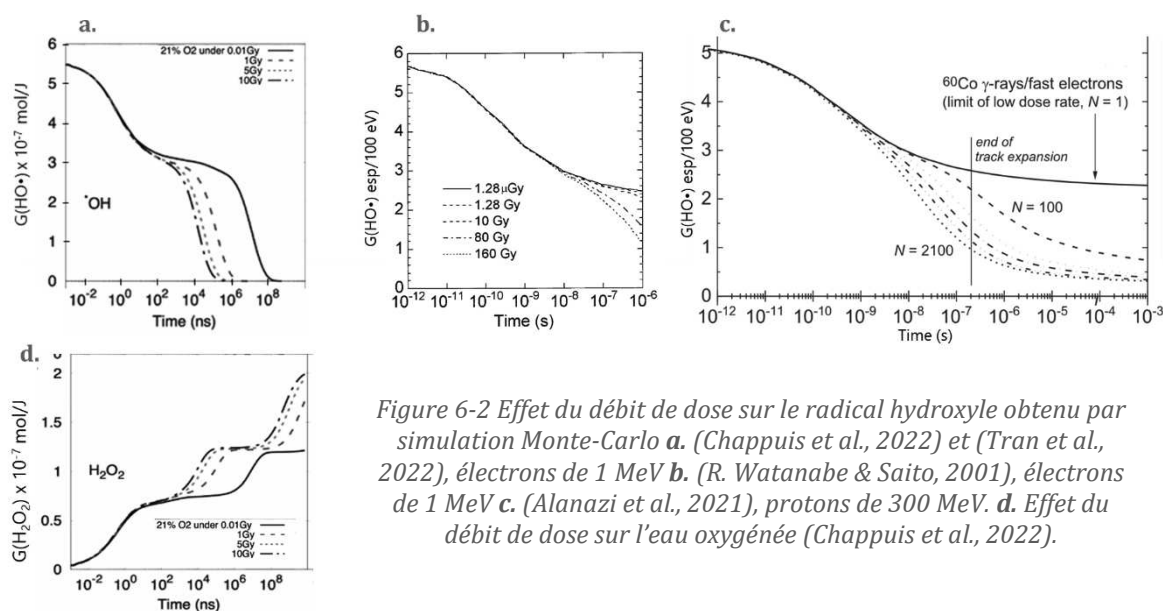


Figure 6-2 Effet du débit de dose sur le radical hydroxyle obtenu par simulation Monte-Carlo a. (Chappuis *et al.*, 2022) et (Tran *et al.*, 2022), électrons de 1 MeV b. (R. Watanabe & Saito, 2001), électrons de 1 MeV c. (Alanazi *et al.*, 2021), protons de 300 MeV. d. Effet du débit de dose sur l'eau oxygénée (Chappuis *et al.*, 2022).

Concernant l'eau oxygénée, les études expérimentales réalisées par (Blain *et al.*, 2022) et (Kacem, Psoroulas, *et al.*, 2022) par irradiation d'eau pure, sans piègeur de  $\text{HO}\cdot$  ou de  $e_{\text{aq}}^-$ , ont toutes deux montré une diminution du rendement global en eau oxygénée lorsque le débit de dose augmentait. Ce résultat est surprenant, car à l'opposé de celui prévu par les simulations via une augmentation de la réaction entre deux radicaux  $\text{HO}\cdot$  (*Figure 6-2d*).

De nombreuses questions restent ainsi en suspens sur les effets du débit de doses sur les rendements de formation des produits de radiolyse de l'eau.

## 2/ Biomolécules

On trouve très peu de travaux portant sur les effets du débit de dose sur la radiolyse de biomolécules. Les données disponibles dans la littérature concernant les biomolécules protéiques sont presque toutes antérieures aux travaux de Favaudon *et al.* en 2014.

Les effets induits par une augmentation du débit de dose sur ce type de système étaient, lors des premières observations, appelés des effets « inverses », car il avait été montré que l'augmentation du débit de dose induisait une diminution des altérations observées sur les biomolécules. En 1967, Purdie a étudié les effets du débit de dose sur la cystéine (Purdie, 1967), et a constaté que si certains produits de radiolyse voyaient leur taux de production chuter avec l'augmentation du débit de dose, d'autres se trouvaient au contraire augmentés.

Des études ont également été menées sur des protéines en présence de lipides, afin de caractériser les dégâts aux protéines provenant de radicaux formés sur ces derniers (Hitschke *et al.*, 1994). Ces travaux ont montré une diminution des altérations induites par l'irradiation sur différentes protéines, membranaires ou hydrosoluble avec une augmentation du débit de dose (Koufen, D. Brdiczka, G. Stark, 2000). Les auteurs suggéraient que cette diminution des dommages à haut débit de dose était un phénomène généralisable à l'ensemble des systèmes biologiques, mais aucune étude validant cette hypothèse n'a été publiée depuis.

Plus récemment, Spitz *et al.* (Spitz *et al.*, 2019) se sont intéressés à la radiolyse de lipides et ont proposé l'hypothèse que la peroxydation des lipides était fortement impactée par une modification du débit de dose, notamment via une consommation importante de l'oxygène présent dans les tissus. Ceci a récemment été confirmé par une étude menée par (Froidevaux *et al.*, 2023). Dans cette étude, Froidevaux *et al.* ont irradié des suspensions de lipides à différents débits de dose, allant des débits conventionnels à des conditions menant à l'effet FLASH. Dans ces conditions, la peroxydation des lipides fut fortement inhibée.

L'hypothèse d'une carence en oxygène comme explication majeure de l'effet FLASH est cependant très discutée, et des études récentes semblent plutôt indiquer que la consommation d'oxygène serait trop faible, y compris à très haut débit de dose (Jansen *et al.*, 2021) (Boscolo *et al.*, 2021). D'autres hypothèses ont été proposées, comme une augmentation des recombinaisons des espèces radicalaires. Celle-ci aboutirait à une diminution du rendement de ces espèces, réduisant l'altération de certaines biomolécules (Favaudon *et al.*, 2022).

## Effet du débit de dose sur la radiolyse de l'eau

Nous avons cherché à étudier les effets du débit de dose sur plusieurs espèces de radiolyse de l'eau, dans des conditions aussi proches que possible. Dans le cadre de cette thèse, les rendements en HO• et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été déterminés à différents débits de dose et avec plusieurs rayonnements ionisants.

### 1/ L'eau oxygénée - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les rendements en eau oxygénée ont été mesurés avec plusieurs types de rayonnements : RX de 6 MeV, électrons, protons de 24 MeV dans le plateau, protons de 2 MeV, hélions de 21 MeV et ions carbone de 41 MeV. Dans tous les cas, du nitrate de sodium, de concentration 25 mM était présent en solution par capturer l'électron hydraté à un temps de capture de 4 ns.

Toutes les expériences ont été réalisées sous argon, à l'exception de celles avec des électrons de 1 MeV. Des expériences menées avec des rayons X et des protons de 2 MeV avaient abouti à des rendements en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> identiques sous argon et en milieu aéré. Ceci s'explique par la présence du nitrate de sodium, qui permet de piéger l'électron hydraté à un temps bien plus court que celui de sa réaction avec le dioxygène dissous (300 ns avec 240 μM de O<sub>2</sub> dissous). Ainsi, les différentes mesures restent comparables.

Avec les ions He et C de 21 et 41 MeV respectivement, les rendements en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aux différents débits de dose n'ont été mesurés qu'au seul temps de capture de 74 ns. Les valeurs de G<sup>∞</sup>(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ont donc été extrapolées à partir de ces rendements en utilisant le facteur p de la représentation de G(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en fonction de  $\sqrt[3]{k * [X]}$  (Chapitre 3 - B/).

Pour rappel, ce facteur p est le coefficient directeur de la fonction affine  $G(\text{H}_2\text{O}_2) = f(\sqrt[3]{k * [X]})$ , où X est ici Br<sup>-</sup>. Cette représentation permet de retrouver la valeur du rendement radiolytique en eau oxygénée à temps long, lorsque [Br<sup>-</sup>] = 0 noté G<sup>∞</sup>(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ce facteur a été déterminé pour un débit de dose où la concentration en KBr a été modulée, puis appliqué aux autres débits de dose.

G<sup>∞</sup>(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a également été déterminé par cette représentation pour les autres rayonnements.

La *Figure 6-3* présente les évolutions avec le débit de dose des rendements radiolytiques à temps long, sans capture de HO•, de l'eau oxygénée. La *Figure 6-3a* présente des rendements différentiels, G'<sup>∞</sup>(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et la *Figure 6-3b* des rendements intégraux, G<sup>∞</sup>(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les rendements mesurés avec des électrons de 1 MeV et des protons de 24 MeV dans le plateau sont très proches et présentent des évolutions similaires avec le débit de dose. Dans le plateau, le TEL des protons de 24 MeV, 3,0 eV/nm, est faible, ce qui explique cet accord des rendements mesurés. Dans le cas des électrons de 10 MeV, à très haut débit de dose, G'<sup>∞</sup>(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) semble augmenter. Cependant, seuls trois débits de dose élevés ont pu être utilisés avec ces particules, des expériences complémentaires avec des répliques devront être menées pour éventuellement confirmer la tendance observée.

Pour les ions (H, He et C) de moyenne énergie, on observe une diminution régulière du rendement en eau oxygénée avec le débit de dose (*Figure 6-3b*).

D'autre part, les rendements mesurés au débit de dose le plus bas pour les ions C et He sont supérieurs à 1,2 espèce/100 eV, dépassant les données de la littérature mesurées avec des ions similaires. Dans la littérature, les rendements pour ces ions dans des conditions similaires sont donnés à 0,95 esp/100 eV pour des ions He et C pour des TEL équivalents à ceux utilisés dans notre étude (Pastina & LaVerne, 1999). Le débit de dose le plus faible accessible à ces énergies au HIMAC étant déjà supérieur à  $10^4$  Gy/s, il n'a pas été possible de mesurer les rendements en  $H_2O_2$  à faible débit de dose dans ces conditions, ce qui aurait permis une comparaison avec la littérature sans effet de débit de dose. Ces rendements élevés peuvent donc également être liés au débit de dose. On observe également l'absence d'effet de TEL sur les rendements entre les ions carbone (TEL initial 540 eV/nm), et les ions He (TEL initial 53 eV/nm). Les recombinaisons induites par les débits de dose élevés pourraient donc être prépondérantes par rapport à celles induite par la densité locale de dépôt d'énergie des ions.

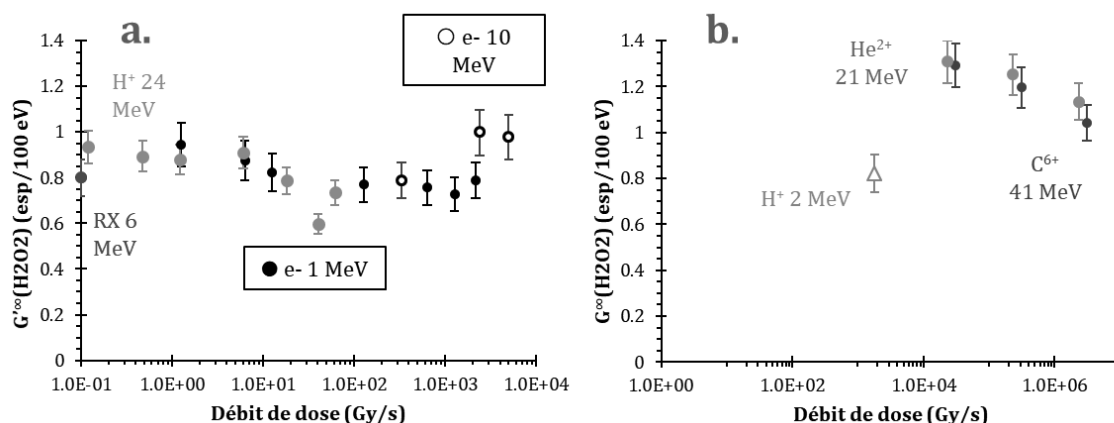
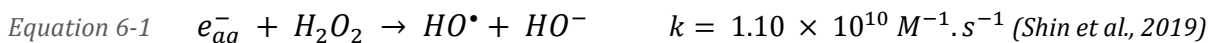


Figure 6-3 Evolution de  $G^\infty(H_2O_2)$  en fonction du débit de dose pour différents rayonnements ionisants.  
 a. Rendements différentiels :  $H^+$  24 MeV (●), électrons de 1 MeV (●) et de 10 MeV (○), RX 6 MeV (●)  
 b. Rendements intégraux :  $H^+$  2 MeV (△), He de 21 MeV (●) et des C de 41 MeV (●).

La diminution des rendements en eau oxygénée observée peut s'expliquer par analogie avec les observations faites lors de l'étude des effets de TEL.

Comme nous l'avons vu, en l'absence de dioxygène, ou lorsque  $e^-_{aq}$  est piégé efficacement, l'eau oxygénée est produite par recombinaison de deux radicaux hydroxyles entre eux. Parallèlement, les traces se rapprochent les unes des autres et des réactions telles que celle entre  $e^-_{aq}$  et  $H_2O_2$  (Equation 6-1) ou encore entre  $e^-_{aq}$  et  $HO^\bullet$  (Equation 6-2) pourront se faire à des temps de plus en plus courts. La formation d'eau oxygénée sera donc concurrencée par ces réactions, ce qui pourrait expliquer la baisse de rendement observée.



Nos résultats ne suivent pas les tendances décrites dans la plupart des simulations Monte Carlo en fonction du débit de dose (Alanazi et al., 2021; Chappuis et al., 2022; R. Watanabe & Saito, 2001). Cependant, les tendances observées sont similaires à celles décrites dans les études expérimentales parues dans la littérature (Blain et al., 2022; Kacem, Psoroulas, et al., 2022).

Celles-ci ont été réalisées sous air et sans capture de l'électron hydraté, et ont abouti à une diminution significative du rendement en  $H_2O_2$  formé avec le débit de dose.

Cette observation étant faite en présence ou en absence de dioxygène, une carence en  $O_2$  n'est probablement pas responsable de la diminution de la formation de l'eau oxygénée à haut débit de dose. Les études présentées pourront être complétées à l'aide d'expériences supplémentaires avec des électrons de 10 MeV, pour lesquels le débit de dose pourra être encore significativement augmenté, jusqu'à être comparable à celui des ions de haut TEL. L'étude du radical hydroxyle apportera également un éclairage sur les effets de débit de dose observés.

## 2/ Le radical hydroxyle - $HO\cdot$

Le radical hydroxyle est à l'origine de la formation d'une part importante de l'eau oxygénée par la radiolyse de l'eau, par recombinaison avec lui-même. L'évolution de son rendement radiolytique avec le débit de dose est donc également liée à celle de  $H_2O_2$ . Elle est également liée aux effets du débit de dose sur la radiolyse de biomolécules. Les mesures présentées dans la suite de ce chapitre ont été pour la plupart réalisées avec la sonde KBr/formiate, dont nous avons montré au chapitre 3 que le mécanisme ne variait pas avec le débit de dose.

### *Les électrons – impact du temps de capture et de la structure temporelle du faisceau*

Sous faisceau d'électrons de 1 MeV, les rendements ont été mesurés à différents temps de capture pour chaque débit de dose. En effet, l'augmentation des recombinaisons radicalaires inter-traces attendue à haut débit de dose devrait dépendre du temps dont disposent les radicaux pour réagir entre eux. Pour ces expériences, des mesures ont été faites à l'aide de trois sondes moléculaires, KBr/formiate, C3CA et téréphtalate (TA).

L'évolution avec le débit de dose de la formation de 2OH-TA à partir du TA s'est révélée fortement différente de celle de la sonde KBr/Formiate, considérée comme référence (**Chapitre 3 - A**). Ceci peut s'expliquer par un effet de débit de dose sur le mécanisme de radiolyse, comme discuté au chapitre 3. Alors qu'avec des protons de 24 MeV, c'était aussi le cas de la C3CA, les résultats obtenus avec cette dernière étaient ici en très bon accord avec ceux mesurés avec la sonde KBr/Formiate (*Annexe 12*), pour l'ensemble des temps de capture.

La *Figure 6-4* montre l'évolution de  $G(HO\cdot)$  à différents temps de capture en fonction du débit de dose. Les rendements présentés pour des temps de 7,4 ns à 1480 ns correspondent aux moyennes des données obtenues à partir des sondes KBr/formiate et C3CA. Les données présentées aux temps de captures plus courts sont des mesures réalisées uniquement avec la sonde KBr/formiate, seule sonde suffisamment soluble dans l'eau pour les atteindre.

Les rendements observés ne varient pas aux faibles débits de dose, quel que soit le temps de capture considéré. On observe ensuite une diminution importante du rendement, variable selon le temps de capture considéré : ~20 % pour 0,37 ns et ~40% pour 1480 ns.

L'inflexion des valeurs de rendements est observée à partir d'un débit de dose seuil qui dépend également du temps de capture, 635 Gy/s pour 0,37 ns et 12,7 Gy/s pour 1480 ns. Au-delà de ce seuil, on observe à nouveau un plateau, les rendements restant stables sur une large gamme de hauts débits de dose.

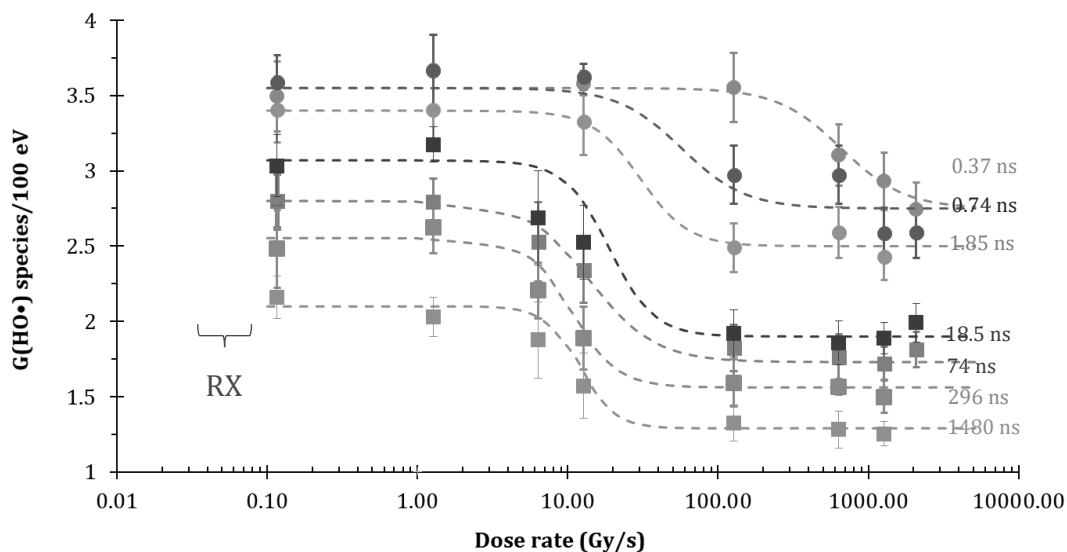


Figure 6-4 Evolution de  $G(\text{HO}\cdot)$  sous irradiation par des électrons de 1 MeV et des rayons X de 6 MeV (pour le débit de dose CONV) en fonction du débit de dose instantané. Les symboles ■ correspondent à la moyenne des sondes C3CA et KBr/formiate, les symboles ● correspondent à la sonde KBr/formiate uniquement. Les lignes en pointillés sont des fits empiriques pour guider le regard.

Lorsque le débit de dose croît, le nombre de traces formées simultanément dans la solution augmente, et celles-ci vont donc être de plus en plus proches les unes des autres. Cette augmentation de la proximité des traces couplée à la diffusion des espèces formées va donc entraîner l'apparition des réactions **inter-traces**. Les principales réactions conduisant à une diminution du rendement de  $\text{HO}\cdot$  sont sa recombinaison avec lui-même, formant de l'eau oxygénée, ou sa réaction avec l'électron hydraté. Si l'effet principal était une réaction de recombinaisons  $\text{HO}\cdot + \text{HO}\cdot$ , on devrait observer une augmentation de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  avec le débit de dose. Or nos données sur l'eau oxygénée indiquent que ce n'est pas le cas. La diminution de  $G(\text{HO}\cdot)$  observée ici étant conjuguée à une diminution de  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$ , l'augmentation du débit de dose pourrait donc favoriser plutôt la réaction entre  $e_{aq}^-$  et  $\text{HO}\cdot$ , dont la constante de vitesse est la plus élevée des deux ( $k_{\text{HO}\cdot}^{e_{aq}^-} = 2.95 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $k_{\text{HO}\cdot}^{\text{HO}\cdot} = 5.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Shin *et al.*, 2019)). L'acquisition de données concernant l'électron hydraté dans ces conditions sera nécessaire pour valider cette hypothèse.

Le débit de dose seuil d'inflexion de  $G(\text{HO}\cdot)$  augmente à mesure que le temps de capture diminue. A cela s'ajoute une diminution relative plus faible à temps de capture court. La ou les réactions susceptibles d'abaisser les valeurs de  $G(\text{HO}\cdot)$  étant ici des réactions **inter-traces** se faisant suite à un rapprochement des traces et de la diffusion, elles auront lieu à des temps plus longs que les réactions **intra-traces**. Celles-ci dépendent du TEL, à l'échelle de quelques picosecondes par recouvrement des *spurs*.



Ainsi, plus le temps de capture étudié est court, plus il est nécessaire de rapprocher les traces les unes des autres pour voir un effet et donc d'augmenter le débit de dose, ce qui explique l'évolution observée avec le temps de capture.

La stabilisation du rendement en HO• à haut débit de dose, également observée pour l'eau oxygénée dans l'étude de (Blain *et al.*, 2022), est plus délicate à expliquer.

Les réactions inter-traces se produisant davantage avec le débit de dose, on peut supposer que ce plateau à haut débit de dose est lié à un équilibre entre plusieurs réactions de recombinaison, qui serait atteint au-delà du débit seuil. La recombinaison  $e^-_{aq} + e^-_{aq}$  pourrait ainsi devenir plus efficace et contrebalancer partiellement la réaction entre l'électron hydraté et HO•.

Des expériences ont été réalisées avec des électrons de 10 MeV sur la plateforme FeeriX d'Aerial-CRT. Les électrons de 10 et 1 MeV ont des TEL très proches, respectivement 0.19 eV/nm et 0.25 eV/nm. Le but de cette première série d'expériences était de comparer les rendements obtenus avec des rayonnements similaires, mais des faisceaux de structures temporelles différentes. En effet, il est très probable que l'effet FLASH, et de manière générale les effets de débit de dose, soient liés également à ce paramètre. Le faisceau d'électrons de 1 MeV est produit continu dans un accélérateur Van de Graaff, et celui d'électrons de 10 MeV sur FeeriX est nano-pulsé à 104 MHz.

Les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure 6-5*, avec l'évolution de  $G(HO^\bullet)$  en fonction du temps de capture pour les différents rayonnements et débits de dose.

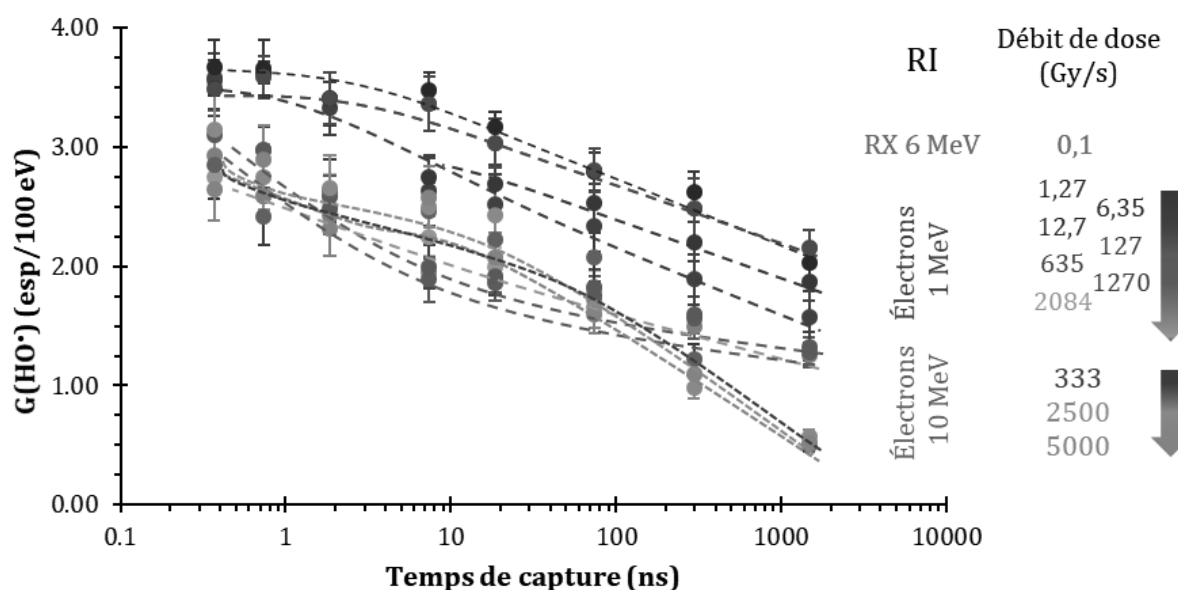


Figure 6-5 Evolution de  $G(HO^\bullet)$  en fonction du temps de capture pour des Rayons X de 6 MeV, des électrons de 1 MeV et des électrons de 10 MeV à différents débits de dose. Les lignes en pointillés servent uniquement de guide.

Les résultats obtenus avec les deux faisceaux sont similaires pour les temps de capture correspondant à l'étape de chimie inhomogène (<100 ns). On constate une diminution de  $G(HO^\bullet)$  aux temps de capture élevés beaucoup plus importante avec les électrons de 10 MeV par rapport aux données avec le faisceau d'électrons de 1 MeV. Les impulsions du faisceau d'électrons de 10 MeV sont séparées d'un peu moins de 10 ns. La diminution observée au-delà de 100 ns peut donc s'expliquer par des

recombinaisons inter-traces qui commencent à se faire également entre des impulsions successives, et non au sein d'une impulsion unique. Ceci souligne l'importance de la structure temporelle du faisceau. Ceci rend délicate la comparaison de données obtenues sur des plateformes différentes.

*Les protons – rendements différentiels et intégraux – impact du temps de capture*

La Figure 6-6 présente l'évolution des rendements différentiels et intégraux en fonction du temps capture sous faisceaux de protons de 24 MeV à un temps de capture de 296 ns, en fonction du débit de dose. Les rendements obtenus à un temps de 74 ns et déjà présentés précédemment (Chapitre 3 - A), sont également représentés pour comparaison. Dans le cas de rendements intégraux, le débit de dose a été calculé en considérant uniquement le volume irradié, en tenant compte de la profondeur de pénétration des ions, 6 mm.

Même à un temps de capture plus élevé de 300 ns, on n'observe pas d'effet de dose significatif sur les rendements mesurés, comme à 74 ns.

L'effet du débit de dose semble donc n'être observé que pour des électrons à ces temps de capture et débits de dose, malgré des TEL relativement proches de 3,0 eV/nm pour les H<sup>+</sup> dans le plateau et 4,1 eV/nm pour les H<sup>+</sup> s'arrêtant dans la solution (rendements intégraux) et 0,25 eV/nm pour les électrons).

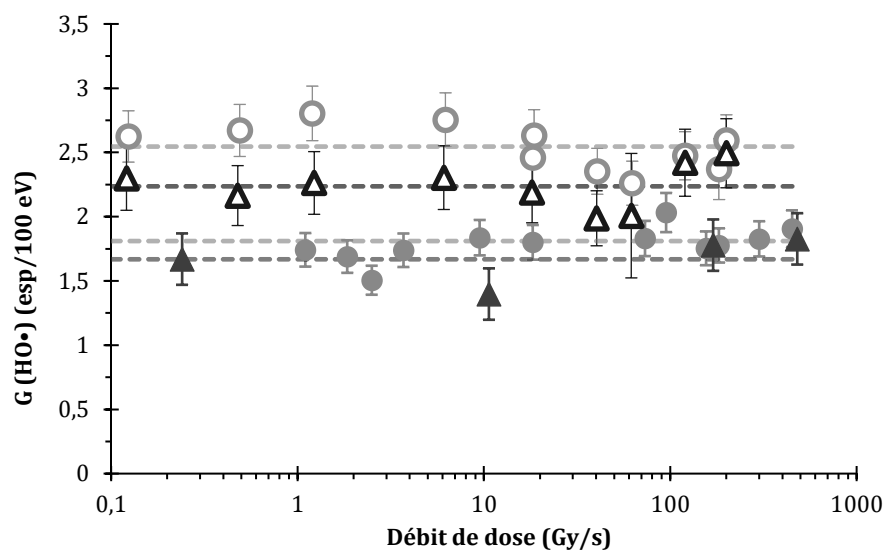


Figure 6-6 Evolution du rendement radiolytique en HO• en fonction du débit de dose sous irradiation par des protons de 24 MeV. Les symboles ouverts correspondent aux rendements différentiels et les symboles pleins aux rendements intégraux. Les symboles ●○ sont pour un temps de capture de 74ns et ▲▲ de 296 ns. Les lignes hachurées appuient la tendance constante de l'évolution

La comparaison des résultats obtenus avec des faisceaux d'électrons et de protons pourrait indiquer qu'un débit de dose plus important est nécessaire pour observer un effet de débit de dose lorsque le TEL augmente. Les réactions **intra-traces** se produisant lors de l'irradiation par des particules de TEL au-delà de 3,0 eV/nm vont grandement réduire la quantité d'espèces s'échappant des traces, rendant alors plus difficile des réactions **inter-traces** à des temps plus avancés. Cette hypothèse est en accord avec les observations réalisées par (Ramos-Méndez *et al.*, 2020) par simulation Monte-Carlo avec l'outil TOPAS-nBio. Leurs résultats montrent que les réactions inter-traces apparaissent à bas TEL

avec des protons de 100 MeV (TEL = 0,8 eV/nm) et sont totalement absentes pour des protons de 1 MeV (TEL = 23,6 eV/nm).

Des expériences complémentaires avec les protons à des débits de dose supérieurs à 1000 Gy/s seront intéressantes afin de déterminer si un effet apparaît avec des protons de 24 MeV. Des mesures à temps de capture plus élevé seront également utiles pour déterminer si un effet apparaît comme c'est le cas pour les simulations Monte-Carlo (Chappuis et al., 2022).

### Vision globale à 74 ns

L'ensemble des résultats précédents obtenus à un temps de capture de 74 ns sont récapitulés dans la *Figure 6-7*, ainsi que ceux obtenus avec des ions lourds de moyenne énergie au HIMAC.

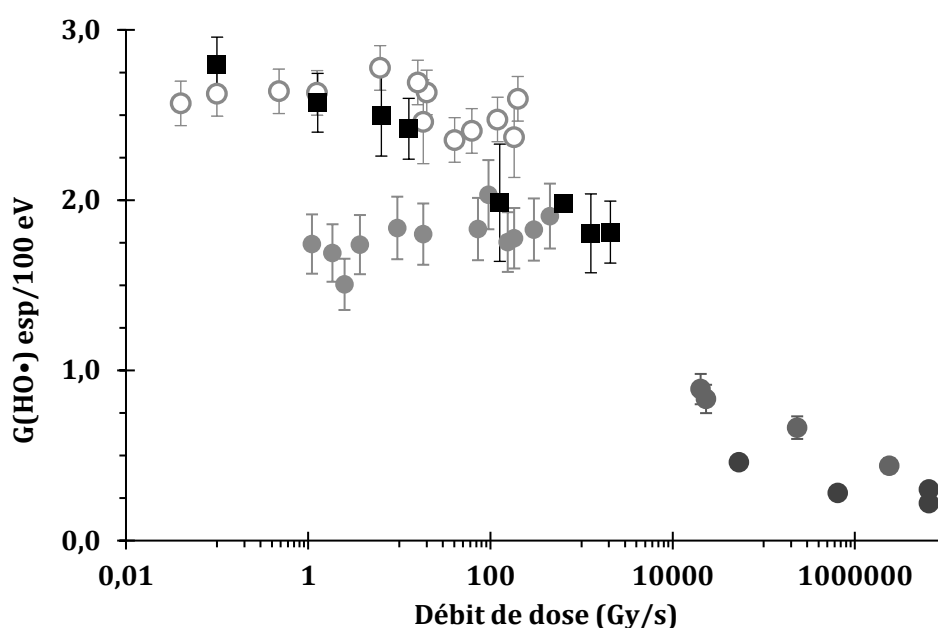


Figure 6-7 Evolution de  $G(\text{HO}\cdot)$  à un temps de capture de 74 ns en fonction du débit de dose pour des  $\text{H}^+$  24 MeV (● rendements intégraux et ○ rendements différentiels), des électrons de 1 MeV (■), He 21 MeV (●) et C 41 MeV (●).

Pour les ions lourds de notre étude,  $\text{He}^{2+}$  d'énergie 21 MeV et des  $\text{C}^{6+}$  d'énergie 41 MeV, les débits de doses sont particulièrement élevés. Les rendements intégraux mesurés avec les ions carbone sont systématiquement plus faibles qu'avec les ions He, en raison de l'effet de TEL. Pour les deux rayonnements, on observe une diminution significative du rendement en  $\text{HO}\cdot$  avec le débit de dose. Celui-ci est suffisamment élevé pour avoir un impact sur les rendements intégraux mesurés avec ces ions, contrairement à ceux obtenus avec des protons de 24 MeV. Comme décrit dans le chapitre traitant des effets du TEL, les rendements obtenus pour les ions He et C de moyenne énergie au débit de dose le moins élevé ici est proche de ceux obtenus dans la littérature (Burns & Sims, 1981; M. Smith et al., 2021). Ceci pourrait indiquer que dans ces conditions, l'effet du débit de dose est minimal.

Lorsqu'on compare les données obtenues avec des RX de 6 MeV / électrons de 1 MeV et celles avec des protons de 24 MeV, on observe que les rendements différentiels en  $\text{HO}\cdot$  mesurés à bas débits de dose sont très similaires. Ceci est en accord avec le TEL faible des protons de 24 MeV dans le plateau, 3,0

eV/nm. A haut débit de dose, les rendements en HO• obtenus sous électrons de 1 MeV diminuent, et alors très proches des rendements intégraux mesurés avec des protons de 24MeV.

Le rendement obtenu à haut débit de dose avec les électrons atteint un plateau, que nous supposons lié à un équilibre atteint entre les réactions de recombinaisons radicalaires. A haut débit de dose sous électrons de 1 MeV, la densité globale de radicaux produits en solution pourrait alors être similaire à la densité moyenne dans une trace de protons de 24 MeV comprenant le pic de Bragg, avec un équilibre similaire entre réactions radicalaires.

### 3/ S'affranchir des effets sur les sondes organiques

#### *Principe de la méthode*

Lors de cette étude, nous avons montré que les résultats obtenus par mesure indirecte utilisant des sondes organiques, comme TA et C3CA, étaient biaisés en raison d'un effet du débit de dose sur les mécanismes de radiolyse après réaction avec le radical hydroxyle. Une hypothèse est que les radicaux organiques formés ayant une durée de vie plus importante que les espèces de radiolyse de l'eau, ceux-ci s'accumulent, ce qui favorise les réactions inter-traces, induisant un effet de débit de dose. Afin de contourner ce phénomène, une solution pourrait être de stabiliser le taux de production de l'espèce fluorescente par réaction de la sonde avec HO•. Il s'agit ici d'ajouter en solution un oxydant fort, capable de réagir avec l'intermédiaire radicalaire hydrocyclohexadiényle formé avec C3CA ou TA lors de la réaction avec HO• (Fang *et al.*, 1995).

Plusieurs candidats ont été envisagés pour être utilisés comme oxydant pour cette méthode. Ceux-ci ont tous été décrits dans la littérature comme capables d'oxyder efficacement le radical hydroxycyclohexadiényle :  $K_3Fe(CN)_6$ ,  $Na_2Ir(Cl)_6$  et  $KMnO_4$  (Crawford *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1996)

Le sel d'iridium est instable à l'air, ce qui nécessite des expériences sous atmosphère inerte. Dans notre cas, le système souhaité doit pouvoir fonctionner sous air, pour être dans les conditions standard de mesure de HO•. Dans le cas du permanganate de potassium, de premiers essais ont montré qu'il réagissait directement avec la C3CA.  $K_3Fe(CN)_6$  étant stable en conditions aérées et ne réagissant pas avec C3CA ou TA, nos essais ont porté sur cet oxydant.

Le radical hydrocyclohexadiényle peut emprunter trois voies réactionnelles : réaction avec l'oxygène (*Figure 6-8*, voie 2), dismutation (voie 4) et réaction avec l'oxydant ajouté (voie 5). En présence d'une concentration suffisante en  $Fe(CN)_6^{3-}$ , cette dernière réaction peut devenir prédominante, si elle est suffisamment rapide (*Figure 6-8*). En diminuant la durée de vie du radical hydrocyclohexadiényle, le taux de production serait alors fixe malgré une modification du débit de dose.

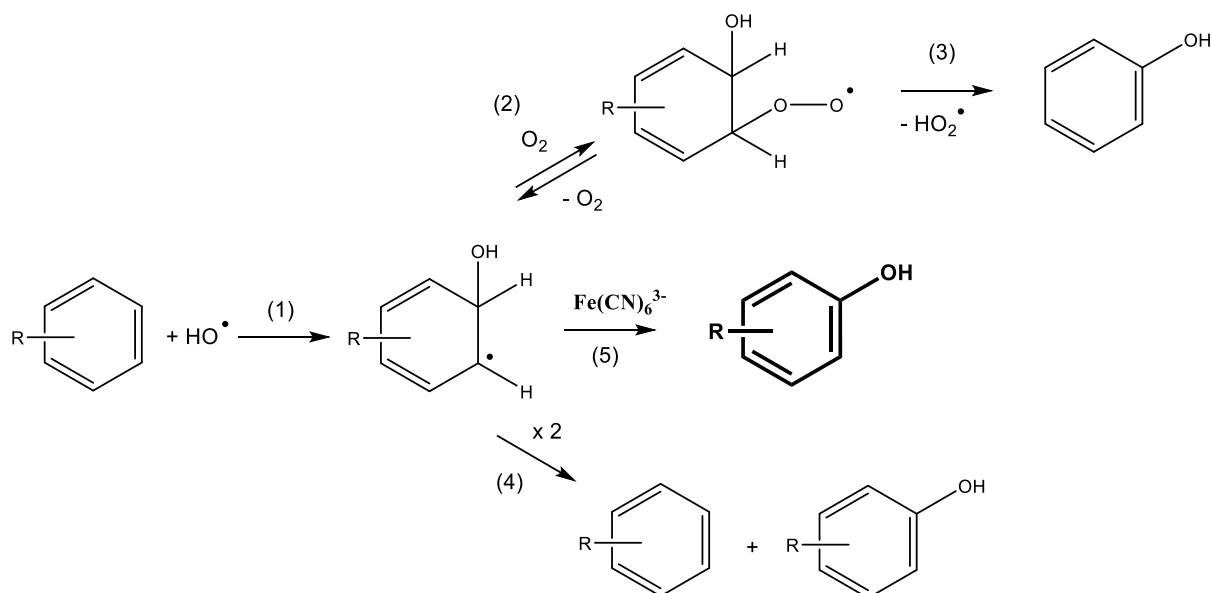


Figure 6-8 Mécanisme réactionnel d'hydroxylation d'un cycle benzénique valable pour la sonde TA et C3CA menant à la formation de produits mono-hydroxylés en présence de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ .

#### Mise au point de la méthode à ICANS

Afin de tester la faisabilité de cette méthode, des expériences préliminaires ont été réalisées à l'ICANS, sous rayons X de 6 MeV à débit de dose conventionnel (0.1 Gy/s). Les solutions de sondes molécules organiques (TA et C3CA) ont ainsi été préparées pour un temps de capture en  $\text{HO}^\bullet$  de 74 ns (2 mM pour C3CA et 3.38 mM pour TA). Du Ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) a été ajouté dans ces solutions, à différentes concentrations pour déterminer une concentration optimale en oxydant. L'effet de la présence de dioxygène a aussi été étudié, en irradiant des solutions sous atmosphère saturée en  $\text{O}_2$ , afin de vérifier que l'oxydation par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  était bien la voie dominante par rapport à une réaction avec  $\text{O}_2$ .

La Figure 6-9 montre l'évolution du taux de production,  $G/G(\text{HO}^\bullet)$  en espèce fluorescente pour les deux sondes, en fonction de la concentration en oxydant. En présence de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , les rendements de formation des espèces fluorescentes 7-OH-C3CA et 2-OH-TA augmentent significativement, dès la première concentration en oxydant testée. Sans oxydant, un excès d'oxygène induit une légère augmentation du rendement observé en espèce fluorescente, la voie de formation par dismutation étant défavorisée. Après ajout de l'oxydant, le rendement de 2OH-TA ne dépend plus de la quantité d' $\text{O}_2$ . Avec la C3CA, les rendements augmentent en présence d'oxydant, mais retrouvent le niveau initial à forte concentration. D'autre part, les rendements mesurés sous  $\text{O}_2$  pur sont systématiquement inférieurs à ceux en milieu aéré en présence d'oxydant.

Il est possible également que la régiosélectivité varie en faveur de la 7-OH-C3CA, cela n'a toutefois pas été vérifié. Dans le cas de TA, la présence des deux groupements  $\text{COO}^-$  sur le cycle benzénique rend la réaction avec  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  plus compliquée, comme suggéré par (Fang *et al.*, 1996), ce qui peut expliquer l'augmentation relative plus faible.

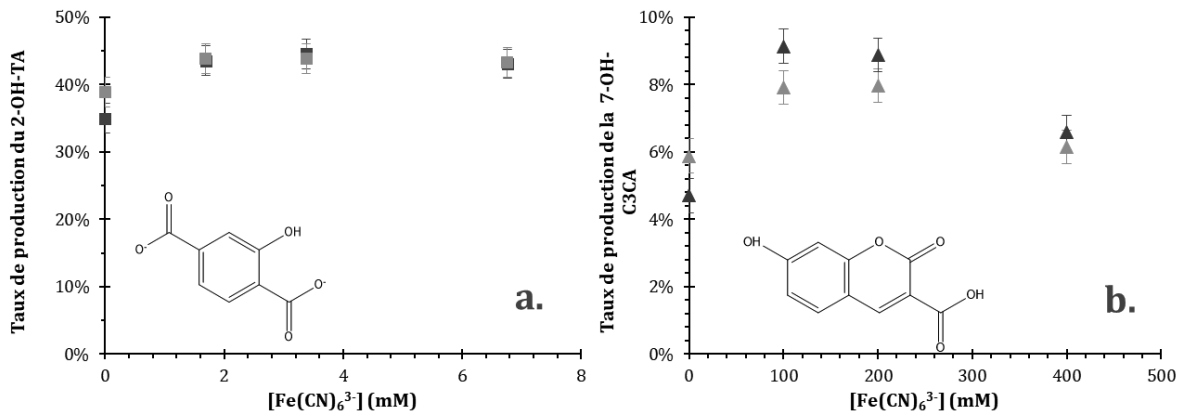


Figure 6-9 Evolution du taux de production en espèce fluorescente après réaction de la sonde avec le radical hydroxyle en fonction de la concentration en  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  pour la sonde TA (a, ■) et la sonde C3CA (b, ▲). Les symboles orange correspondant à des mesures sous oxygène pur et les symboles bleus à des mesures sous air. Le temps de capture est fixé à 74 ns.

La concentration optimale en oxydant pour le système  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -C3CA s'est avérée être de l'ordre de 100 mM. Cette concentration est particulièrement élevée en raison de la constante de vitesse de réaction relativement faible de l'intermédiaire avec  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  ( $k_{\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}}^{[\text{R-OH}]^*} = 1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour un cycle aromatique (Steenken & Neta, 1982)), par rapport à la constante de vitesse de la réaction du radical hydroxyle avec  $\text{O}_2$  d'après Yamashita *et al.*, 2012 ( $k_{\text{O}_2}^{[\text{C3CA-OH}]^*} = 1.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Une concentration importante en oxydant est donc nécessaire pour que la compétition soit en faveur de la nouvelle voie réactionnelle. C'est d'ailleurs probablement la raison pour laquelle le rendement est plus faible en milieu sur-oxygéné, avec une compétition qui se déplace en faveur de la réaction avec  $\text{O}_2$ , qui serait moins efficace pour la formation de la 7OH-C3CA.

Pour la sonde TA, la constante vitesse de l'intermédiaire avec  $\text{O}_2$  est nettement plus faible ( $k_{\text{O}_2}^{[\text{TA-OH}]^*} = 2.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , (Fang *et al.*, 1996)), d'où une concentration optimale en oxydant déterminée à 3.4 mM, soit en conditions équimolaires. Ces concentrations ont donc été utilisées lors des premiers essais en faisant varier le débit de dose.

#### Effet du débit de dose en présence de $\text{K}_3\text{FeCN}_6$ sous faisceaux d'électrons de 10MeV

Les premiers tests d'effets du débit de dose sur les systèmes  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -TA et  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -C3CA ont été réalisées en milieu aéré, sous faisceaux d'électrons de 10 MeV (Feerix, Aerial-CRT), pour une concentration en sonde fixée à 74ns. Les résultats sont présentés dans la Figure 6-10 pour des rendements en espèce fluorescente normalisés par rapport au rendement mesuré à bas débit de dose (RX 6 MeV).

Entre le débit de dose conventionnel, correspondant aux RX de 6 MeV de l'ICANS, et les débits de dose élevés fournis par l'accélérateur Feerix, la sonde KBr/formiate, considérée comme sonde de référence, indique une diminution de  $G(\text{HO}^*)$  de l'ordre de 35%, avec un plateau dès 100 Gy/s pour un temps de capture de 74 ns (Figure 6-4).

En absence d'oxydant, la valeur relative du rendement en HO• mesuré avec la sonde TA diminue jusqu'à 45%, soit nettement plus que l'évolution mesurée avec la sonde KBr/formiate, et aucun plateau n'est observé. En présence d'oxydant, la baisse du rendement devient du même ordre de grandeur que celle observée avec la sonde KBr/formiate (30-38%). Cependant, ce rendement semble continuer de diminuer au-delà de 100 Gy/s, ce qui montre qu'un effet sur la sonde pourrait être toujours présent.

Dans le cas de la sonde C3CA, la diminution observée est bien plus faible en présence d'oxydant, de 35% environ contre 60% en l'absence d'oxydant. Les rendements aux trois débits de dose sont d'autre part très proches. En présence de  $K_3Fe(CN)_6$ , la sonde C3CA donne donc des résultats très proches de ceux obtenus sur le radical hydroxyle avec la sonde KBr/formiate.

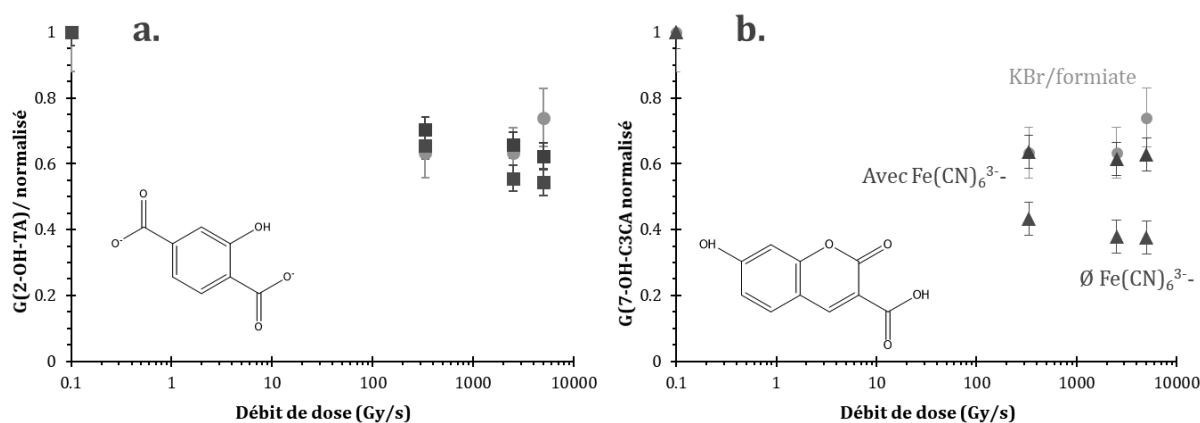


Figure 6-10 Evolution du rendement radiolytique normalisé sur le rendement déterminé à bas débit de dose en espèce fluorescente en fonction du débit de dose sous irradiation par des électrons de 10 MeV pour la sonde TA (a., ■) et la sonde C3CA (b., ▲). Les symboles rouges correspondent à des mesures sans  $Fe(CN)_6^{3-}$ , les symboles bleus à des mesures avec  $Fe(CN)_6^{3-}$ , et ● correspondent aux valeurs obtenues pour KBr/formiate. Le temps de capture est fixé à 74ns.

Il a donc été possible de s'affranchir d'un effet du débit de dose sur le mécanisme de formation de l'espèce mesurée dans le cas de la C3CA en ajoutant un oxydant au système. Concernant la sonde TA, bien que les différentes concentrations en oxydant utilisées à bas débit de dose aient abouti à un rendement augmenté et stable, une concentration plus élevée en oxydant serait très certainement nécessaire pour maintenir la voie d'oxydation par  $Fe(CN)_6^{3-}$  comme voie principale lors d'une augmentation du débit de dose.

Pour la poursuite de cette étude, il serait intéressant de tester la validité de la méthode dans des conditions où l'effet propre aux sondes organiques est encore plus marqué. Les protons de 24 MeV à CYRCé sont des candidats de choix, car aucun effet du débit de dose n'est observé sur KBr/formiate dans ces conditions alors que des variations importantes ont été mesurées pour les deux sondes organiques. S'il était confirmé que l'ajout d'un oxydant comme  $K_3Fe(CN)_6$  élimine les effets de débit de dose observés avec la C3CA, celle-ci pourrait être utilisée, avec comme avantage sur KBr/formiate une excellente sensibilité, et de ne nécessiter l'irradiation que d'une solution.

Nos résultats concernant l'eau oxygénée montrent une diminution du rendement avec le débit de dose, ce qui n'est pas en accord avec les simulations mais cohérent avec d'autres études expérimentales. Ainsi, alors que  $G(\text{H}_2\text{O}_2)$  augmente avec le TEL jusqu'à 100 eV/nm, il diminue avec une augmentation des réactions inter-traces.

Concernant le radical hydroxyle, nous n'observons pas d'effet du débit de dose pour tous les rayonnements utilisés dans nos conditions expérimentales. Aucun effet n'est observé pour des protons de 24 MeV, alors que le rendement en  $\text{HO}\cdot$  diminue au-delà d'un seuil en débit de dose avec des électrons de 1 MeV, jusqu'à atteindre un plateau.

### **C/ Effets du débit de dose sur la radiolyse de biomolécules**

À un temps de capture de 74ns, le débit de dose n'affecte les rendements en radical hydroxyle qu'avec certains rayonnements ionisants. Comme cela a été discuté dans ce chapitre et dans le chapitre 3, les mécanismes de radiolyse des sondes organiques TA et C3CA sont particulièrement sensibles au débit de dose. Celles-ci réagissant avec  $\text{HO}\cdot$  de façon analogue aux acides aminés aromatiques, avec formation d'un radical intermédiaire de type hydroxycyclohexadiényle. Un effet sur les mécanismes moléculaires de ces biomolécules est donc tout à fait envisageable, y compris dans des conditions pour lesquelles aucun effet n'est observé sur  $\text{HO}\cdot$ . Cet effet a été étudié sur la phénylalanine et sur le tryptophane, acides aminés aromatiques, et la méthionine, qui a une réactivité différente.

#### **1/ La méthionine**

Des irradiations de solutions aqueuses de méthionine ont été réalisées sous faisceaux d'électrons de 1 MeV et de protons de 24 MeV, à différents débits de doses. Les rendements des deux produits de radiolyse majoritaires, le sulfoxyde de méthionine et le méthional, ont ainsi pu être mesurés dans les mêmes conditions que la radiolyse de l'eau. Ces rendements ont pu être normalisés par rapport aux espèces principalement à l'origine de leur formation :  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour le sulfoxyde et  $\text{HO}\cdot$  pour le méthional. L'évolution des rendements radiolytiques et de ces rendements pondérés des produits de radiolyse est présentée *Figure 6-11*. Dans le cas du sulfoxyde de méthionine, le rendement en  $\text{H}_2\text{O}_2$  considéré est celui mesuré au même temps de capture que  $\text{HO}\cdot$ , 74ns, et en milieu aéré.

Dans la gamme de débits de dose considérés, on n'observe aucune variation des rendements en méthional avec le débit de dose, que ce soit avec des électrons ou des protons (*Figure 6-11a. et b.*). Le mécanisme de formation de ce composé n'est donc pas modifié par une augmentation de réactions inter-traces avec le débit de dose.



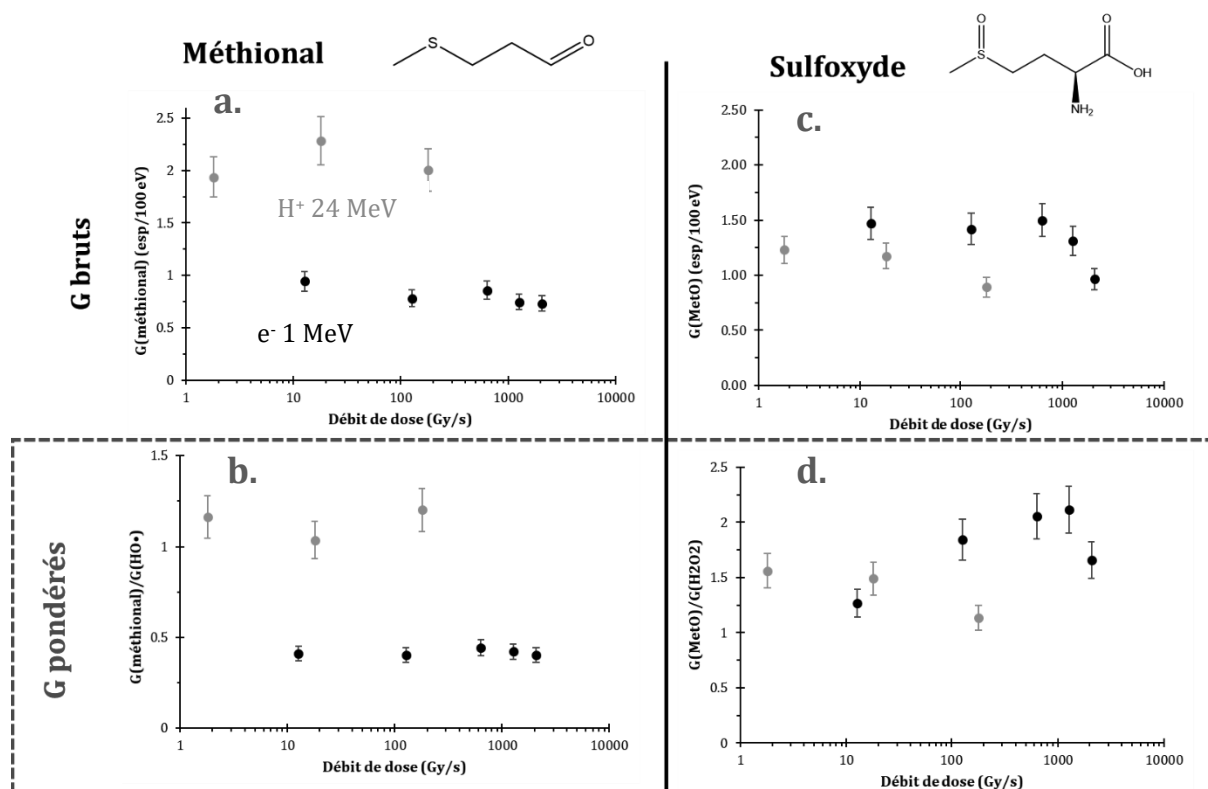


Figure 6-11 A gauche : Evolution du rendement en méthional, à droite : évolution du rendement on sulfoxyde de méthionine. Les rendements présentés en haut sont les rendements bruts, directement mesurés, et les rendements présentés en bas sont pondérés par  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour le sulfoxyde et  $\text{HO}\cdot$  pour le méthional mesurés dans les mêmes conditions. ●  $\text{H}^+$  24 MeV (rendements intégraux), ● électrons 1 MeV

Concernant le sulfoxyde de méthionine, on observe une diminution des rendements bruts mesurés avec les protons de 24 MeV entre les trois débits de dose étudiés, jusqu'à 30 % (Figure 6-11c.). Avec des électrons de 1 MeV, les rendements sont similaires à ceux des protons à bas débit de dose, et restent stables jusqu'à 1270 Gy/s. Au-delà, ceux-ci décroissent également avec le débit de dose. Pour les expériences réalisées à débits de dose élevés, les doses déposées ( $2 \times 100$  Gy) étaient plus importantes que celles appliquées à bas débit de dose ( $2 \times 20$  Gy), pour des raisons techniques. On observe toutefois une évolution linéaire entre la quantité de MetO formée et la dose déposée (Figure 6-12), qui a été observée jusqu'à 450 Gy avec des protons de 2 MeV (Annexe 14). La diminution des rendements observée à haut débit de dose n'est donc a priori pas liée à un effet de dose cumulée.

Les rendements pondérés représentent le rendement chimique de la réaction de formation par rapport à l'espèce de radiolyse de l'eau considérée. Leurs évolutions traduisent donc d'éventuelles modifications des mécanismes mis en jeu après la réaction initiale avec  $\text{HO}\cdot$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pour les protons, comme le rendement en eau oxygénée à l'air dans ces conditions est stable, la tendance est exactement la même que pour les rendements bruts, avec une diminution modérée du rendement (Figure 6-11d.). Pour les électrons en revanche, les rendements augmentent jusqu'à 1270 Gy/s de près de 100%, avant de diminuer aux débits de dose le plus élevé. Les quantités d'eau oxygénée mesurées en milieu aéré diminuant dans les mêmes conditions, cela explique l'augmentation du rendement pondéré.

La formation du sulfoxyde ne suit donc pas la même évolution que celle de l'eau oxygénée avec le débit de dose. Cette observation est d'autant plus étonnante que la réaction menant à la formation de MetO

par l'eau oxygénée est lente, et devrait se faire longtemps après les recombinaisons radicalaires liées aux variations de débit de dose. Cette tendance associée au rendement plus important que celui de l'eau oxygénée indique que MetO se forme également par d'autres mécanismes faisant intervenir des réactions radicalaires, peut-être spécifiquement à haut débit de dose.

Sous faisceaux d'électrons, tout le radical hydroxyle ne réagit pas pour former le méthional. L'augmentation observée du rendement de MetO pondéré par l'eau oxygénée pourrait alors provenir d'une hausse de la production de sulfoxyde de méthionine par le radical hydroxyle.

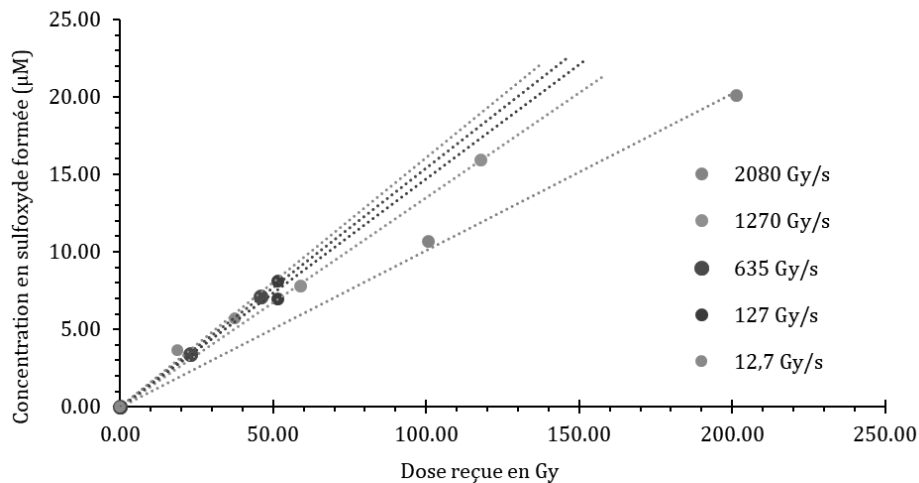


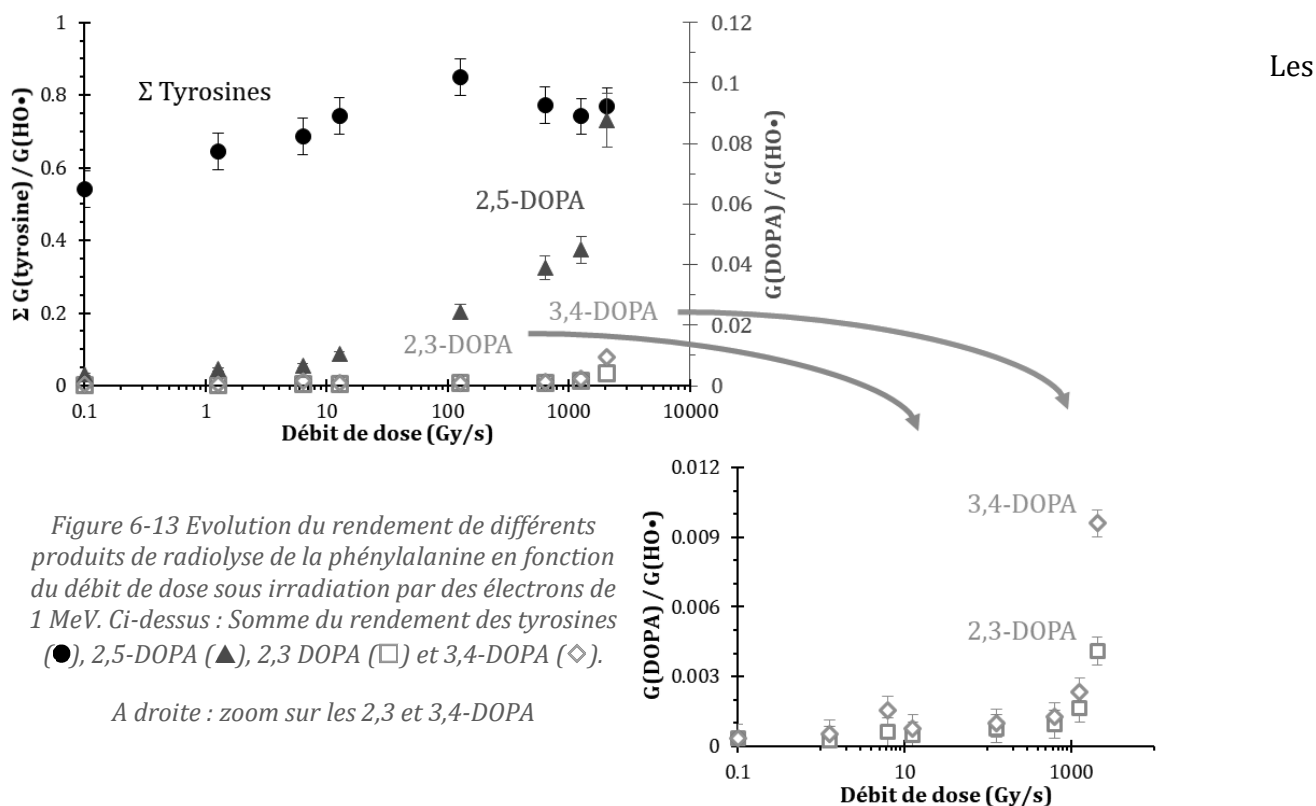
Figure 6-12 Evolution de la concentration en MetO en fonction de la dose pour une irradiation sous électrons de 10 MeV à différents débits de dose, ● 12,7 ; ● 127 ; ● 635 ; ● 1270 et ● 2080 Gy/s

## 2/ La phénylalanine

L'effet du débit de dose sur la radiolyse de la phénylalanine a également été étudié avec des rayonnements de différentes natures. Les résultats sous irradiations par des électrons de 1 MeV couvrant la gamme la plus large de débit de dose et étant de faibles TEL, ils sont particulièrement intéressants et seront présentés ici.

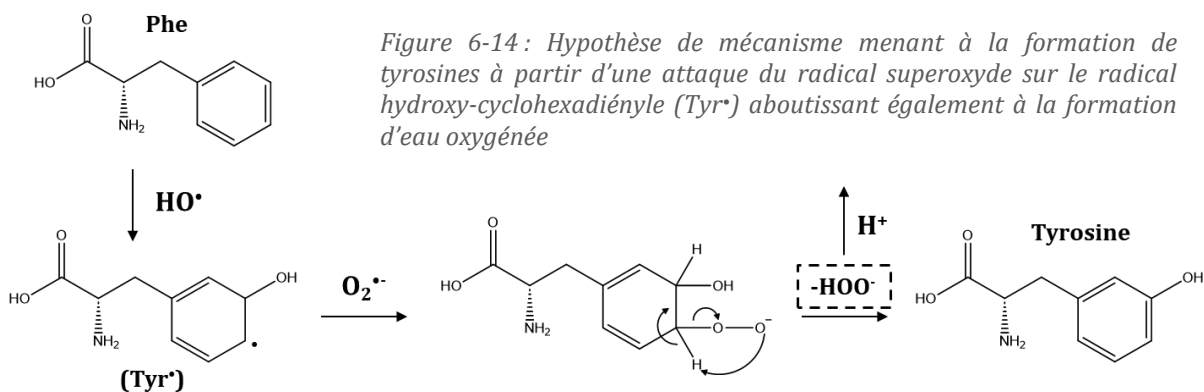
Les principaux produits de radiolyse de la phénylalanine, sont les trois isomères de la tyrosine, des dihydroxy phénylalanines (DOPA), et des dimères à TEL élevé. La 2,5-DOPA en particulier devient un des produits majoritaires à haut TEL, étant formée en très faible quantité à TEL faible (Ludwig *et al.*, 2018). Ils sont tous formés à partir d'une première réaction entre la phénylalanine et HO•. Comme on l'a vu dans ce chapitre, le rendement du radical varie avec le débit de dose avec des électrons de 1 MeV. La pondération par G(HO•) devient alors indispensable pour distinguer les effets du débit de dose sur HO• de ceux sur les mécanismes intervenant après la réaction entre la biomolécule et celui-ci.

La Figure 6-13 présente l'évolution avec le débit de dose de la somme des rendements de formation des trois isomères de la tyrosine, de la 2,5-DOPA, et des 2,3-DOPA et 3,4-DOPA, pondérés par le rendement du radical hydroxyle.



rendements des tyrosines (isomères ortho, para et méta), produits majoritaires de la radiolyse de la phénylalanine, sont modérément impactées par le débit de dose. Une augmentation de l'ordre de 35 % jusqu'à 100 Gy/s est observée, suivie d'un plateau ou éventuellement d'une diminution.

Le mécanisme de formation de ces produits est similaire à celui évoqué pour le 2-OH-TA et la 7-OH-C3CA. La première étape consiste en une addition du radical hydroxyle sur le cycle benzénique, conduisant à un radical hydroxycyclohexadiényle. Les proportions des voies de dismutation de ce radical organique ou de réaction avec  $O_2$  peuvent être impactées par le débit de dose, menant alors à une modification du taux de production des tyrosines. On pourrait s'attendre à une augmentation de la voie de dismutation à haut débit de dose, qui fait intervenir une réaction inter-radicalaire. Cependant, celle-ci devrait aboutir à une diminution du rendement, puisque deux radicaux sont alors nécessaires pour former une seule tyrosine. L'augmentation observée traduit donc peut-être une voie supplémentaire, qui ferait intervenir une réaction bi-radicalaire. Une réaction avec le radical superoxyde, d'assez longue durée de vie, pourrait être envisagée et qui aboutirait à la formation d'eau oxygénée (Figure 6-14).



A bas  
TEL,  
les  
DOPA  
se

forment par sur oxydation des tyrosines, et sont donc des produits mineurs de la radiolyse de la phénylalanine. Leurs rendements varient fortement avec le débit de dose. La 2,5-DOPA, en particulier, qui est formée en très faible quantité à faible débit de dose devient ainsi un produit important à haut débit de dose, atteignant le tiers du rendement d'une tyrosine. Les 2,3 et 3,4-DOPA suivent une évolution similaire, mais leurs rendements restent un ordre de grandeur plus faibles que ceux de la 2,5-DOPA.

La formation de 2,5-DOPA peut s'expliquer par une réaction entre le radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et le radical hydroxycyclohexadiényle (Ludwig *et al.*, 2018), favorisée à haut TEL. En conditions aérées,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  est formé par réaction entre  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  et  $\text{O}_2$ . La réaction entre le radical superoxyde, de longue durée de vie et le radical hydroxycyclohexadiényle est donc très certainement également favorisée à haut débit de dose, ce qui expliquerait l'augmentation importante et spécifique de la formation de la 2,5-DOPA. D'autres mécanismes peuvent également être envisagés. Ainsi, un intermédiaire tétraoxyde pourrait également se former après réaction entre le radical hydroxycyclohexadiényle et le dioxygène (Figure 6-15). Ce dernier mènerait également à la formation de 2,5-DOPA et de tyrosine (Bennett *et al.*, 1970). Il serait plus important à haut débit de dose en raison de la hausse de densité radicalaire, permettant plus aisément la rencontre des radicaux menant à sa formation.

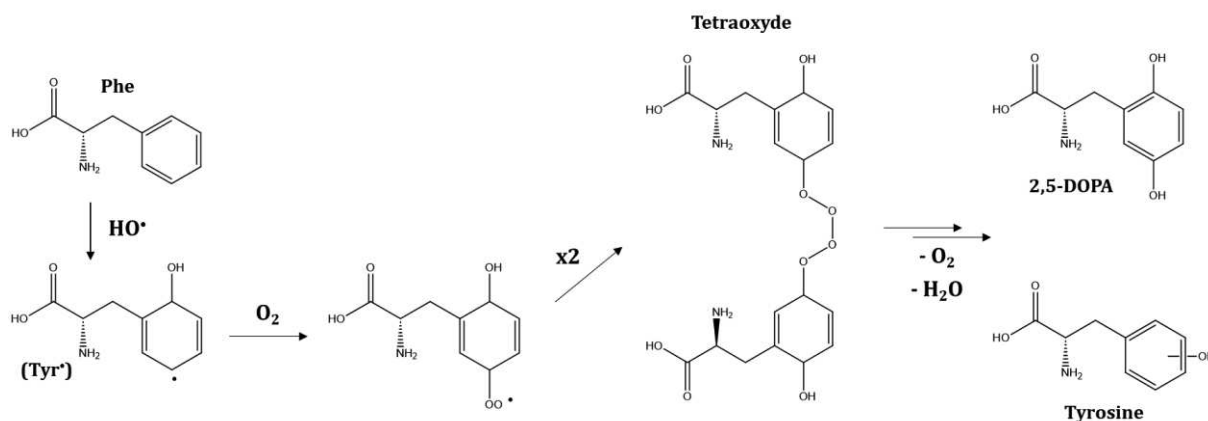


Figure 6-15 Hypothèse de mécanisme simplifié menant à la formation de 2,5-DOPA par l'intermédiaire d'un tétraoxyde.

Le débit de dose et le TEL semblent ainsi avoir un effet similaire sur la radiolyse de la phénylalanine en ce qui concerne la formation des DOPA, et notamment de la 2,5-DOPA.

Les dimères, qui sont un produit majoritaire sous irradiation par des ions, ne se forment pas sous faisceaux d'électrons même aux plus hauts débits de dose, s'élevant à plus de 2000 Gy/s. Ceux-ci se

forment donc a priori exclusivement par des réactions **intra-traces**, impliquant des espèces à durée de vie particulièrement courtes, puisque les réactions **inter-traces**, favorisées à haut débit de dose, ne mènent pas à leur formation.

### 3/ Le tryptophane

Caractérisé par son cycle indole plus complexe que le cycle benzénique de la phénylalanine, le tryptophane représente un sujet d'étude d'un niveau de complexité supérieur. Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, le TEL joue un rôle sur la radiolyse du tryptophane. Dans cette partie, nous étudierons l'impact du débit de dose sur la radiolyse de cet acide aminé.

#### *Les électrons de 1 MeV*

Les électrons de 1 MeV, qui sont parmi les rayonnements de faible TEL utilisés dans cette étude, nous ont permis d'étudier des débits de dose allant de 1,27 à plus de 2000 Gy/s. Les RX de 6 MeV étant de TEL similaire, les résultats obtenus avec ces rayonnements seront utilisés comme référence à bas débit de dose (0,1 Gy/s), débit de dose utilisé en thérapie conventionnelle.

La *Figure 6-16* présente l'évolution des rendements pour les différentes espèces de radiolyse du Trp classées selon le type de réaction de formation. Les rendements radiolytiques sont représentés sur la partie gauche, et les rendements pondérés par  $G(\text{HO}\cdot)$  sur la partie droite de la figure. On observe une augmentation avec le débit de dose du rendement radiolytique des isomères monohydroxylés en positions 4, 5, 6 et 7, ainsi que du peroxyde TrpOOH. La somme des rendements de l'ensemble des produits de radiolyse quantifiés semble diminuer avec le débit de dose, tandis que les rendements des produits issus d'une addition de OH sur le cycle pyrrolique (NFK, PIC, 2-OH-Trp) diminuent significativement.

La colonne de droite représente les rendements pondérés par ceux du radical hydroxyle mesuré dans les mêmes conditions, dont l'évolution avec le débit de dose a été présentée plus haut. Les rendements pondérés des produits issus d'une addition sur le cycle pyrrolique sont globalement constants sur la gamme de débits de dose étudiés. Leur mécanisme de formation n'est donc a priori pas affecté par le débit de dose.

Bien qu'aucun produit analogue à la 2,5-DOPA n'ait été identifié dans le cas de la radiolyse du tryptophane, les rendements de deux types de produits de radiolyse évoluent de manière similaire avec le débit de dose. Les rendements pondérés des produits mono-hydroxylés en positions 4,5,6 et 7 augmentent nettement avec le débit de dose, de plus d'un facteur trois à 2000 Gy/s. Le rendement pondéré de TrpOOH évolue faiblement avec le TEL. Celui-ci varie fortement avec le débit de dose, augmentant de près de 100 % à 2000 Gy/s. Aucun dimère n'a été détecté sous irradiation par des électrons, y compris aux débits de dose les plus importants.

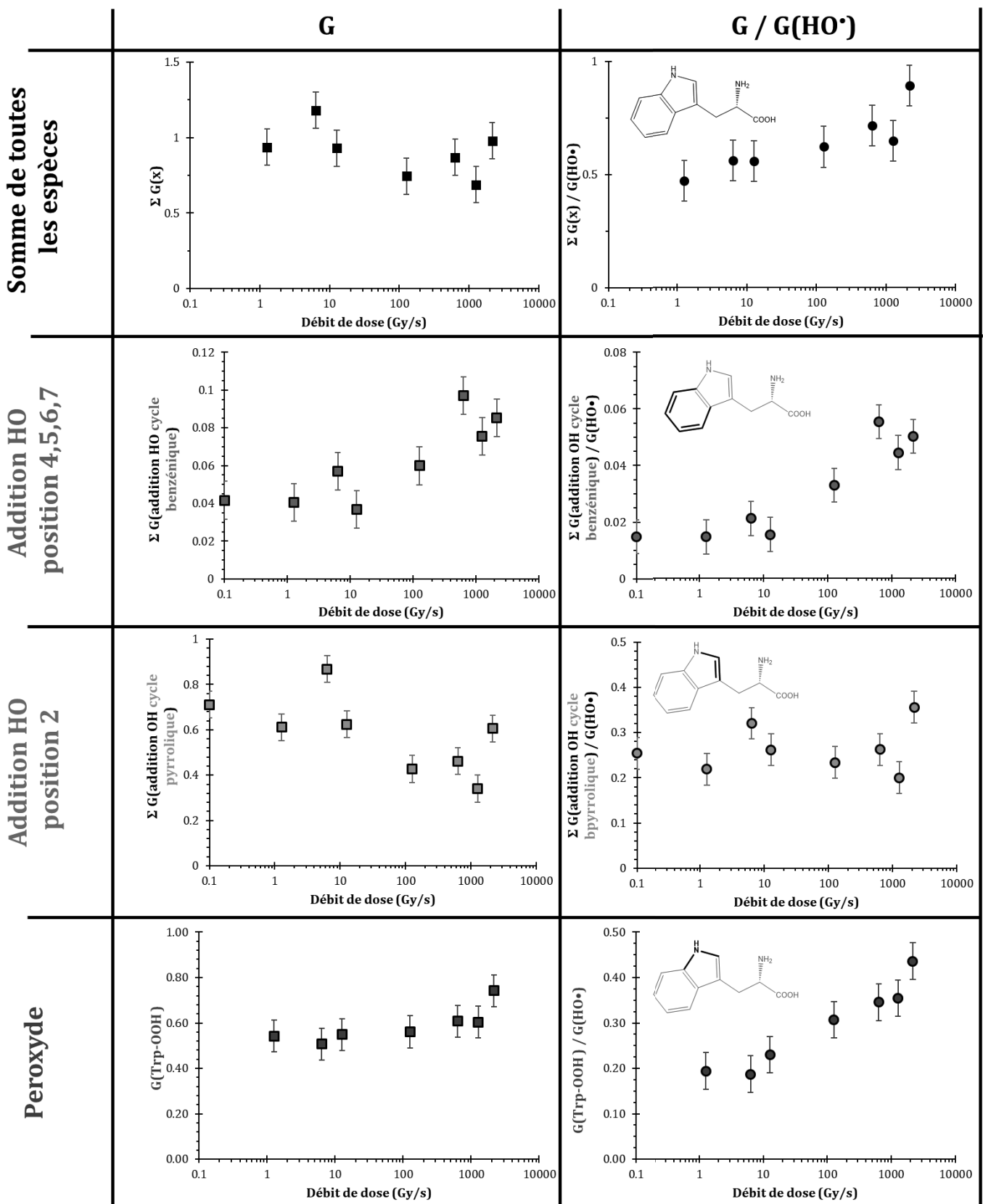


Figure 6-16 Evolutions des rendements des différents produits de radiolyse du tryptophane en fonction du débit de dose sous irradiation par des électrons de 1 MeV. Les produits sont classés selon la réaction menant à leur formation. La colonne de gauche présente les rendements tels que mesurés directement tandis que la colonne de droite présente les rendements

La somme des rendements pondérés de l'ensemble des produits de radiolyse du tryptophane augmente avec le débit de dose. Ceci indique une augmentation avec le débit de dose des taux de

conversion à partir de la réaction avec HO•, notamment pour le peroxyde et les produits de mono-hydroxylation sur le cycle benzénique. Il semblerait que l'augmentation de la densité de radicaux en solution à haut débit de dose modifie la sélectivité des réactions de HO•, favorisant les attaques en position benzénique. L'absence de dimère à haut débit de dose indique que ceux-ci se forment essentiellement au sein de la trace de particules de TEL élevé par des réactions **intra-traces**.

#### *Protons de 24 MeV – rendements différentiels*

La radiolyse du tryptophane a été étudiée en fonction du débit de dose avec des protons de 24 MeV dans le plateau de la courbe de Bragg (TEL moyen 3,0 eV/nm). Les rendements différentiels pondérés par HO• sont représentés *Figure 6-17*. Les rendements mesurés avec des électrons de 1 MeV sont également représentés, en transparence, à titre de comparaison.

Les valeurs et évolutions des rendements pondérés sont très similaires à celles des électrons de 1 MeV. Les effets du débit de dose sur les mécanismes de radiolyse restent donc très similaires, malgré une augmentation du TEL d'un facteur 10 et des structures temporelles des faisceaux différentes (faisceau pulsé pour les protons et continu pour les électrons de 1 MeV).

La somme des rendements pondérés de toutes les espèces ainsi que ceux de TrpOOH, mesurés pour les protons de 24 MeV, complètent parfaitement les résultats obtenus avec les électrons de 1 MeV. Ces deux rendements pondérés augmentent ainsi régulièrement avec le débit de dose.

Le rendement pondéré de TrpOOH augmente également avec le TEL, donc la densité locale de radicaux dans la trace des rayonnements ionisants. Cela signifie que l'augmentation du TEL, qui favorise les réactions **intra-traces**, et du débit de dose, qui favorise les réactions **inter-traces**, ont donc un effet similaire sur ce composé.

Les rendements pondérés des produits de mono-hydroxylation sur le cycle benzénique sont plus élevés avec les protons de 24 MeV qu'avec les électrons de 1 MeV. A l'inverse, les rendements des espèces provenant d'une addition de HO• en position 2 du cycle pyrrolique sont plus faibles qu'avec des électrons. Cette différence provient du TEL plus important des protons de 24 MeV, comme ce fut observé dans le chapitre 4 sur les effets du TEL.

Malgré cet effet de TEL, les évolutions des rendements de ces deux familles de composés avec le débit de dose restent très similaires pour les deux rayonnements ionisants.

On observe également la formation significative de dimères avec les protons, en raison du TEL plus élevé de ce rayonnement. Leurs rendements semblent peu cependant peu varier avec le débit de dose. Cela montre encore une fois que ces produits de radiolyse semblent se former par des réactions **intra-traces** et non par des réactions **inter-traces**.

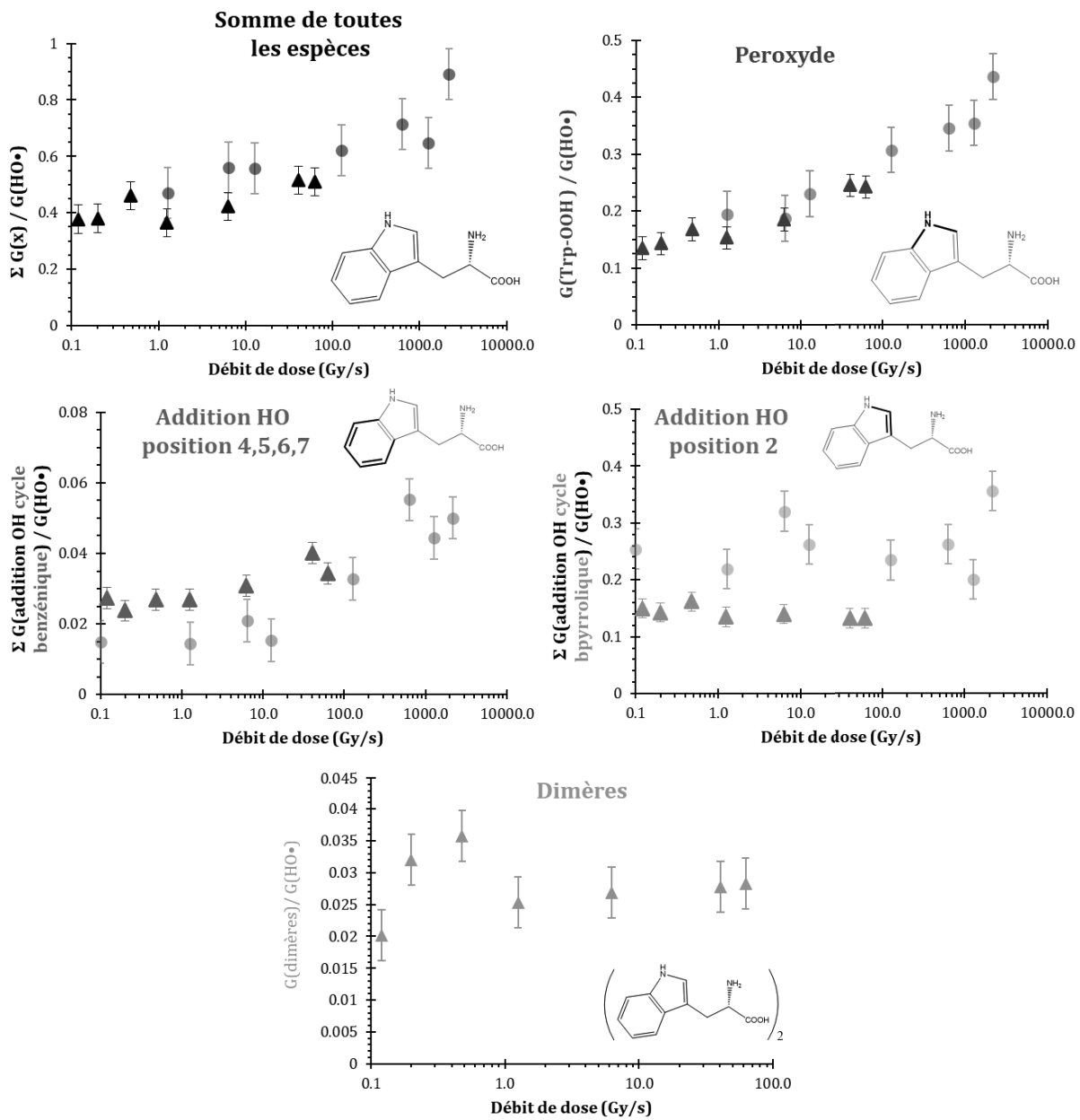


Figure 6-17 Evolutions des rendements des différents produits de radiolyse du tryptophane en fonction du débit de dose sous irradiation par des protons de 24 MeV (▲) et des électrons de 1 MeV (●, en transparence). Les produits sont classés selon la réaction menant à leur formation.



## Conclusion partielle

Nos résultats, présentés dans ce chapitre, confirment que le débit de dose est un paramètre essentiel à considérer dans la radiolyse de l'eau et de biomolécules. Ses effets varient toutefois fortement avec la nature des RI et les espèces considérées.

Ainsi, alors que les rendements en HO• diminuent avec le débit de dose sous irradiation par des électrons de 1 MeV, aucun effet n'est observé avec des protons de 24 MeV dans nos conditions. Le TEL pourrait avoir une influence sur l'apparition ou non d'effets liés au débit de dose. En effet, une augmentation des réactions radicalaire intra-traces à haut TEL entraîne une diminution des quantités de radicaux disponibles pour des réactions inter-traces à haut débit de dose. En ce qui concerne les rendements en eau oxygénée, ceux-ci diminuent avec le débit de dose pour l'ensemble des RI étudiés.

On observe des similitudes entre les effets du TEL sur la radiolyse de certaines biomolécules et ceux du débit de dose. Ainsi, le rendement pondéré en 2,5-DOPA augmente fortement avec le débit de dose lors de la radiolyse de la phénylalanine.

Pour la radiolyse du tryptophane, l'augmentation du débit de dose modifie les quantités relatives de produits de radiolyse formés, avec une augmentation des rendements pondérés en peroxyde et en produits de mono-hydroxylation sur le cycle benzénique.

Pour les deux acides aminés aromatiques étudiés, aucun dimère ne se forme à bas TEL, y compris à haut débit de dose. Les rendements mesurés avec des protons sont peu affectés par les variations de débit de dose.



---

## **Conclusion Générale**

---

Les travaux sur les effets du TEL et du débit de dose réalisés durant cette thèse s'inscrivent dans une étude fondamentale globale sur la radiolyse de biomolécules, dans un contexte radiothérapeutique. Les mécanismes moléculaires issus des effets indirects des rayonnements sur les biomolécules sous faisceaux d'ions et à très haut débit de dose sont encore trop méconnus à ce jour, et ont un impact dans les traitements par hadronthérapie ou potentiellement en thérapie FLASH. L'originalité principale de ce travail repose sur une approche globale et systématique, avec des expériences menées dans des conditions identiques pour la quantification des espèces issues de la radiolyse de l'eau et de biomolécules protéiques. Cette approche nous a permis d'identifier des mécanismes spécifiques sur les biomolécules selon les deux paramètres d'intérêt étudiés durant cette thèse : le TEL et le débit de dose.

Le premier chapitre de résultats (**Chapitre 3** - porte sur l'étude des sondes moléculaires utilisées pour mesurer les espèces de la radiolyse de l'eau. Cette radiolyse étant la première étape de tous les effets indirects étudiés dans ce travail, une méthode de mesure rigoureuse et fiable dans les différentes conditions étudiées est nécessaire pour l'étude des phénomènes ultérieurs. Ainsi, les mesures de l'eau oxygénée à différents temps de capture de HO• par l'ion Br<sup>-</sup> ont pu être validées. Parallèlement, une méthode de mesure inédite de l'électron hydraté a été proposée et a donné de premiers résultats très encourageants, et un très bon accord avec la littérature avec des rayons X de 6 MeV. Le principal résultat de ce chapitre est toutefois la détermination d'une sonde moléculaire du radical hydroxyle dont le mécanisme n'est pas impacté par des effets du débit de dose : KBr/Formiate .

Le TEL est largement utilisé pour caractériser le dépôt d'énergie d'un rayonnement ionisant dans un milieu. Sans arriver à la représenter tout à fait, il est directement lié à la densité de dépôt d'énergie dans le milieu, laquelle induit une densité de production de radicaux qui joue un rôle crucial dans les mécanismes physico-chimiques de radiolyse. Cette grandeur a donc été particulièrement étudiée durant ces travaux de thèse, et ses effets présentés dans le **Chapitre 4** - Sur la radiolyse de l'eau, nous avons pu quantifier l'effet de recouvrement des *spurs* dans la trace à TEL élevé, qui augmente les proportions de réactions *intra-traces*. Nos résultats montrent ainsi une diminution des rendements en HO• avec le TEL liée aux recombinaisons inter radicalaires. Dans tous les cas où ceux-ci ont pu être comparés avec la littérature, un bon accord a été observé, validant les résultats originaux obtenus. Ceux-ci pourront être exploités pour l'amélioration de codes de simulation, tels que Geant4-DNA. Concernant les biomolécules, les réactions impliquées se passent à un temps plus long que les recombinaisons des espèces radicalaires de radiolyse de l'eau. Cependant, la spécificité de la chimie sous rayonnement est que quel que soit le temps après l'interaction rayonnement matière, le système étudié pourra refléter le dépôt d'énergie initial. Ainsi, le TEL a un fort impact sur la formation du méthional par radiolyse de la méthionine, au-delà de la quantité de HO• engendrée. Lorsqu'on considère le rendement total en produits de radiolyse du tryptophane, on n'observe aucun effet du TEL au-delà de ceux sur le radical HO•, que ce soit avec des électrons, protons, ou ions He et C de haute énergie.

Cependant, une analyse plus détaillée montre une diminution significative des rendements en produits d'addition en position 2 entre les électrons et les ions, au bénéfice d'une addition en position benzénique, et une légère augmentation de l'arrachement d'atome d'hydrogène sur l'azote de l'indole. Le TEL modifie donc significativement la régiosélectivité des additions, notamment entre électrons et ions, celle-ci étant stable pour ces derniers, sur la gamme de TEL explorée.

Durant un traitement par des ions de haute énergie, des réactions nucléaires entre le faisceau incident et le milieu induisent la production d'espèces secondaires par fragmentation des ions ou de la matière traversée. Ceci aboutit alors à un dépôt d'énergie différent dans sa nature de celui attendu pour un faisceau d'ions « purs », les fragments légers ayant des TEL plus faibles que les ions lourds utilisés. Le **Chapitre 5** - porte sur l'étude de la radiolyse sous faisceaux d'ions C et He de haute énergie, du plateau jusqu'après le pic de Bragg. Au-delà des effets de TEL le long de la trace, nous avons pu mesurer les cinétiques d'évolution des rendements des espèces principales de la radiolyse de l'eau, HO<sup>•</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et e<sup>-</sup><sub>aq</sub> dans le cadre de la thèse de Séverine Chefson, sous irradiation par les ions C. Pour des ions He, cette évolution a été étudiée au temps de capture de 74 ns. Ces résultats nous ont permis d'obtenir une image globale de la radiolyse de l'eau le long de la trace. Les rendements importants dans ces trois espèces mesurées au-delà du pic de Bragg confirment l'importance de considérer les effets chimiques des fragments formés par les ions en hadronthérapie, qui pourraient engendrer efficacement des espèces réactives en dehors de la tumeur ciblée initialement. Une première étude a été menée spécifiquement sur la distribution angulaire des fragments formés à travers une cible mince par des ions He de 230 MeV/nu. Celle-ci a mis en évidence un dépôt de dose important par les fragments, de l'ordre du pourcent de l'énergie du faisceau, dans des conditions d'irradiation qui pourraient modifier les mécanismes de radiolyse de biomolécules.

La validation de notre sonde KBr/formiate à différents débits de dose a permis de réaliser une étude de l'effet de débit de dose sur le radical hydroxyle, présentée dans le **Chapitre 6** - . Alors qu'aucun effet n'a été observé avec des protons, que ce soit à un temps de capture de 74 ns ou de 300 ns, celui-ci est très marqué avec des électrons. Il apparaît pour un débit d'autant plus important que le temps de capture est faible, en accord avec un effet dû à des **réactions inter-traces** entre les radicaux. Le TEL semble également être un facteur déterminant pour l'apparition ou non d'un effet de débit de dose, comme le montre l'absence d'effet mesuré avec des protons. Lorsque le TEL augmente, les réactions **intra-traces** seront plus importantes, ce qui réduira alors les probabilités de réactions **inter-traces** à une échelle de temps plus importante.

Concernant les biomolécules, la distinction entre les deux effets est plus complexe. En effet, les réactions avec les biomolécules se produisent sur des temps plus longs que les recombinaisons d'espèces de radiolyse de l'eau, et les intermédiaires réactionnels existent sur une échelle de temps où les deux effets coexistent simultanément. Ainsi, il semblerait que pour le tryptophane, le débit de dose, donc les réactions inter-traces, ait un effet plus marqué que les variations de TEL sur les mécanismes de radiolyse.

Ce travail a ainsi apporté des informations nouvelles sur les deux aspects systématiquement étudiés : la radiolyse de l'eau et de biomolécules.

Pour la radiolyse de l'eau, les études en fonctions du TEL ont amélioré les connaissances des irradiations sous ions par **l'étude systématique de plusieurs espèces** et à **différents temps** après l'interaction rayonnement-matière, reflétés par le temps de capture. Ces études ont notamment été réalisées tout le long de la trace de faisceaux d'ions thérapeutiques, qui ont également mené à une des seules études chimiques de la fragmentation des faisceaux d'ions au-delà du pic de Bragg, notamment à si longue distance. Une première étude des fragments engendrés dans une cible mince par des hélions de haute énergie a également donné des résultats intéressants montrant une production importante d'espèces réactives.

La validation rigoureuse d'une sonde insensible aux effets du débit de dose a permis l'observation avec un bon degré de confiance d'un **premier effet du débit de dose** sur une espèce radicalaire de la radiolyse de l'eau, le **radical hydroxyle**. Cela n'explique pas l'effet protecteur observé par l'effet FLASH à haut débit de dose, mais cette observation chimique pourrait être un premier élément de réponse à l'échelle moléculaire.

Concernant la radiolyse de biomolécules, notre **approche systématique** nous a permis de mettre en évidence des effets décorrélés de ceux sur la radiolyse de l'eau. Nous avons ainsi réalisé pour la première fois une étude de la radiolyse de la méthionine et du tryptophane sous faisceaux d'ions. Il s'agit également de la **première étude des effets du débit de dose** sur des **biomolécules protéiques**. Des effets ont clairement été identifiés sur plusieurs produits de radiolyse, y compris lorsqu'aucun effet n'est observé sur la radiolyse de l'eau. Dans un contexte de thérapie FLASH, cela confirme que la chimie sous rayonnement reste une étape clef, de par la modification fondamentale des mécanismes moléculaires mis en jeu sous irradiation.

Pour la poursuite du projet, les données acquises lors des mesures des espèces de radiolyse de l'eau seront particulièrement utiles pour améliorer le code de simulation Geant4-DNA. Ces mesures sont en effet parmi les premières mesures des effets du débit de dose sur la radiolyse de l'eau et les premières reportées sur le radical hydroxyle lui-même, sans effet de sonde.

Les travaux réalisés sur les acides aminés serviront de socle pour l'étude de molécules plus complexes : peptides ou protéines. La méthionine étant un résidu impliqué dans des transferts de radicaux, l'étude de peptides contenant celui-ci sera particulièrement intéressante. Ces phénomènes seront étudiés selon le débit de dose et le TEL, et comparés aux résultats obtenus avec les acides aminés isolés.

Les effets du débit de dose sur les protéines seront étudiés à différentes échelles tenant compte de la grande complexité de ces macromolécules. L'effet des rayonnements sur la structure secondaire, déjà abordé dans la thèse de N. Ludwig, sera complétée, et des études moléculaires sur peptides de digestion permettront de caractériser les dégâts et peut-être de relier les phénomènes à ceux mis en évidence avec des peptides simples.

---

## **Références Bibliographiques**

---

3. Determination of Absorbed Dose by Chemical Methods. (1969). *Reports of the International Commission on Radiation Units and Measurements*, os-8(1), 9-12. [https://doi.org/10.1093/jicru\\_os8.1.9](https://doi.org/10.1093/jicru_os8.1.9)
- Abrosimova, K. V., Shulenina, O. V., & Paston, S. V. (2016). FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. *Journal of Physics: Conference Series*, 769(1), 012016. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/769/1/012016>
- Adrian, G., Ruan, J.-L., Paillas, S., Cooper, C. R., & Petersson, K. (2022). In vitro assays for investigating the FLASH effect. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 24, e10. <https://doi.org/10.1017/erm.2022.5>
- Alanazi, A., Meesungnoen, J., & Jay-Gerin, J.-P. (2020). Linear energy transfer dependence of transient yields in water irradiated by 150 keV – 500 MeV protons in the limit of low dose rates. *Canadian Journal of Chemistry*, 98(8), 427-433. <https://doi.org/10.1139/cjc-2020-0113>
- Alanazi, A., Meesungnoen, J., & Jay-Gerin, J.-P. (2021). A Computer Modeling Study of Water Radiolysis at High Dose Rates. Relevance to FLASH Radiotherapy. *Radiation Research*, 195(2), 149-162. <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00168.1>
- Albanese, J., & Dainiak, N. (2003). Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation. *Experimental Hematology*, 31(6), 455-464. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(03\)00050-x](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(03)00050-x)
- Allen, A. O. (2002, mai 1). *Radiation Chemistry of Aqueous Solutions* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/j150459a009>
- Allen, A. O., & Holroyd, R. A. (1955). Peroxide Yield in the  $\gamma$ -Irradiation of Air-saturated Water1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(22), 5852-5855. <https://doi.org/10.1021/ja01627a022>
- Anderson, A. R., & Hart, E. J. (1961). Molecular product and free radical yields in the decomposition of water by protons, deuterons, and helium ions. *Radiation Research*, 14, 689-704.
- Appleby, A., & Christman, E. A. (1985). Radiation chemistry of high energy carbon, neon and argon ions : Effects of nuclear fragmentation. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Letters*, 94(4), 241-250. <https://doi.org/10.1007/BF02165167>
- Appleby, A., Christman, E. A., & Jayko, M. (1985). Radiation Chemistry of High-Energy Carbon, Neon, and Argon Ions : Hydroxyl Radical Yields. *Radiation Research*, 104(3), 263. <https://doi.org/10.2307/3576588>
- Archirel, P., Houée-Lévin, C., & Marignier, J.-L. (2019). Radiolytic Oxidation of Two Inverse Dipeptides, Methionine–Valine and Valine–Methionine : A Joint Experimental and Computational Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 123(43), 9087-9097. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07014>
- Armstrong, R. C., & Swallow, A. J. (1969). Pulse- and Gamma-Radiolysis of Aqueous Solutions of Tryptophan. *Radiation Research*, 40(3), 563. <https://doi.org/10.2307/3573010>
- Balajee, A. (2018). Applications of Fluorescence in Situ Hybridization in Radiation Cytogenetic Biodosimetry and Population Monitoring. *OBM Genetics*, 2, 1-1. <https://doi.org/10.21926/obm.genet.1804042>
- Baldacchino, G., De Waele, V., Monard, H., Sorgues, S., Gobert, F., Larbre, J. P., Vigneron, G., Marignier, J. L., Pommeret, S., & Mostafavi, M. (2006). Hydrated electron decay measurements with picosecond pulse radiolysis at elevated temperatures up to 350°C. *Chemical Physics Letters*, 424(1-3), 77-81. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.04.061>
- Baldacchino, G., Le Parc, D., Hickel, B., Gardès-Albert, M., Abedinzadeh, Z., Jore, D., Deycard, S., Bouffard, S., Mouton, V., & Balanzat, E. (1998). Direct observation of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>- free radicals generated in water by a high-linear energy transfer pulsed heavy-ion beam. *Radiation Research*, 149(2), 128-133.
- Baldacchino, G., Maeyama, T., Yamashita, S., Taguchi, M., Kimura, A., Katsumura, Y., & Murakami, T. (2009). Determination of the time-dependent OH-yield by using a fluorescent probe. Application to heavy ion irradiation. *Chemical Physics Letters*, 468(4-6), 275-279. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.12.006>
- Baler, K., Michael, R., Szleifer, I., & Ameer, G. A. (2014). Albumin Hydrogels Formed by Electrostatically Triggered Self-Assembly and Their Drug Delivery Capability. *Biomacromolecules*, 15(10), 3625-3633. <https://doi.org/10.1021/bm500883h>
- Barata-Vallejo, S., Ferreri, C., Postigo, A., & Chatgililoglu, C. (2010). Radiation Chemical Studies of Methionine in Aqueous Solution : Understanding the Role of Molecular Oxygen. *Chemical Research in Toxicology*, 23(1), 258-263. <https://doi.org/10.1021/tx900427d>



- Barata-Vallejo, S., Ferreri, C., Zhang, T., Permentier, H., Bischoff, R., Bobrowski, K., & Chatgililoglu, C. (2016). Radiation chemical studies of Gly-Met-Gly in aqueous solution. *Free Radical Research*, 50(sup1), S24-S39. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1231402>
- Barendsen, G. W., Walter, H. M. D., Fowler, J. F., & Bewley, D. K. (1963). Effects of Different Ionizing Radiations on Human Cells in Tissue Culture : III. Experiments with Cyclotron-Accelerated Alpha-Particles and Deuterons. *Radiation Research*, 18(1), 106-119. <https://doi.org/10.2307/3571430>
- Barkas, W. H., Dyer, J. N., & Heckman, H. H. (1963). Resolution of the  $\Sigma$ -Mass Anomaly. *Physical Review Letters*, 11(1), 26-28. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.11.26>
- Basic Metrology : Dose/Dose-Rate Effects in Alanine Dosimetry. (s. d.). *NIST*. Consulté 27 juillet 2022, à l'adresse <https://www.nist.gov/programs-projects/basic-metrology-dosedose-rate-effects-alanine-dosimetry>
- Becker, D., Razskazovskii, Y., Callaghan, M. U., & Sevilla, M. D. (1996). Electron spin resonance of DNA irradiated with a heavy-ion beam ([16]O[8+]) : Evidence for damage to the deoxyribose phosphate backbone. *Radiation Research*, 146(4), 361-368.
- Becquerel, H. (1896a). Sur diverses propriétés des rayons uraniques. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 123, 855-858.
- Becquerel, H. (1896b). Sur les propriétés différentes des radiations invisibles émises par les sels d'uranium, et du rayonnement de la paroi anticathodique d'un tube de Crookes. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 122, 762-767.
- Becquerel, H. (1896c). Sur les radiations émises par phosphorescence. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 122, 420-421.
- Becquerel, H. (1896d). Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 122, 501-503.
- Becquerel, H. (1896e). Sur les radiations invisibles émises par les sels d'uranium. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 122, 689-694.
- Bellinzona, E. V., Grzanka, L., Attili, A., Tommasino, F., Friedrich, T., Krämer, M., Scholz, M., Battistoni, G., Embriaco, A., Chiappara, D., Cirrone, G. A. P., Petringa, G., Durante, M., & Scifoni, E. (2021). Biological Impact of Target Fragments on Proton Treatment Plans : An Analysis Based on the Current Cross-Section Data and a Full Mixed Field Approach. *Cancers*, 13(19), 4768. <https://doi.org/10.3390/cancers13194768>
- Bellmaine, S., Schnellbaecher, A., & Zimmer, A. (2020). Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 160, 696-718. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.002>
- Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.-H., & Debeaufort, F. (2016). Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Food Chemistry*, 195, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.034>
- Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Pouget, J. P., & Voisin, P. (2003). The Cell Membrane as a Biosensor of Oxidative Stress Induced by Radiation Exposure : A Multiparameter Investigation. *Radiation Research*, 159(4), 471-483. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0471:TCMAAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0471:TCMAAB]2.0.CO;2)
- Bennett, J. E., Brown, D. M., & Mile, B. (1970). Studies by electron spin resonance of the reactions of alkylperoxy radicals. Part 2.—Equilibrium between alkylperoxy radicals and tetroxide molecules. *Transactions of the Faraday Society*, 66(0), 397-405. <https://doi.org/10.1039/TF9706600397>
- Bergès, J., de Oliveira, P., Fourré, I., & Houée-Levin, C. (2012). The One-Electron Reduction Potential of Methionine-Containing Peptides Depends on the Sequence. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(31), 9352-9362. <https://doi.org/10.1021/jp304741e>
- Berlin, Y. A., & Siebbeles, L. D. A. (2008). Chapter 14 : Charge motion in DNA. In *Radiation Chemistry : From Basics to Applications in Material and Life Sciences* (Vol. 1, p. 203-218). <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0317-0>
- Bernhard, W. A., & Close, D. M. (2003). DNA Damage Dictates the Biological Consequences of Ionizing Irradiation : The Chemical Pathways. In *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*. CRC Press.

- Beyreuther, E., Brand, M., Hans, S., Hideghéty, K., Karsch, L., Leßmann, E., Schürer, M., Szabó, E. R., & Pawelke, J. (2019). Feasibility of proton FLASH effect tested by zebrafish embryo irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 139, 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.06.024>
- Bielski, B. H. J., & Allen, A. O. (1977). Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(11), 1048-1050. <https://doi.org/10.1021/j100526a005>
- Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E., Arudi, R. L., & Ross, A. B. (1985). Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sup>-2</sup> Radicals in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 14(4), 1041-1100. <https://doi.org/10.1063/1.555739>
- Bielski, B. H., & Shiue, G. G. (1978). Reaction rates of superoxide radicals with the essential amino acids. *Ciba Foundation Symposium*, 65, 43-56. <https://doi.org/10.1002/9780470715413.ch4>
- Birkenhake, S., & Sauer, R. (1995). Historical essentials influencing the development of radiooncology in the past 100 years. *Experientia*, 51(7), 681-685. <https://doi.org/10.1007/BF01941265>
- Blain, G., Vandenborre, J., Villoing, D., Fiegel, V., Fois, G. R., Haddad, F., Koumeir, C., Maigne, L., Métivier, V., Poirier, F., Potiron, V., Supiot, S., Servagent, N., Delpon, G., & Chiavassa, S. (2022). Proton Irradiations at Ultra-High Dose Rate vs. Conventional Dose Rate : Strong Impact on Hydrogen Peroxide Yield. *Radiation Research*. <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00021.1>
- Bobrowski, K., Houée-Levin, C., & Marciniak, B. (2008). Stabilization and Reactions of Sulfur Radical Cations : Relevance to One-Electron Oxidation of Methionine in Peptides and Proteins. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 62(9), 728-734. <https://doi.org/10.2533/chimia.2008.728>
- Bobrowski, K., Wierzchowski, K. L., Holcman, J., & Ciurak, M. (1990). Intramolecular electron transfer in peptides containing methionine, tryptophan and tyrosine : A pulse radiolysis study. *International Journal of Radiation Biology*, 57(5), 919-932. <https://doi.org/10.1080/09553009014551041>
- Boscolo, D., Scifoni, E., Durante, M., Krämer, M., & Fuss, M. C. (2021). May oxygen depletion explain the FLASH effect? A chemical track structure analysis. *Radiotherapy and Oncology*, 162, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.06.031>
- Bourhis, J., Sozzi, W. J., Jorge, P. G., Gaide, O., Bailat, C., Duclos, F., Patin, D., Ozsahin, M., Bochud, F., Germond, J.-F., Moeckli, R., & Vozenin, M.-C. (2019). Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 139, 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.06.019>
- Bozorg-Haddad, O., Delpasand, M., & Loáiciga, H. A. (2021). 10—Water quality, hygiene, and health. In O. Bozorg-Haddad (Éd.), *Economical, Political, and Social Issues in Water Resources* (p. 217-257). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90567-1.00008-5>
- Bradshaw, W. W., Cadena, D. G., Crawford, G. W., & Spetzler, H. A. W. (1962). The Use of Alanine as a Solid Dosimeter. *Radiation Research*, 17(1), 11-21. <https://doi.org/10.2307/3571206>
- Brahme, A. (2014). 7.07—Accurate Analytical Description of the Cell Survival and Dose-Response Relationships at Low and High Doses and LETs. In A. Brahme (Éd.), *Comprehensive Biomedical Physics* (p. 121-142). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.00807-8>
- Brault, D., Lacroix, M., & Ressouany, M. (2007). *Biodegradable films containing caseinate and their method of manufacture by irradiation* (Canada Patent CA2235931C). <https://patents.google.com/patent/CA2235931C/en>
- Breitkreutz, D. Y., Weil, M. D., & Bazalova-Carter, M. (2020). External beam radiation therapy with kilovoltage x-rays. *Physica Medica: PM: An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology: Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 79, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2020.11.001>
- Bryant, P. J. (s. d.). *A BRIEF HISTORY AND REVIEW OF ACCELERATORS*.
- Buglewicz, D. J., Banks, A. B., Hirakawa, H., Fujimori, A., & Kato, T. A. (2019). Monoenergetic 290 MeV/n carbon ion beam biological lethal dose distribution surrounding the Bragg peak. *Scientific Reports*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42600-4>
- Burg, A., & Meyerstein, D. (2012). Chapter 7—The chemistry of monovalent copper in aqueous solutions. In R. van Eldik & I. Ivanović-Burmazović (Éds.), *Advances in Inorganic Chemistry* (Vol. 64, p. 219-261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396462-5.00007-6>

- Burns, W. G., & Sims, H. E. (1981). Effect of radiation type in water radiolysis. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 77(11), 2803-2813. <https://doi.org/10.1039/F19817702803>
- Buxbaum, E. (2007a). Amino acids. In E. Buxbaum (Éd.), *Fundamentals of Protein Structure and Function* (p. 3-11). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-68480-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-68480-2_1)
- Buxbaum, E. (2007b). Protein structure. In E. Buxbaum (Éd.), *Fundamentals of Protein Structure and Function* (p. 13-37). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-68480-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-68480-2_2)
- Buxton, G. V. (2008). Chapter 1 : An overview of the radiation chemistry of liquids. In *Radiation Chemistry : From Basics to Applications in Material and Life Sciences* (Vol. 1, p. 3-16). <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0317-0>
- Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., & Ross, A. B. (2009). Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$  in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17(2), 513. <https://doi.org/10.1063/1.555805>
- Byun, H. K., Han, M. C., Yang, K., Kim, J. S., Yoo, G. S., Koom, W. S., & Kim, Y. B. (2021). Physical and Biological Characteristics of Particle Therapy for Oncologists. *Cancer Research and Treatment*, 53(3), 611-620. <https://doi.org/10.4143/crt.2021.066>
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA : Formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 131, 1-87. [https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5_5)
- Calva-Estrada, S., Jimenez, M., & Lugo, E. (2019). Protein-Based Films : Advances in the Development of Biomaterials Applicable to Food Packaging. *Food Engineering Reviews*, 11, 78-92. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09189-w>
- Caramelo, F., Abrantes, A., Pires, A., & Botelho, M. F. (2018). A Radiação : Má ou Boa. *Revista Internacional em Língua Portuguesa*, 34, 137-147. <https://doi.org/10.31492/2184-2043.RILP2018.34/pp.137-147>
- Cardoso, D. R., Bettin, S. M., Reche, R. V., Lima-Neto, B. S., & Franco, D. W. (2003). HPLC–DAD analysis of ketones as their 2,4-dinitrophenylhydrazones in Brazilian sugar-cane spirits and rum. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5), 563-573. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00061-9)
- Carroll, L., Pattison, D. I., Davies, J. B., Anderson, R. F., Lopez-Alarcon, C., & Davies, M. J. (2017). Formation and detection of oxidant-generated tryptophan dimers in peptides and proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.020>
- Carroll, L., Pattison, D. I., Davies, J. B., Anderson, R. F., Lopez-Alarcon, C., & Davies, M. J. (2018). Superoxide radicals react with peptide-derived tryptophan radicals with very high rate constants to give hydroperoxides as major products. *Free Radical Biology and Medicine*, 118, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.033>
- Cataldo, F., Ragni, P., Iglesias-Groth, S., & Machado, A. (2011). Solid state radiolysis of sulphur-containing amino acids : Cysteine, cystine and methionine. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 287(2), 573-580. <https://doi.org/10.1007/s10967-010-0787-y>
- Chappuis, F., Tran, H., Incerti, S., Kacem, H., Grilj, V., Froidevaux, P., Goncalves, P., Bochud, F., Bailat, C., Vozenin, M.-C., & Desorgher, L. (2022, février 1). FLASH Mechanisms Track (Oral Presentations) MODELLING OF WATER RADIOLYSIS FOR ULTRA-HIGH DOSE RATE (FLASH) ELECTRON BEAMS IN GEANT4-DNA. In *Physica Medica*. [https://doi.org/10.1016/S1120-1797\(22\)01520-4](https://doi.org/10.1016/S1120-1797(22)01520-4)
- Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Maddigapu, P. R., Minero, C., & Vione, D. (2011). Performance and selectivity of the terephthalic acid probe for OH as a function of temperature, pH and composition of atmospherically relevant aqueous media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 222(1), 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.05.003>
- Chatterjee, A., & Magee, J. L. (1987). *Track models and radiation chemical yields*. VCH Publishers Inc.
- Chevalier, E., Assezat, G., Prochazka, F., & Oulahal, N. (2018). Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration. *Food Hydrocolloids*, 75, 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>

- Chin, M., & Wine, P. H. (1994). A Temperature-Dependent Competitive Kinetics Study of the Aqueous-Phase Reactions of OH Radicals with Formate, Formic Acid, Acetate, Acetic Acid, and Hydrated Formaldehyde. In *Aquatic and Surface Photochemistry*. CRC Press.
- Choppin, G., Liljenzin, J.-O., Rydberg, J., & Ekberg, C. (2013a). Chapter 7—Absorption of Nuclear Radiation. In G. Choppin, J.-O. Liljenzin, J. Rydberg, & C. Ekberg (Éds.), *Radiochemistry and Nuclear Chemistry (Fourth Edition)* (p. 163-208). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405897-2.00007-0>
- Choppin, G., Liljenzin, J.-O., Rydberg, J., & Ekberg, C. (2013b). Chapter 8—Radiation Effects on Matter. In G. Choppin, J.-O. Liljenzin, J. Rydberg, & C. Ekberg (Éds.), *Radiochemistry and Nuclear Chemistry (Fourth Edition)* (p. 209-237). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405897-2.00008-2>
- Choppin, G., Liljenzin, J.-O., Rydberg, J., & Ekberg, C. (2013c). Chapter 9—Detection and Measurement Techniques. In G. Choppin, J.-O. Liljenzin, J. Rydberg, & C. Ekberg (Éds.), *Radiochemistry and Nuclear Chemistry (Fourth Edition)* (p. 239-295). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405897-2.00009-4>
- Christensen, H., Sehested, K., & Løgager, T. (1994). Temperature dependence of the rate constant for reactions of hydrated electrons with H, OH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Radiation Physics and Chemistry*, 43(6), 527-531. [https://doi.org/10.1016/0969-806X\(94\)90163-5](https://doi.org/10.1016/0969-806X(94)90163-5)
- Cieśla, K., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2006). Gamma-irradiation influence on the structure and properties of calcium caseinate-whey protein isolate based films. Part 1. Radiation effect on the structure of proteins gels and films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6374-6384. <https://doi.org/10.1021/jf060486o>
- Clément-Colmou, K., Potiron, V., Pietri, M., Guillonneau, M., Jouglar, E., Chiavassa, S., Delpon, G., Paris, F., & Supiot, S. (2020). Influence of Radiotherapy Fractionation Schedule on the Tumor Vascular Microenvironment in Prostate and Lung Cancer Models. *Cancers*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.3390/cancers12010121>
- Collins, A. K., Makrigiorgos, G. M., & Svensson, G. K. (1994). Coumarin chemical dosimeter for radiation therapy. *Medical Physics*, 21(11), 1741-1747. <https://doi.org/10.1118/1.597275>
- Cooper, G. M. (2000). Cell Membranes. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9928/>
- Crawford, C. L., Gholami, M. R., Roberts, S. L., & Hanrahan, R. J. (1992). A fast-kinetic investigation of the redox chemistry of iridium chloride complexes using pulse radiolysis. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 40(3), 205-212. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(92\)90026-C](https://doi.org/10.1016/1359-0197(92)90026-C)
- Curie, M. (1898). Rayons émis par les composés de l'uranium et du thorium. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 126, 1101-1103.
- Curie, P., & Curie-Sklodowska, M. (1898). Sur une substance nouvelle radio-active, contenue dans la pechblende. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 127, 175-178.
- Curie, P., Curie-Sklodowska, M., & Bémont, G. (1898). Sur une nouvelle substance fortement radio-active, contenue dans la pechblende. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 127, 1215-1217.
- Davies, K. J., & Delsignore, M. E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9908-9913. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48020-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48020-9)
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1703(2), 93-109. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>
- Davies, M. J. (2012). Oxidative Damage to Proteins. In *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9781119953678.rad045>
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805-825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>
- Debierne, A.-L. (1908). Sur la radioactivité. *Bulletin de la Société chimique de France*, 1, 3.
- Debierne, A.-L. (1914a). Recherches sur les phénomènes de la radioactivité. *Paris, Gauthier-Villars*.
- Debierne, A.-L. (1914b). *Ann. Phys.*, 2, 97.

- de Kruijff, R. M. (2019). FLASH radiotherapy : Ultra-high dose rates to spare healthy tissue. *International Journal of Radiation Biology*, 1-5. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1704912>
- Dertinger, H., & Jung, H. (1970a). Direct and Indirect Action of Radiation. In H. Dertinger & H. Jung (Éds.), *Molecular Radiation Biology : The Action of Ionizing Radiation on Elementary Biological Objects* (p. 70-90). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6247-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6247-0_6)
- Dertinger, H., & Jung, H. (1970b). Introduction. In H. Dertinger & H. Jung (Éds.), *Molecular Radiation Biology : The Action of Ionizing Radiation on Elementary Biological Objects* (p. 1-11). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6247-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6247-0_1)
- Dertinger, H., & Jung, H. (1970c). Primary Processes of Energy Absorption. In H. Dertinger & H. Jung (Éds.), *Molecular Radiation Biology : The Action of Ionizing Radiation on Elementary Biological Objects* (p. 33-54). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6247-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6247-0_4)
- Desouky, O., & Zhou, G. (2016). Biophysical and radiobiological aspects of heavy charged particles. *Journal of Taibah University for Science*, 10(2), 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.02.014>
- Desrosiers, M. F., Publ, J. M., & Cooper, S. L. (2008). An absorbed-dose/dose-rate dependence for the alanine-EPR dosimetry system and its implications in high-dose ionizing radiation metrology. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 113(2), 79. <https://doi.org/10.6028/jres.113.007>
- Desrosiers, M. F., & Puhl, J. M. (2009). Absorbed-dose/dose-rate dependence studies for the alanine-EPR dosimetry system. *Radiation Physics and Chemistry*, 78(7-8), 461-463. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.03.025>
- Douki, T., Ravanat, J.-L., Pouget, J.-P., Testard, I., & Cadet, J. (2006). Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *International Journal of Radiation Biology*, 82(2), 119-127. <https://doi.org/10.1080/09553000600573788>
- Draganic, I., & Draganic, Z. D. (1971). Primary Products of Water Radiolysis : Oxidizing Species—The Hydroxyl Radical and Hydrogen Peroxide. In *Physical Chemistry* (Vol. 26, p. 91-122). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-221650-3.50008-X>
- Draganic, Z. D., & Draganic, I. (1969). Origin of primary hydrogen peroxide yield in the .gamma. Radiolysis of water. *The Journal of Physical Chemistry*, 73(8), 2571-2577. <https://doi.org/10.1021/j100842a019>
- Draganic, Z. D., & Draganic, I. G. (1973). Formation of primary yields of hydroxyl radical and hydrated electron in the .gamma.-radiolysis of water. *The Journal of Physical Chemistry*, 77(6), 765-772. <https://doi.org/10.1021/j100625a007>
- Durante, M., & Formenti, S. C. (2018). Radiation-Induced Chromosomal Aberrations and Immunotherapy : Micronuclei, Cytosolic DNA, and Interferon-Production Pathway. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00192>
- Durante, M., & Loeffler, J. S. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.183>
- Dyne, P. J., & Kennedy, J. M. (1960). A detailed study of the Samuel-Magee model for the radiation chemistry of water. *Can. J. Chem.*, 38, 61-77.
- El Omar, A. K. (2013, novembre 4). *Études des réactions primaires en solutions par la radiolyse pulsée picoseconde*. <https://www.semanticscholar.org/paper/%C3%89tudes-des-r%C3%A9actions-primaires-en-solutions-par-la-Omar/95b895a014dad993d11e669e72d96b5a8df34d01>
- El Omar, A. K., Schmidhammer, U., Jeunesse, P., Larbre, J.-P., Lin, M., Muroya, Y., Katsumura, Y., Pernot, P., & Mostafavi, M. (2011a). Time-Dependent Radiolytic Yield of OH • Radical Studied by Picosecond Pulse Radiolysis. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(44), 12212-12216. <https://doi.org/10.1021/jp208075v>
- El Omar, A. K., Schmidhammer, U., Jeunesse, P., Larbre, J.-P., Lin, M., Muroya, Y., Katsumura, Y., Pernot, P., & Mostafavi, M. (2011b). Time-Dependent Radiolytic Yield of OH• Radical Studied by Picosecond Pulse Radiolysis. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(44), 12212-12216. <https://doi.org/10.1021/jp208075v>
- El Omar, A. K., Schmidhammer, U., Jeunesse, P., Larbre, J.-P., Lin, M., Muroya, Y., Katsumura, Y., Pernot, P., & Mostafavi, M. (2011c). Time-Dependent Radiolytic Yield of OH• Radical Studied by Picosecond Pulse

- Radiolysis. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(44), 12212-12216. <https://doi.org/10.1021/jp208075v>
- Elliot, A. J., Chenier, M. P., Ouellette, D. C., & Koslowsky, V. T. (1996). Temperature Dependence of g Values for Aqueous Solutions Irradiated with 23 MeV 2H<sup>+</sup> and 157 MeV 7Li<sup>3+</sup> Ion Beams. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(21), 9014-9020. <https://doi.org/10.1021/jp953593m>
- Elliot, A. J., McCracken, D. R., Buxton, G. V., & Wood, N. D. (1990). Estimation of rate constants for near-diffusion-controlled reactions in water at high temperatures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 86(9), 1539-1547. <https://doi.org/10.1039/FT9908601539>
- Fang, X., Mark, G., & von Sonntag, C. (1996). OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions Part I : The chemistry underlying the terephthalate dosimeter. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(1), 57-63. [https://doi.org/10.1016/1350-4177\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/1350-4177(95)00032-1)
- Fang, X., Pan, X., Rahmann, A., Schuchmann, H.-P., & von Sonntag, C. (1995). Reversibility in the Reaction of Cyclohexadienyl Radicals with Oxygen in Aqueous Solution. *Chemistry – A European Journal*, 1(7), 423-429. <https://doi.org/10.1002/chem.19950010706>
- Favaudon, V., Caplier, L., Monceau, V., Pouzoulet, F., Sayarath, M., Fouillade, C., Poupon, M.-F., Brito, I., Hupé, P., Bourhis, J., Hall, J., Fontaine, J.-J., & Vozenin, M.-C. (2014). Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Science Translational Medicine*, 6(245). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008973>
- Favaudon, V., Labarbe, R., & Limoli, C. L. (2022). Model studies of the role of oxygen in the FLASH effect. *Medical Physics*, 49(3), 2068-2081. <https://doi.org/10.1002/mp.15129>
- Ferradini, C., & Jay-Gerin, J.-P. (1999). La radiolyse de l'eau et des solutions aqueuses : Historique et actualité. *Canadian Journal of Chemistry*, 77(9), 1542-1575. <https://doi.org/10.1139/v99-162>
- Ferradini, C., & Jay-Gerin, J.-P. (2011). La radiolyse de l'eau et des solutions aqueuses : Historique et actualité. *Canadian Journal of Chemistry*, 77, 1542-1575. <https://doi.org/10.1139/v99-162>
- Finch, C. A. (1958). THE ROLE OF IRON IN HEMOGLOBIN SYNTHESIS. In *Conference on Hemoglobin : 2-3 May 1957*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK224286/>
- Fokas, E., Kraft, G., An, H., & Engenhardt-Cabillic, R. (2009a). Ion beam radiobiology and cancer : Time to update ourselves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1796(2), 216-229. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.005>
- Fokas, E., Kraft, G., An, H., & Engenhardt-Cabillic, R. (2009b). Ion beam radiobiology and cancer : Time to update ourselves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1796(2), 216-229. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.005>
- Folkard, M., Prise, K. M., Vojnovic, B., Newman, H. C., Roper, M. J., & Michael, B. D. (1996). Inactivation of V79 cells by low-energy protons, deuterons and helium-3 ions. *International Journal of Radiation Biology*, 69(6), 729-738. <https://doi.org/10.1080/095530096145472>
- Fournier, M.-C., Falk, L., & Villermaux, J. (1996). A new parallel competing reaction system for assessing micromixing efficiency—Experimental approach. *Chemical Engineering Science*, 51(22), 5053-5064. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(96\)00270-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)00270-9)
- Francis, Z., Seif, E., Incerti, S., Champion, C., Karamitros, M., Bernal, M. A., Ivanchenko, V. N., Mantero, A., Tran, H. N., & El Bitar, Z. (2014). Carbon ion fragmentation effects on the nanometric level behind the Bragg peak depth. *Physics in Medicine and Biology*, 59(24), 7691-7702. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/24/7691>
- Froidevaux, P., Grilj, V., Bailat, C., Geyer, W. R., Bochud, F., & Vozenin, M.-C. (2023). FLASH irradiation does not induce lipid peroxidation in lipids micelles and liposomes. *Radiation Physics and Chemistry*, 205, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2022.110733>
- Gardes-Albert, M. (2008). Chapter 17 : Radiation-induced damage of membrane lipids and lipoproteins. In *Radiation Chemistry : From Basics to Applications in Material and Life Sciences* (Vol. 1, p. 249-264). <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0317-0>
- Garrison, W. M. (1987). Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*, 87(2), 381-398. <https://doi.org/10.1021/cr00078a006>

- Garrison, W. M., Sokol, H. A., & Bennett-Corniea, W. (1973). Radiation Chemistry of Glycylglycine in Oxygen-Free Systems. *Radiation Research*, 53(3), 376-384. <https://doi.org/10.2307/3573770>
- Gentner, W., Maier-Leibnitz, H., & Bernhard, W. (1940). A complete discussion of the early work done with the cloud chamber technique with many excellent reproductions of photographs and drawings of expansion chambers. *Nebelkammerbilder*. Berlin : Springer.
- Gervais, B., Beuve, M., Olivera, G. H., & Galassi, M. E. (2006). Numerical simulation of multiple ionization and high LET effects in liquid water radiolysis. *Radiation Physics and Chemistry*, 75(4), 493-513. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2005.09.015>
- Geske, F. J., & Gerschenson, L. E. (2001). The biology of apoptosis. *Human Pathology*, 32(10), 1029-1038. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.28250>
- Ghormley, J. A., & Hochanadel, C. J. (1954). THE YIELDS OF HYDROGEN AND HYDROGEN PEROXIDE IN THE IRRADIATION OF OXYGEN SATURATED WATER WITH COBALT GAMMA-RAYS. *Journal of the American Chemical Society*, 76(12), 3351-3352. <https://doi.org/10.1021/ja01641a085>
- Gianfaldoni, S., Gianfaldoni, R., Wollina, U., Lotti, J., Tchernev, G., & Lotti, T. (2017). An Overview on Radiotherapy : From Its History to Its Current Applications in Dermatology. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(4), 521-525. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.122>
- Giesel, F. (1902). Ueber Radium und radioactive Stoffe. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 35(3), 3608-3611. <https://doi.org/10.1002/cber.190203503187>
- Giesel, F. (1903). Ueber Polonium und die inducierende Eigenschaft des Radiums. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 36(2), 2368-2370. <https://doi.org/10.1002/cber.190303602168>
- Gobert, S. R. L., Kuhn, S., Braeken, L., & Thomassen, L. C. J. (2017). Characterization of Milli- and Microflow Reactors : Mixing Efficiency and Residence Time Distribution. *Organic Process Research & Development*, 21(4), 531-542. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00359>
- Gonzalez, D. H., Kuang, X. M., Scott, J. A., Rocha, G. O., & Paulson, S. E. (2018). Terephthalate Probe for Hydroxyl Radicals : Yield of 2-Hydroxyterephthalic Acid and Transition Metal Interference. *Analytical Letters*, 51(15), 2488-2497. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1431246>
- Grosovsky, A. J., & Little, J. B. (1985). Evidence for linear response for the induction of mutations in human cells by x-ray exposures below 10 rads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(7), 2092-2095. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.7.2092>
- Grubbé, E. H. (1933). Priority in the Therapeutic Use of X-rays. *Radiology*, 21(2), 156-162. <https://doi.org/10.1148/21.2.156>
- Guichardon, P., & Falk, L. (2000). Characterisation of micromixing efficiency by the iodide/iodate reaction system. Part I: experimental procedure. *Chemical Engineering Science*.
- Guillonneau, G., Kermouche, G., Bec, S., & Loubet, J.-L. (2011). *Nanoindentation : Identification des propriétés mécaniques par détection synchrone de la seconde harmonique*.
- Haettner, E., Iwase, H., Krämer, M., Kraft, G., & Scharadt, D. (2013). Experimental study of nuclear fragmentation of 200 and 400 MeV/u<sup>12</sup>C ions in water for applications in particle therapy. *Physics in Medicine & Biology*, 58(23), 8265. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/23/8265>
- Hahn, O., & Strassmann, F. (1939). Über den Nachweis und das Verhalten der bei der Bestrahlung des Urans mittels Neutronen entstehenden Erdalkalimetalle. *Naturwissenschaften*, 27(1), 11-15. <https://doi.org/10.1007/BF01488241>
- Hall, B., Phan, C.-M., Subbaraman, L., Jones, L. W., & Forrest, J. (2014). Extraction versus in situ techniques for measuring surface-adsorbed lysozyme. *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry*, 91(9), 1062-1070. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000000354>
- Hartmann, B., Granja, C., Jakubek, J., Gehrke, T., Gallas, R., Pospíšil, S., Jäkel, O., & Martišková, M. (2017). A Novel Method for Fragmentation Studies in Particle Therapy : Principles of Ion Identification. *International Journal of Particle Therapy*, 3(4), 439-449. <https://doi.org/10.14338/IJPT-15-00003.1>
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2019). Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19683-19708. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>

- Hitschke, K., Bühler, R., Apell, H. J., & Stark, G. (1994). Inactivation of the Na, K-ATPase by radiation-induced free radicals. Evidence for a radical-chain mechanism. *FEBS Letters*, 353(3), 297-300. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01067-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01067-6)
- Hlatky, L., Sachs, R. K., Vazquez, M., & Cornforth, M. N. (2002). Radiation-induced chromosome aberrations : Insights gained from biophysical modeling. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(8), 714-723. <https://doi.org/10.1002/bies.10126>
- Horne, G. P., Zalupski, P. R., Daubaras, D. L., Rae, C., Mezyk, S. P., & Mincher, B. J. (2020). Radiolytic degradation of formic acid and formate in aqueous solution : Modeling the final stages of organic mineralization under advanced oxidation process conditions. *Water Research*, 186, 116314. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116314>
- Houée-Levin, C., & Bobrowski, K. (2013). The use of the methods of radiolysis to explore the mechanisms of free radical modifications in proteins. *Journal of Proteomics*, 92, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.014>
- Huang, J., Henke, L. E., & Campian, J. L. (2021). Chapter 24—Approach to the patient with radiation necrosis. In R. E. Strowd (Éd.), *Neuro-Oncology for the Clinical Neurologist* (p. 314-320). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-69494-0.00024-5>
- Huang, W., Ravikumar, K. M., Chance, M. R., & Yang, S. (2015). Quantitative Mapping of Protein Structure by Hydroxyl Radical Footprinting-Mediated Structural Mass Spectrometry : A Protection Factor Analysis. *Biophysical Journal*, 108(1), 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.013>
- Hyams, D. (2010). *CurveExpert Software* (1.4). Hyams Development. <https://www.curveexpert.net/>
- Ignasiak, M., de Oliveira, P., Levin, C. H., & Scuderi, D. (2013). Oxidation of methionine-containing peptides by OH radicals : Is sulfoxide the only product? Study by mass spectrometry and IRMPD spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 590, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.10.057>
- Ignasiak, M., Scuderi, D., de Oliveira, P., Pedzinski, T., Rayah, Y., & Houée Levin, C. (2011). Characterization by mass spectrometry and IRMPD spectroscopy of the sulfoxide group in oxidized methionine and related compounds. *Chemical Physics Letters*, 502(1), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.12.012>
- Ilan, Y., & Rabani, J. (1976). On some fundamental reactions in radiation chemistry : Nanosecond pulse radiolysis. *International Journal for Radiation Physics and Chemistry*, 8(5), 609-611. [https://doi.org/10.1016/0020-7055\(76\)90030-9](https://doi.org/10.1016/0020-7055(76)90030-9)
- Ivers, J. D., Roth, I. S., & Nation, J. A. (1986). Faraday cup to measure ion current in a strong magnetic field. *Review of Scientific Instruments*, 57(10), 2632-2633. <https://doi.org/10.1063/1.1139073>
- Jansen, J., Knoll, J., Beyreuther, E., Pawelke, J., Skuza, R., Hanley, R., Brons, S., Pagliari, F., & Seco, J. (2021). Does FLASH deplete oxygen? Experimental evaluation for photons, protons, and carbon ions. *Medical Physics*, 48(7), 3982-3990. <https://doi.org/10.1002/mp.14917>
- Jåstad, E. O., Torheim, T., Villeneuve, K. M., Kvaal, K., Hole, E. O., Sagstuen, E., Malinen, E., & Futsaether, C. M. (2017). In Quest of the Alanine R3 Radical : Multivariate EPR Spectral Analyses of X-Irradiated Alanine in the Solid State. *The Journal of Physical Chemistry A*, 121(38), 7139-7147. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b06447>
- Jette, D., & Chen, W. (2011). Creating a spread-out Bragg peak in proton beams. *Physics in Medicine and Biology*, 56(11), N131-138. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/56/11/N01>
- Jia, S. B., Hadizadeh, M. H., Mowlavi, A. A., & Loushab, M. E. (2014). Evaluation of energy deposition and secondary particle production in proton therapy of brain using a slab head phantom. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 19(6), 376-384. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.04.008>
- Jovanovid, S., & Kidri, B. (1983). GAMMA P~ADIOLYSIS OF OXYGENATED AQUEOUS SOLUTIONS OF TRYPTOPHAN. *Radiation Physics and Chemistry*, 22, 765-770.
- Kacem, H., Almeida, A., Cherbuin, N., & Vozenin, M.-C. (2022). Understanding the FLASH effect to unravel the potential of ultra-high dose rate irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 98(3), 506-516. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.2004328>
- Kacem, H., Psoroulas, S., Boivin, G., Folkerts, M., Grilj, V., Lomax, T., Martinotti, A., Meer, D., Ollivier, J., Petit, B., Safai, S., Sharma, R. A., Togno, M., Vilalta, M., Weber, D. C., & Vozenin, M.-C. (2022). Comparing radiolytic production of H2O2 and development of Zebrafish embryos after ultra high dose rate exposure with



- electron and transmission proton beams. *Radiotherapy and Oncology*, 175, 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2022.07.011>
- Kamada, T. (2014). Overview of the Heavy-Ion Medical Accelerator in Chiba (HIMAC) Practices. In H. Tsujii, T. Kamada, T. Shirai, K. Noda, H. Tsuji, & K. Karasawa (Éds.), *Carbon-Ion Radiotherapy: Principles, Practices, and Treatment Planning* (p. 17-22). Springer Japan. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-54457-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54457-9_3)
- Katz, R. (1970). RBE, LET, and  $z/\beta^a$ . *Health Physics*, 175.
- Kempner, E. S. (1993). Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 26(1), 27-48. <https://doi.org/10.1017/S0033583500003954>
- Kempner, E. S. (2001). Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(10), 1637-1646. <https://doi.org/10.1002/jps.1114>
- Kempner, E. S. (2011). Direct Effects of Ionizing Radiation on Macromolecules. *Journal of polymer science. Part B, Polymer physics*, 49(12), 827-831. <https://doi.org/10.1002/polb.22250>
- Kempner, E. S., Wood, R., & Salovey, R. (1986). The temperature dependence of radiation sensitivity of large molecules. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 24(10), 2337-2343. <https://doi.org/10.1002/polb.1986.090241015>
- Kenji, S., Kuninori, E., & Masahiro, E. (1990). HEAVY ION MEDICAL ACCELERATOR IN CHIBA (HIMAC). *Particle Accelerators*, 33(1), 147-152. <https://doi.org/10.1080/1071441950170102>
- Kernbaum, M. (1910). Décomposition de la vapeur d'eau par l'aigrette. *Comptes rendus hebdomadaires de l'Académie des sciences*, 151, 319-322.
- Kiefer, J., Schmidt, P., & Koch, S. (2001). Mutations in mammalian cells induced by heavy charged particles : An indicator for risk assessment in space. *Radiation Research*, 156(5 Pt 2), 607-611. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)156\[0607:mimcib\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)156[0607:mimcib]2.0.co;2)
- Kimura, Y., Alfano, J. C., Walhout, P. K., & Barbara, P. F. (1994). Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy of the Solvated Electron in Water. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(13), 3450-3458. <https://doi.org/10.1021/j100064a029>
- Kiselar, J. G., & Chance, M. R. (2010). Future directions of structural mass spectrometry using hydroxyl radical footprinting. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(12), 1373-1382. <https://doi.org/10.1002/jms.1808>
- Kodaira, S., Kitamura, H., Kurano, M., Kawashima, H., & Benton, E. R. (2019). Contribution to dose in healthy tissue from secondary target fragments in therapeutic proton, He and C beams measured with CR-39 plastic nuclear track detectors. *Scientific Reports*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39598-0>
- Korystov, Yu. N. (1992). Contributions of the Direct and Indirect Effects of Ionizing Radiation to Reproductive Cell Death. *Radiation Research*, 129(2), 228-234. <https://doi.org/10.2307/3578162>
- Koufen, D., Brdiczka, G., Stark, P. (2000). Inverse dose-rate effects at the level of proteins observed in the presence of lipids. *International Journal of Radiation Biology*, 76(5), 625-631. <https://doi.org/10.1080/095530000138286>
- Kreipl, M. S., Friedland, W., & Paretzke, H. G. (2009). Time- and space-resolved Monte Carlo study of water radiolysis for photon, electron and ion irradiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 48(1), 11-20. <https://doi.org/10.1007/s00411-008-0194-8>
- Kusumoto, T., Inaniwa, T., Mizushima, K., Sato, S., Hojo, S., Kitamura, H., Konishi, T., & Kodaira, S. (2022). Radiation Chemical Yields of 7-Hydroxy-Coumarin-3-Carboxylic Acid for Proton- and Carbon-Ion Beams at Ultra-High Dose Rates : Potential Roles in FLASH Effects. *Radiation Research*, 198(3). <https://doi.org/10.1667/RADE-21-00.230.1>
- Kusumoto, T., Kitamura, H., Hojo, S., Konishi, T., & Kodaira, S. (2020). Significant changes in yields of 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid produced under FLASH radiotherapy conditions. *RSC Advances*, 10(63), 38709-38714. <https://doi.org/10.1039/D0RA07999E>
- Lacroix, M., Le, T. C., Ouattara, B., Yu, H., Letendre, M., Sabato, S. F., Mateescu, M. A., & Patterson, G. (2002). Use of  $\gamma$ -irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins : Structure and functionals characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*, 63(3), 827-832. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00574-6](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00574-6)

- LaVerne, J. A. (1989). Radical and molecular yields in the radiolysis of water with carbon ions. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 34(1), 135-143. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(89\)90018-0](https://doi.org/10.1016/1359-0197(89)90018-0)
- LaVerne, J. A. (2000). OH Radicals and Oxidizing Products in the Gamma Radiolysis of Water. *Radiation Research*, 153(2), 196-200. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0196:ORAOP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0196:ORAOP]2.0.CO;2)
- LaVerne, J. A., & Pimblott, S. M. (1991). Scavenger and time dependences of radicals and molecular products in the electron radiolysis of water: Examination of experiments and models. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(8), 3196-3206. <https://doi.org/10.1021/j100161a044>
- LaVerne, J. A., & Schuler, R. H. (1987). Radiation chemical studies with heavy ions: Oxidation of ferrous ion in the Fricke dosimeter. *The Journal of Physical Chemistry*, 91(22), 5770-5776. <https://doi.org/10.1021/j100306a050>
- LaVerne, J. A., & Schuler, R. H. (1996). Radiolysis of the Fricke dosimeter with <sup>58</sup>Ni and <sup>238</sup>U ions: Response for particles of high linear energy transfer. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(39), 16034-16040.
- LaVerne, J. A., Schuler, R. H., & Burns, W. G. (1986). Track effects in radiation chemistry: Production of hydroperoxo radical within the track core in the heavy-particle radiolysis of water. *The Journal of Physical Chemistry*, 90(14), 3238-3242. <https://doi.org/10.1021/j100405a037>
- LaVerne, J. A., Štefanić, I., & Pimblott, S. M. (2005). Hydrated Electron Yields in the Heavy Ion Radiolysis of Water. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(42), 9393-9401. <https://doi.org/10.1021/jp0530303>
- LaVerne, J. A., & Yoshida, H. (1993). Production of the hydrated electron in the radiolysis of water with helium ions. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(41), 10720-10724. <https://doi.org/10.1021/j100143a033>
- Lawrence, E. O., Edlefsen, N. E., & Lewis, G. N. (1930). *On the production of high speed protons*. publisher not identified.
- Lawrence, E. O., & Livingston, M. S. (1931). The Production of High Speed Protons Without the Use of High Voltages. *Physical Review*, 38(4), 834-834. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.38.834>
- Lawrence, E. O., & Livingston, M. S. (1932). The Production of High Speed Light Ions Without the Use of High Voltages. *Physical Review*, 40(1), 19-35. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.40.19>
- Lee, J. H., & Tang, I. N. (1982). Absolute rate constants for the hydroxyl radical reactions with ethane, furan, and thiophene at room temperature. *The Journal of Chemical Physics*, 77(9), 4459-4463. <https://doi.org/10.1063/1.444367>
- Lee, S. L., Lee, M. S., & Song, K. B. (2005). Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films. *Food Chemistry*, 92(4), 621-625. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.023>
- Lind, S. C., & Morrow, J. (1962). Radiation Chemistry of Gases. *Journal of The Electrochemical Society*, 109(3), 97C. <https://doi.org/10.1149/1.2425388>
- Lipinski, B. (2011). Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 809696. <https://doi.org/10.1155/2011/809696>
- Little, J. B. (1968). Cellular Effects of Ionizing Radiation. *New England Journal of Medicine*, 278(7), 369-376. <https://doi.org/10.1056/NEJM196802152780705>
- Little, J. B. (1994). Failla Memorial Lecture. Changing views of cellular radiosensitivity. *Radiation Research*, 140(3), 299-311.
- Little, J. B. (2003). Principal Cellular and Tissue Effects of Radiation. *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12344/>
- Liu, T., Chao, G., Zhangang, Z., Fazhan, Z., Gu, S., Teng, T., Xi, K., Gang, L., Zhengsheng, H., Mingdong, H., & Jie, L. (2014). Impact of temperature on single event upset measurement by heavy ions in SRAM devices. *Journal of Semiconductors*, 35, 084008. <https://doi.org/10.1088/1674-4926/35/8/084008>
- Louit, G., Foley, S., Cabillic, J., Coffigny, H., Taran, F., Valleix, A., Renault, J. P., & Pin, S. (2005). The reaction of coumarin with the OH radical revisited: Hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography. *Radiation Physics and Chemistry*, 72(2-3), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.09.007>
- Ludwig, N. (2018). *Modification d'acides aminés et de protéines en milieux aqueux sous faisceau d'ions* [Thesis, Strasbourg]. <http://www.theses.fr/2018STRAE020>

- Ludwig, N., Kusumoto, T., Galindo, C., Peaupardin, P., Pin, S., Renault, J.-P., Muller, D., Yamauchi, T., Kodaira, S., Barillon, R., & Raffy, Q. (2018). Radiolysis of phenylalanine in solution with Bragg-Peak energy protons. *Radiation Measurements*, *116*, 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2018.07.007>
- Maeyama, T., Yamashita, S., Baldacchino, G., Taguchi, M., Kimura, A., Murakami, T., & Katsumura, Y. (2011). Production of a fluorescence probe in ion-beam radiolysis of aqueous coumarin-3-carboxylic acid solution—1 : Beam quality and concentration dependences. *Radiation Physics and Chemistry*, *80*(4), 535-539. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2010.11.013>
- Maeyama, T., Yamashita, S., Taguchi, M., Baldacchino, G., Sihver, L., Murakami, T., & Katsumura, Y. (2011). Production of a fluorescence probe in ion-beam radiolysis of aqueous coumarin-3-carboxylic acid solution—2 : Effects of nuclear fragmentation and its simulation with PHITS. *Radiation Physics and Chemistry*, *80*(12), 1352-1357. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.07.004>
- Makarov, M., Sanchez Rocha, A. C., Krystufek, R., Cherepashuk, I., Dzmitruk, V., Charnavets, T., Faustino, A. M., Lebl, M., Fujishima, K., Fried, S. D., & Hlouchova, K. (2023). Early Selection of the Amino Acid Alphabet Was Adaptively Shaped by Biophysical Constraints of Foldability. *Journal of the American Chemical Society*, *145*(9), 5320-5329. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c12987>
- Marciniak, B., & Bobrowski, K. (2022). Photo- and Radiation-Induced One-Electron Oxidation of Methionine in Various Structural Environments Studied by Time-Resolved Techniques. *Molecules*, *27*(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/molecules27031028>
- Marín, A., Martín, M., Liñán, O., Alvarenga, F., López, M., Fernández, L., Büchser, D., & Cerezo, L. (2015). Bystander effects and radiotherapy. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, *20*(1), 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.08.004>
- Marsh, W. (2007). Tryptophan. In S. J. Enna & D. B. Bylund (Éds.), *XPharm : The Comprehensive Pharmacology Reference* (p. 1-5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62821-1>
- McParland, B. J. (2010). Biological Effects of Ionizing Radiation. In B. J. McParland (Éd.), *Nuclear Medicine Radiation Dosimetry: Advanced Theoretical Principles* (p. 401-453). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-84882-126-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-84882-126-2_10)
- Meesungnoen, J., & Jay-Gerin, J.-P. (2005a). Effect of Multiple Ionization on the Yield of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produced in the Radiolysis of Aqueous 0.4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Solutions by High-LET 12C<sub>6</sub> and 20Ne<sub>9</sub> Ions. *Radiation Research*, *164*(5), 688-694. <https://doi.org/10.1667/RR3459.1>
- Meesungnoen, J., & Jay-Gerin, J.-P. (2005b). High-LET Radiolysis of Liquid Water with <sup>1</sup>H<sup>+</sup>, <sup>4</sup>He<sup>2+</sup>, <sup>12</sup>C<sup>6+</sup>, and <sup>20</sup>Ne<sup>9+</sup> Ions : Effects of Multiple Ionization. *The Journal of Physical Chemistry A*, *109*(29), 6406-6419. <https://doi.org/10.1021/jp058037z>
- Meesungnoen, J., & Jay-Gerin, J.-P. (2009). High-LET Ion Radiolysis of Water : Oxygen Production in Tracks. *Radiation Research*, *171*(3), 379-386.
- Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.-P., Filali-Mouhim, A., & Mankhetkorn, S. (2002). Low-Energy Electron Penetration Range in Liquid Water. *Radiation Research*, *158*(5), 657-660. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)158\[0657:LLEPRI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0657:LLEPRI]2.0.CO;2)
- Meitner, L., & Frisch, O. R. (1939). Disintegration of Uranium by Neutrons : A New Type of Nuclear Reaction. *Nature*, *143*(3615), 239-240. <https://doi.org/10.1038/143239a0>
- Meyers, M. A., Chen, P.-Y., Lopez, M. I., Seki, Y., & Lin, A. Y. M. (2011). Biological materials : A materials science approach. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *4*(5), 626-657. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.08.005>
- Mezyk, S. P., & Bartels, D. M. (1995). Direct EPR measurement of Arrhenius parameters for the reactions of H<sup>•</sup> atoms with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and D<sup>•</sup> atoms with D<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, *91*(18), 3127-3132. <https://doi.org/10.1039/FT9959103127>
- Mirdamadi-Esfahani, M., Lampre, I., Marignier, J.-L., de Waele, V., & Mostafavi, M. (2009). Radiolytic formation of tribromine ion Br<sub>3</sub><sup>-</sup> in aqueous solutions, a system for steady-state dosimetry. *Radiation Physics and Chemistry*, *78*(2), 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2008.08.009>
- Molnar, C., & Gair, J. (2015). *9.1 The Structure of DNA*. <https://opentextbc.ca/biology/chapter/9-1-the-structure-of-dna/>

- Montay-Gruel, P., Acharya, M. M., Petersson, K., Alikhani, L., Yakkala, C., Allen, B. D., Ollivier, J., Petit, B., Jorge, P. G., Syage, A. R., Nguyen, T. A., Baddour, A. A. D., Lu, C., Singh, P., Moeckli, R., Bochud, F., Germond, J.-F., Froidevaux, P., Bailat, C., ... Limoli, C. L. (2019). Long-term neurocognitive benefits of FLASH radiotherapy driven by reduced reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(22), 10943-10951. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901777116>
- Montay-Gruel, P., Bouchet, A., Jaccard, M., Patin, D., Serduc, R., Aim, W., Petersson, K., Petit, B., Bailat, C., Bourhis, J., Bräuer-Krisch, E., & Vozenin, M.-C. (2018). X-rays can trigger the FLASH effect : Ultra-high dose-rate synchrotron light source prevents normal brain injury after whole brain irradiation in mice. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, *129*(3), 582-588. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.08.016>
- Montay-Gruel, P., Corde, S., Laissue, J. A., & Bazalova-Carter, M. (2022). FLASH radiotherapy with photon beams. *Medical Physics*, *49*(3), 2055-2067. <https://doi.org/10.1002/mp.15222>
- Montay-Gruel, P., Petersson, K., Jaccard, M., Boivin, G., Germond, J.-F., Petit, B., Doenlen, R., Favaudon, V., Bochud, F., Bailat, C., Bourhis, J., & Vozenin, M.-C. (2017). Irradiation in a flash : Unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100 Gy/s. *Radiotherapy and Oncology*, *124*(3), 365-369. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.05.003>
- Moriyama, Y., & Takeda, K. (2017). Secondary Structural Changes of Intact and Disulfide Bridges-Cleaved Human Serum Albumins in Thermal Denaturation up to 130°C – Additive Effects of Sodium Dodecyl Sulfate on the Changes. *Journal of Oleo Science*, *66*(5), 521-529. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16228>
- Mostafavi, M., & Lampre, I. (2008). Chapter 3 : The solvated electron : A singular chemical species. In *Radiation Chemistry: From Basics to Applications in Material and Life Sciences* (Vol. 1, p. 52-69). <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0317-0>
- Motohashi, N., & Saito, Y. (1993). Competitive Measurement of Rate Constants for Hydroxyl Radical Reactions Using Radiolytic Hydroxylation of Benzoate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *41*(10), 1842-1845. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.1842>
- Mozumder, A., & Magee, J. L. (1966). Model of Tracks of Ionizing Radiations for Radical Reaction Mechanisms. *Radiation Research*, *28*(2), 203-214. <https://doi.org/10.2307/3572190>
- Mozziconacci, O., Mirkowski, J., Rusconi, F., Kciuk, G., Wisniowski, P. B., Bobrowski, K., & Houée-Levin, C. (2012). Methionine Residue Acts as a Prooxidant in the •OH-Induced Oxidation of Enkephalins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *116*(41), 12460-12472. <https://doi.org/10.1021/jp307043q>
- Mujika, J. I., Uranga, J., & Matxain, J. M. (2013). Computational study on the attack of •OH radicals on aromatic amino acids. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, *19*(21), 6862-6873. <https://doi.org/10.1002/chem.201203862>
- Muller, H. J. (1928). The production of mutations by X-rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *14*, 714-725.
- Muraki, M., Morikawa, M., Jigami, Y., & Tanaka, H. (1987). The roles of conserved aromatic amino-acid residues in the active site of human lysozyme : A site-specific mutagenesis study. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *916*(1), 66-75. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90211-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90211-1)
- Najafi, M., Fardid, R., Hadadi, G., & Fardid, M. (2014). The Mechanisms of Radiation-Induced Bystander Effect. *Journal of Biomedical Physics & Engineering*, *4*(4), 163-172.
- O'Brien, J. (1996). *DOE Fundamentals Handbook, Nuclear Physics and Reactor Theory* (Vol. 1). <https://www.standards.doe.gov/standards-documents/1000/1019-bhdbk-1993-v1>
- Ohta, N., Chen, D., Ito, S., Futo, T., Yotsuyanagi, T., & Ikeda, K. (1995). Effect of trans-diamminedichloroplatinum(II) on human serum albumin : Conformational changes through partial disulfide bond cleavage. *International Journal of Pharmaceutics*, *118*(1), 85-93. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00351-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00351-5)
- Ou, H., Zhang, B., & Zhao, S. (2018). Monte Carlo simulation of the relative biological effectiveness and DNA damage from a 400 MeV/u carbon ion beam in water. *Applied Radiation and Isotopes*, *136*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.01.038>

- Ou, H.-F., Zhang, B., & Zhao, S.-J. (2017). Monte Carlo simulation for calculation of fragments produced by 400 MeV/u carbon ion beam in water. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 396, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2017.01.077>
- Ouattara, B., Canh, L. T., Vachon, C., Mateescu, M. A., & Lacroix, M. (2002). Use of g-irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films. *Radiation Physics and Chemistry*.
- Page, S. E., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2010). Terephthalate as a probe for photochemically generated hydroxyl radical. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(9), 1658-1665. <https://doi.org/10.1039/C0EM00160K>
- Park, J. M., Kim, J., & Wu, H.-G. (2021). Technological Advances in Charged-Particle Therapy. *Cancer Research and Treatment*, 53(3), 635-640. <https://doi.org/10.4143/crt.2021.706>
- Pastina, B., & LaVerne, J. A. (1999). Hydrogen Peroxide Production in the Radiolysis of Water with Heavy Ions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(11), 1592-1597. <https://doi.org/10.1021/jp984433o>
- Pawlik, T. M., & Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 59(4), 928-942. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>
- Peters, T. (1995). 2 - The Albumin Molecule : Its Structure and Chemical Properties. In T. Peters (Éd.), *All About Albumin* (p. 9-II). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012552110-9/50004-0>
- Peukert, D., Incerti, S., Kempson, I., Douglass, M., Karamitros, M., Baldacchino, G., & Bezak, E. (2018). Validation and investigation of reactive species yields of Geant4- DNA chemistry models. *Medical Physics*, mp.13332. <https://doi.org/10.1002/mp.13332>
- Pimblott, S. M., Alexander, C., Green, N. J. B., & Burns, W. G. (1992). Effects of spur overlap in radiation chemistry : Reaction in two nearby spurs. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 88(7), 925-934. <https://doi.org/10.1039/FT9928800925>
- Pimblott, S. M., & LaVerne, J. A. (1998). Effect of Electron Energy on the Radiation Chemistry of Liquid Water. *Radiation Research*, 150(2), 159-169. <https://doi.org/10.2307/3579851>
- Pimblott, S. M., & LaVerne, J. A. (2002). Effects of Track Structure on the Ion Radiolysis of the Fricke Dosimeter. *The Journal of Physical Chemistry A*, 106(41), 9420-9427. <https://doi.org/10.1021/jp020830u>
- Pimblott, S. M., & LaVerne, J. A. (2007). Production of low-energy electrons by ionizing radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(8), 1244-1247. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.02.012>
- Pinot, J., Commenge, J.-M., Portha, J.-F., & Falk, L. (2014). New protocol of the Villiermaux–Dushman reaction system to characterize micromixing effect in viscous media. *Chemical Engineering Science*, 118, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.07.010>
- Pogozelski, W. K., & Tullius, T. D. (1998). Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids : Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. *Chemical Reviews*, 98(3), 1089-1108. <https://doi.org/10.1021/cr960437i>
- Precek, M., Kubelik, P., Vysin, L., Schmidhammer, U., Larbre, J.-P., Demarque, A., Jeunesse, P., Mostafavi, M., & Juha, L. (2022). Dose Rate Effects in Fluorescence Chemical Dosimeters Exposed to Picosecond Electron Pulses : An Accurate Measurement of Low Doses at High Dose Rates. *Radiation Research*, 197(2), 131-148. <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00292.1>
- PTCOG - Home. (s. d.). Consulté 16 avril 2023, à l'adresse <https://ptcog.site/>
- Purdie, J. W. (1967).  $\gamma$  Radiolysis of Cystine in Aqueous Solution. Dose-Rate Effects and a Proposed Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 89(2), 226-230. <https://doi.org/10.1021/ja00978a007>
- Rabani, J., & Nielsen, S. O. (1969). Absorption spectrum and decay kinetics of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and HO<sub>2</sub> in aqueous solutions by pulse radiolysis. *The Journal of Physical Chemistry*, 73(11), 3736-3744. <https://doi.org/10.1021/j100845a030>
- Radford, I. R. (2002). DNA lesion complexity and induction of apoptosis by ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 78(6), 457-466. <https://doi.org/10.1080/09553000110120337>
- Radvanyi, P., & Villain, J. (2017). The discovery of radioactivity. *Comptes Rendus Physique*, 18(9), 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2017.10.008>

- Ramos-Méndez, J., Domínguez-Kondo, N., Schuemann, J., McNamara, A., Moreno-Barbosa, E., & Faddegon, B. (2020). LET-Dependent Intertrack Yields in Proton Irradiation at Ultra-High Dose Rates Relevant for FLASH Therapy. *Radiation Research*, 194(4). <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00084.1>
- Ramos-Méndez, J., Perl, J., Schuemann, J., McNamara, A., Paganetti, H., & Faddegon, B. (2018). Monte Carlo simulation of chemistry following radiolysis with TOPAS-nBio. *Physics in Medicine & Biology*, 63(10), 105014. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aac04c>
- Reisz, J. A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., & Furdui, C. M. (2014). Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 260-292. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5489>
- Rezazadeh, A., Thomsen, K., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Fosbøl, P. L. (2021). Solubility and Freezing Points of Disodium Terephthalate in Water–Ethylene Glycol Mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 66(5), 2143-2152. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.1c00052>
- Röntgen, W. (1895). Ueber eine neue Art von Strahlen. Vorläufige Mitteilung. *Aus den Sitzungsberichten der Würzburger Physik.-medic. Gesellschaft Würzburg*, 137-147.
- Röntgen, W. (1896). Ueber eine neue Art von Strahlen. 2. Mitteilung. *Aus den Sitzungsberichten der Würzburger Physik.-medic. Gesellschaft Würzburg*, 11-17.
- Röntgen, W. (1897). Weitere Beobachtungen über die Eigenschaften der X-Strahlen. *Mathematische und Naturwissenschaftliche Mitteilungen aus den Sitzungsberichten der Königlich Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, 392-406.
- Roots, R., Holley, W., Chatterjee, A., Irizarry, M., & Kraft, G. (1990). The formation of strand breaks in DNA after high-LET irradiation : A comparison of data from in vitro and cellular systems. *International Journal of Radiation Biology*, 58(1), 55-69. <https://doi.org/10.1080/09553009014551431>
- Rossi, S. (2022). Hadron Therapy Achievements and Challenges : The CNAO Experience. *Physics*, 4(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/physics4010017>
- Rotblat, J. (2000). Mark Oliphant (1901–2000). *Nature*, 407(6803), Art. 6803. <https://doi.org/10.1038/35035202>
- Roth, O., & LaVerne, J. A. (2011). Effect of pH on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in the Radiolysis of Water. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(5), 700-708. <https://doi.org/10.1021/jp1099927>
- Rutherford, E., & Royds, T. (1908). XXIV. Spectrum of the radium emanation. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 16(92), 313-317. <https://doi.org/10.1080/14786440808636511>
- Samuel, A. H., & Magee, J. L. (1953). Theory of Radiation Chemistry. II. Track Effects in Radiolysis of Water. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6), 1080-1087. <https://doi.org/10.1063/1.1699113>
- Sankaranarayanan, K. (2001). Estimation of the hereditary risks of exposure to ionizing radiation : History, current status, and emerging perspectives. *Health Physics*, 80(4), 363-369. <https://doi.org/10.1097/00004032-200104000-00013>
- Savitzky, Abraham., & Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627-1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>
- Schöneich, C. (2005). Methionine oxidation by reactive oxygen species : Reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1703(2), 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.009>
- Schöneich, C. (2012). Radical-Based Damage of Sulfur-Containing Amino Acid Residues. In C. Chatgililoglu & A. Studer (Éds.), *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials* (p. rad044). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119953678.rad044>
- Schöneich, C., Aced, A., & Asmus, K. D. (1993). Mechanism of oxidation of aliphatic thioethers to sulfoxides by hydroxyl radicals. The importance of molecular oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 115(24), 11376-11383. <https://doi.org/10.1021/ja00077a042>
- Schulz-Ertner, D., Jäkel, O., & Schlegel, W. (2006). Radiation therapy with charged particles. *Seminars in Radiation Oncology*, 16(4), 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2006.04.008>

- Schwarz, H. A., Caffrey, J. M., & Scholes, G. (1959). Radiolysis of Neutral Water by Cyclotron Produced Deuterons and Helium Ions <sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, 81(8), 1801-1809. <https://doi.org/10.1021/ja01517a008>
- Scifoni, E., Surdutovich, E., & Solov'yov, A. V. (2010). Spectra of secondary electrons generated in water by energetic ions. *Physical Review E*, 81(2), 021903. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.81.021903>
- Scuderi, D., Ignasiak, M. T., Serfaty, X., Oliveira, P. de, & Levin, C. H. (2015). Tandem mass spectrometry and infrared spectroscopy as a tool to identify peptide oxidized residues. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(39), 25998-26007. <https://doi.org/10.1039/C5CP03223G>
- Sengupta, D., & Heilshorn, S. C. (2010). Protein-Engineered Biomaterials : Highly Tunable Tissue Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(3), 285-293. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0591>
- Sevilla, M. D., & Bernhard, W. A. (2008). Chapter 13 : Mechanisms of direct radiation damage to DNA. In *Radiation Chemistry : From Basics to Applications in Material and Life Sciences* (Vol. 1, p. 191-202). <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0317-0>
- Shadyro, O., Yurkova, I., Kisel, M., Brede, O., & Arnhold, J. (2004). Formation of phosphatidic acid, ceramide, and diglyceride on radiolysis of lipids : Identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(12), 1612-1624. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.013>
- Sherwood, R. A. (2005). HAEMOGLOBINS (HEMOGLOBINS). In P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Éds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* (p. 223-229). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00248-X>
- Shin, W.-G., Ramos, J., Tran, H., Okada, S., Perrot, Y., Villagrasa, C., & Incerti, S. (2021). Geant4-DNA simulation of the pre-chemical stage of water radiolysis and its impact on initial radiochemical yields. *Physica Medica*, 88, 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2021.05.029>
- Shin, W.-G., Ramos-Mendez, J., Faddegon, B., Tran, H. N., Villagrasa, C., Perrot, Y., Okada, S., Karamitros, M., Emfietzoglou, D., Kyriakou, I., Bordage, M. C., Sakata, D., Guatelli, S., Choi, H. J., Min, C. H., Lee, S. B., & Incerti, S. (2019). Evaluation of the influence of physical and chemical parameters on water radiolysis simulations under MeV electron irradiation using Geant4-DNA. *Journal of Applied Physics*, 126(11), 114301. <https://doi.org/10.1063/1.5107511>
- Shivu, B., Seshadri, S., Li, J., Oberg, K. A., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2013). Distinct  $\beta$ -Sheet Structure in Protein Aggregates Determined by ATR-FTIR Spectroscopy. *Biochemistry*, 52(31), 5176-5183. <https://doi.org/10.1021/bi400625v>
- Shukla, L. I., Pazdro, R., Becker, D., & Sevilla, M. D. (2005). Sugar radicals in DNA : Isolation of neutral radicals in gamma-irradiated DNA by hole and electron scavenging. *Radiation Research*, 163(5), 591-602. <https://doi.org/10.1667/rr3347>
- Silva, N. H. C. S., Vilela, C., Marrucho, I. M., Freire, C. S. R., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2014). Protein-based materials : From sources to innovative sustainable materials for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(24), 3715-3740. <https://doi.org/10.1039/C4TB00168K>
- Sjöberg, B., Foley, S., Cardey, B., Fromm, M., & Enescu, M. (2018). Methionine oxidation by hydrogen peroxide in peptides and proteins : A theoretical and Raman spectroscopy study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 188, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.09.009>
- Skarsgard, L. D. (1998). Radiobiology with heavy charged particles : A historical review. *Physica Medica: PM: An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology: Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 14 Suppl 1, 1-19.
- Smith, M., Pimblott, S. M., & LaVerne, J. A. (2021). Hydroxyl radical yields in the heavy ion radiolysis of water. *Radiation Physics and Chemistry*, 188, 109629. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2021.109629>
- Smith, P. T., Narupai, B., Tsui, J. H., Millik, S. C., Shafranek, R. T., Kim, D.-H., & Nelson, A. (2020). Additive Manufacturing of Bovine Serum Albumin-Based Hydrogels and Bioplastics. *Biomacromolecules*, 21(2), 484-492. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01236>
- Solar, S. (1985). Reaction of OH with phenylalanine in neutral aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry* (1977), 26(1), 103-108. [https://doi.org/10.1016/0146-5724\(85\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0146-5724(85)90039-1)

- Solar, S., Solar, W., & Getoff, N. (1984a). Reactivity of hydroxyl with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(10), 2091-2095. <https://doi.org/10.1021/j150654a030>
- Solar, S., Solar, W., & Getoff, N. (1984b). Resolved multisite OH-attack on aqueous tryptophan studied by pulse radiolysis. *Radiation Physics and Chemistry (1977)*, 23(4), 371-376. [https://doi.org/10.1016/0146-5724\(84\)90123-7](https://doi.org/10.1016/0146-5724(84)90123-7)
- Soltani-Nabipour, J. (s. d.). *MONTE CARLO COMPUTATION OF THE ENERGY DEPOSITED BY HEAVY CHARGED PARTICLES IN SOFT AND HARD TISSUES*. 12.
- Spitz, D. R., Buettner, G. R., Petronek, M. S., St-Aubin, J. J., Flynn, R. T., Waldron, T. J., & Limoli, C. L. (2019). An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiotherapy and Oncology*, 139, 23-27. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.03.028>
- Steenken, S., & Neta, P. (1982). Oxidation of substituted alkyl radicals by hexachloroiridate(2-), hexacyanoferrate(3-), and permanganate ions in aqueous solution. Electron transfer versus chlorine transfer from hexachloroiridate(2-) ion. *Journal of the American Chemical Society*, 104(5), 1244-1248. <https://doi.org/10.1021/ja00369a017>
- Štefanić, I., & LaVerne, J. A. (2002). Temperature Dependence of the Hydrogen Peroxide Production in the  $\gamma$ -Radiolysis of Water. *The Journal of Physical Chemistry A*, 106(2), 447-452. <https://doi.org/10.1021/jp0131830>
- Sun, W. C., Gee, K. R., & Haugland, R. P. (1998). Synthesis of novel fluorinated coumarins : Excellent UV-light excitable fluorescent dyes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8(22), 3107-3110. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(98\)00578-2](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(98)00578-2)
- Sworski, T. J. (1954). Yields of Hydrogen Peroxide in the Decomposition of Water by Cobalt  $\gamma$ -Radiation. I. Effect of Bromide Ion. *Journal of the American Chemical Society*, 76(18), 4687-4692. <https://doi.org/10.1021/ja01647a058>
- Taguchi, M., Hayano, K., Xu, Y., Moriyama, M., Kobayashi, Y., Hiratsuka, H., & Ohno, S.-I. (2001). Yields of tyrosines in the radiolysis of aqueous phenylalanine solutions by energetic heavy ions. *Radiation Physics and Chemistry*, 60(4), 263-268.
- Tessonnier, T., Mein, S., Walsh, D. W. M., Schuhmacher, N., Liew, H., Cee, R., Galonska, M., Scheloske, S., Schömers, C., Weber, U., Brons, S., Debus, J., Haberer, T., Abdollahi, A., Mairani, A., & Dokic, I. (2021). FLASH Dose Rate Helium Ion Beams : First In Vitro Investigations. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics*, 111(4), 1011-1022. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2021.07.1703>
- The History of Radiation*. (s. d.). Consulté 8 janvier 2021, à l'adresse <https://www.mirion.com/learning-center/radiation-safety-basics/the-history-of-radiation>
- Thomas, J. K., & Hart, E. J. (1962). The Radiolysis of Aqueous Solutions at High Intensities. *Radiation Research*, 17(3), 408-418. <https://doi.org/10.2307/3571103>
- Thomas, J. K., Rabani, J., Matheson, M. S., Hart, E. J., & Gordon, S. (1966). Absorption Spectrum of the Hydroxyl Radical. *The Journal of Physical Chemistry*, 70(7), 2409-2410. <https://doi.org/10.1021/j100879a503>
- Thomson, J. J. (1897). XL. Cathode Rays. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 44(269), 293-316. <https://doi.org/10.1080/14786449708621070>
- Tinganelli, W., Weber, U., Puspitasari, A., Simoniello, P., Abdollahi, A., Oppermann, J., Schuy, C., Horst, F., Helm, A., Fournier, C., & Durante, M. (2022). FLASH with carbon ions : Tumor control, normal tissue sparing, and distal metastasis in a mouse osteosarcoma model. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 175, 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2022.05.003>
- Tobias, C. A., Blakely, E. A., Alpen, E. L., Castro, J. R., Ainsworth, E. J., Curtis, S. B., Ngo, F. Q. H., Rodriguez, A., Roots, R. J., Tenford, T., & Yang, T. C. H. (1982). Molecular and cellular radiobiology of heavy ions. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics*, 8(12), 2109-2120. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(82\)90554-5](https://doi.org/10.1016/0360-3016(82)90554-5)



- Tomita, H., Kai, M., Kusama, T., & Ito, A. (1997). Monte Carlo simulation of physicochemical processes of liquid water radiolysis. *Radiation and Environmental Biophysics*, 36(2), 105-116. <https://doi.org/10.1007/s004110050061>
- Tran, H. N., Chappuis, F., Incerti, S., Zein, S. A., Bochud, F., & Desorgher, L. (2022, septembre). *Geant4-DNA modeling of water radiolysis beyond the microsecond: An on-lattice stochastic approach*. Rencontres Rayonnement Radiochimie, Nice.
- Trumbore, C. N., Youngblade, W., & Short, D. R. (1986). Computer modeling studies of the molecular product and ferric ion yields in the radiolysis of water and aqueous solutions with high energy electrons. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 28(4), 349-354. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(86\)90016-0](https://doi.org/10.1016/1359-0197(86)90016-0)
- Uehara, S., Nikjoo, H., & Goodhead, D. T. (1999). Comparison and Assessment of Electron Cross Sections for Monte Carlo Track Structure Codes. *Radiation Research*, 152(2), 202-213. <https://doi.org/10.2307/3580095>
- Uzman, A. (2010). Molecular Cell Biology, Sixth Edition. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38(1), 60-61. <https://doi.org/10.1002/bmb.20373>
- Van de Graaff, R. J., Compton, K. T., & Van Atta, L. C. (1933). The Electrostatic Production of High Voltage for Nuclear Investigations. *Physical Review*, 43(3), 149-157. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.43.149>
- van der Veen, J., Laenen, A., & Nuyts, S. (2017). Modern radiotherapy techniques versus three-dimensional conformal radiotherapy for head and neck cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(12), CD012904. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012904>
- Vandenborre, J., Truche, L., Costagliola, A., Craff, E., Blain, G., Baty, V., Haddad, F., & Fattahi, M. (2021). Carboxylate anion generation in aqueous solution from carbonate radiolysis, a potential route for abiotic organic acid synthesis on Earth and beyond. *Earth and Planetary Science Letters*, 564, 116892. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2021.116892>
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids : Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- van Wickern, B., Simat, T., & Steinhart, H. (1997). HPLC analysis of g-irradiation-induced products of tryptophan in peptides and lysozyme. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205, 446-451.
- Viehe, H. G., Janousek, Z., Merenyi, R., & Stella, L. (1985). The captodative effect. *Accounts of Chemical Research*, 18(5), 148-154. <https://doi.org/10.1021/ar00113a004>
- Von Sonntag, C. (1987). *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis.
- Vozenin, M.-C., Baumann, M., Coppes, R. P., & Bourhis, J. (2019). FLASH radiotherapy International Workshop. *Radiotherapy and Oncology*, 139, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.07.020>
- Vozenin, M.-C., De Fornel, P., Petersson, K., Favaudon, V., Jaccard, M., Germond, J.-F., Petit, B., Burki, M., Ferrand, G., Patin, D., Bouchaab, H., Ozsahin, M., Bochud, F., Bailat, C., Devauchelle, P., & Bourhis, J. (2019). The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-pig and Cat-cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 25(1), 35-42. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3375>
- Vozenin, M.-C., Hendry, J. H., & Limoli, C. L. (2019). Biological Benefits of Ultra-high Dose Rate FLASH Radiotherapy : Sleeping Beauty Awoken. *Clinical Oncology*, 31(7), 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.04.001>
- Vozenin, M.-C., Montay-Gruel, P., Limoli, C., & Germond, J.-F. (2020). All Irradiations that are Ultra-High Dose Rate may not be FLASH : The Critical Importance of Beam Parameter Characterization and In Vivo Validation of the FLASH Effect. *Radiation Research*, 194(6). <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00141.1>
- Wagner, B. A., Buettner, G. R., & Burns, C. P. (1994). Free radical-mediated lipid peroxidation in cells : Oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, 33(15), 4449-4453. <https://doi.org/10.1021/bi00181a003>
- Wang, F., Schmidhammer, U., Larbre, J.-P., Zong, Z., Marignier, J.-L., & Mostafavi, M. (2018). Time-dependent yield of the hydrated electron and the hydroxyl radical in D<sub>2</sub>O : A picosecond pulse radiolysis study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(23), 15671-15679. <https://doi.org/10.1039/C8CP02276C>

- Wasselin-Trupin, V., Baldacchino, G., Bouffard, S., & Hickel, B. (2002). Hydrogen peroxide yields in water radiolysis by high-energy ion beams at constant LET. *Radiation Physics and Chemistry*, 65(1), 53-61. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00682-X](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00682-X)
- Watanabe, K., Matsuda, T., & Sato, Y. (1981). The secondary structure of ovomucoid and its domains as studied by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 667(2), 242-250. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90189-6](https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90189-6)
- Watanabe, R., & Saito, K. (2001). Monte Carlo simulation of water radiolysis in oxygenated condition for monoenergetic electrons from 100eV to 1MeV. *Radiation Physics and Chemistry*, 62(2-3), 217-228. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00195-5)
- Watt, D. E. (2014). *Quantities For Generalized Dosimetry Of Ionizing Radiations in Liquid Water*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482272819>
- Watters, D. (1999). Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and Cell Biology*, 77(3), 263-271. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00824.x>
- Weyrather, W. K., & Kraft, G. (2004). RBE of carbon ions : Experimental data and the strategy of RBE calculation for treatment planning. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 73 Suppl 2, S161-169. [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(04\)80041-0](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(04)80041-0)
- Weyrather, W. K., Ritter, S., Scholz, M., & Kraft, G. (1999). RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *International Journal of Radiation Biology*, 75(11), 1357-1364. <https://doi.org/10.1080/095530099139232>
- Wheeler, O. H., & Montalvo, R. (1969). Radiolysis of Phenylalanine and Tyrosine and Aqueous Solution. *Radiation Research*, 40(1), 1. <https://doi.org/10.2307/3572978>
- White, M., Cohen, J., Hummel, C., Burky, R., Cruz, A., & Farias-Eisner, R. (2014). Chapter 5 - The Role of Oxidative Stress in Ovarian Cancer : Implications for the Treatment of Patients. In V. Preedy (Éd.), *Cancer* (p. 41-50). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405205-5.00005-2>
- Wilson, E. J. N. (2001). History of accelerators. In E. Wilson (Éd.), *An Introduction to Particle Accelerators* (p. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198508298.003.0001>
- Wilson, R. R. (1946). Radiological Use of Fast Protons. *Radiology*, 47(5), 487-491. <https://doi.org/10.1148/47.5.487>
- Windsor, W. T., Syto, R., Tsarbopoulos, A., Zhang, R., Durkin, J., Baldwin, S., Paliwal, S., Mui, P. W., Pramanik, B., & Trotta, P. P. (1993). Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry*, 32(34), 8807-8815. <https://doi.org/10.1021/bi00085a011>
- Winterbourn, C. C. (2013). Chapter One—The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. In E. Cadenas & L. Packer (Éds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 528, p. 3-25). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>
- Wojdyr, M. (2010). *Fityk* : A general-purpose peak fitting program. *Journal of Applied Crystallography*, 43(5), 1126-1128. <https://doi.org/10.1107/S0021889810030499>
- Wood, G. P. F., Sreedhara, A., Moore, J. M., Wang, J., & Trout, B. L. (2016). Mechanistic Insights into Radical-Mediated Oxidation of Tryptophan from ab Initio Quantum Chemistry Calculations and QM/MM Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry A*, 120(18), 2926-2939. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02429>
- Xu, G., & Chance, M. R. (2005). Radiolytic Modification of Sulfur-Containing Amino Acid Residues in Model Peptides : Fundamental Studies for Protein Footprinting. *Analytical Chemistry*, 77(8), 2437-2449. <https://doi.org/10.1021/ac0484629>
- Yamashita, S., Baldacchino, G., Maeyama, T., Taguchi, M., Muroya, Y., Lin, M., Kimura, A., Murakami, T., & Katsumura, Y. (2012). Mechanism of radiation-induced reactions in aqueous solution of coumarin-3-carboxylic acid : Effects of concentration, gas and additive on fluorescent product yield. *Free Radical Research*, 46(7), 861-871. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.684879>
- Yamashita, S., Katsumura, Y., Lin, M., Muroya, Y., Maeyama, T., & Murakami, T. (2008). Water radiolysis with heavy ions of energies up to 28GeV—2 : Extension of primary yield measurements to very high LET values. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(10-12), 1224-1229. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2008.05.037>

- Yamashita, S., Katsumura, Y., Lin, M., Muroya, Y., Miyazaki, T., & Murakami, T. (2008a). Water radiolysis with heavy ions of energies up to 28GeV. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(4), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.07.005>
- Yamashita, S., Katsumura, Y., Lin, M., Muroya, Y., Miyazaki, T., & Murakami, T. (2008b). Water radiolysis with heavy ions of energies up to 28GeV. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(4), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.07.005>
- Yamashita, S., Katsumura, Y., Lin, M., Muroya, Y., Miyazaki, T., Murakami, T., Meesungnoen, J., & Jay-Gerin, J.-P. (2008). Water Radiolysis with Heavy Ions of Energies up to 28 GeV. 3. Measurement of  $G(MV^+)$  in Deaerated Methyl Viologen Solutions Containing Various Concentrations of Sodium Formate and Monte Carlo Simulation. *Radiation Research*, 170(4), 521-533. <https://doi.org/10.1667/RR1203.1>
- Yamashita, S., Taguchi, M., Baldacchino, G., & Katsumura, Y. (2010). 13 Radiation Chemistry of Liquid Water with Heavy Ions : Steady-State and Pulse Radiolysis Studies. *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*, 31.
- Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., & Yu, S. (2015). Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nature Protocols*, 10(3), 382-396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
- Ying, C. K., Bolst, D., Tran, L. T., Guatelli, S., Rosenfeld, A. B., & Kamil, W. A. (2017). Contributions of secondary fragmentation by carbon ion beams in water phantom : Monte Carlo simulation. *Journal of Physics: Conference Series*, 851(1), 012033. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/851/1/012033>
- Yoshida, H., Bolch, W. E., Jacobson, K. B., & Turner, J. E. (1990). Measurement of Free Ammonia Produced by X Irradiation of Glycylglycine in Aqueous Solution. *Radiation Research*, 121(3), 257. <https://doi.org/10.2307/3577774>
- Zehavi, D., & Rabani, J. (1972). Oxidation of aqueous bromide ions by hydroxyl radicals. Pulse radiolytic investigation. *The Journal of Physical Chemistry*, 76(3), 312-319. <https://doi.org/10.1021/j100647a006>
- Zeitlin, C., & La Tessa, C. (2016). The Role of Nuclear Fragmentation in Particle Therapy and Space Radiation Protection. *Frontiers in Oncology*, 6, 65. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00065>
- Zeng, H.-L., Li, H., Lu, J., Guan, Q., & Cheng, L. (2019). Assessment of 12 Metals and Metalloids in Blood of General Populations Living in Wuhan of China by ICP-MS. *Biological Trace Element Research*, 189(2), 344-353. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1486-8>
- 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), 1818-1823. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2010.02.091>



---

## **Annexes**

---

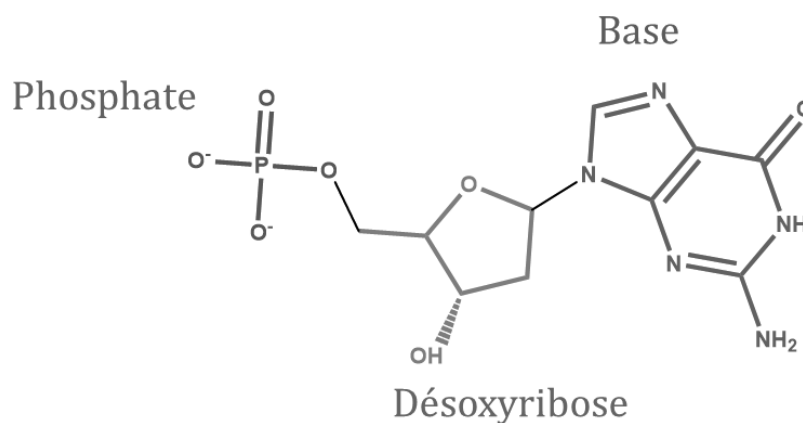
## Annexe 1 : Interactions avec le vivant : l'ADN

L'ADN (Acide Désoxyribonucléique) est une biomolécule située dans le noyau des cellules et responsable de l'information génétique et de sa transmission lors de la mitose. Structuré sous forme de chromatine lorsqu'il est lié aux protéines histones, les dommages sur cet objet seront ainsi responsables de la mort cellulaire ou des mutations induites par les irradiations (Von Sonntag, 1987). Bien qu'il ne représente que 0.3 % de la masse d'une cellule (Uzman, 2010), il est une des cibles les plus sensibles des dommages provenant de radiations.

### 1/ Structure de l'ADN

#### *De la base au nucléotide*

La structure de base de l'ADN autour de laquelle il se construit se nomme le nucléotide. Ce dernier est lui-même subdivisé en trois sous unités. Il se compose ainsi systématiquement d'une unité phosphate, d'un sucre (ici le D-désoxyribose) et d'une base azotée (Figure A- 1



*Figure A- 1 Structure d'un nucléoside composé de son unité phosphate, désoxyribose et de sa base azotée (ici une guanine)*

Ces bases azotées sont au nombre de quatre et sont classées en deux groupes. Les deux premières bases, les plus complexes, sont l'Adénine (A) et la Guanine (G) qui font partie de la famille chimique des purines. Les deux autres bases sont des Pyrimidines, la Cytosine (C) et la Thymine (T) (Figure A- 2).

L'ADN est ainsi un long monomère d'unités nucléotides liées entre elles par leurs unités phosphate et désoxyribose : l'unité phosphate d'un nucléotide sera lié au sucre de l'unité suivante et ainsi de suite. Ce long biopolymère sera un des deux brins constituant l'ADN.

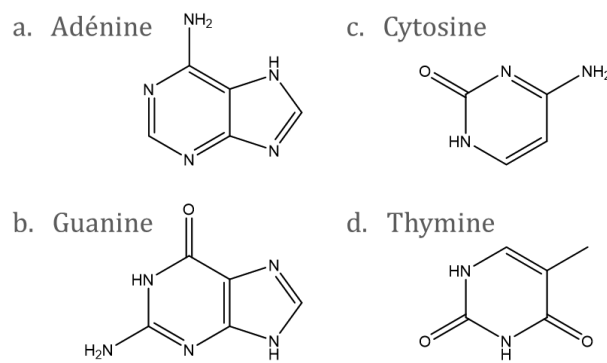


Figure A-2 Les 4 bases possibles de l'ADN

### La double hélice

Au-delà de son enchaînement de nucléotide formant un long biopolymère, l'ADN se structure sous une forme de double-hélice, constitué de deux brins enroulés l'un autour de l'autre.

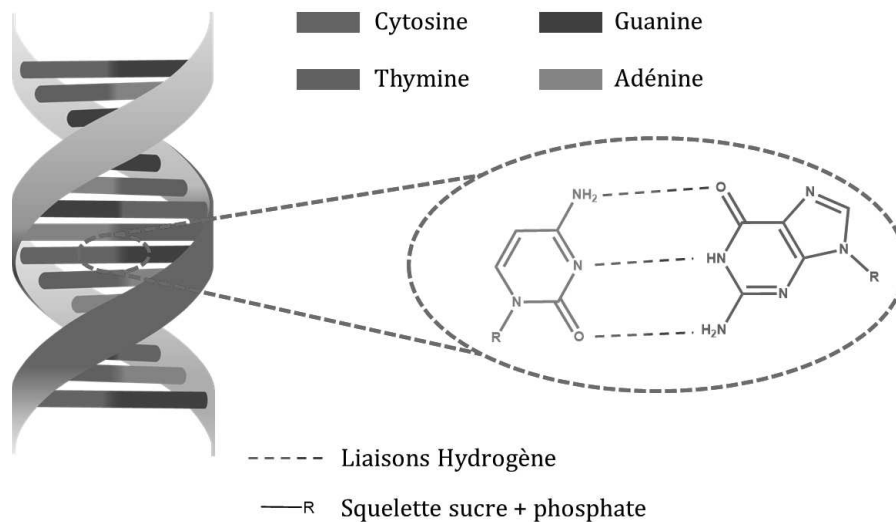


Figure A-3 Double brin d'ADN rattachés entre eux par des paires de bases (pdb) A-T ou C-G.

Les deux brins sont liés entre eux par des liaisons hydrogène entre une base de type purine et une base de type pyrimidine, avec toujours les mêmes paires qui se forment. Ainsi, on retrouvera toujours les paires Adénine-Thymine et Cytosine-Guanine.

La paire A-T est connectée par trois liaisons H tandis que la paire C-G l'est par deux liaisons. Le diamètre de la double hélice est ainsi constant (Figure A- 3).

En raison de la quantité massive d'information génétique codée dans l'ADN, ce dernier est une macromolécule particulièrement longue, de taille estimée à près de 2m, et linéaire dans le cas des organismes eucaryotes. Cette double hélice adopte ainsi une structure spatiale ordonnée et compactée : la chromatine.

## Chromatine et chromosomes

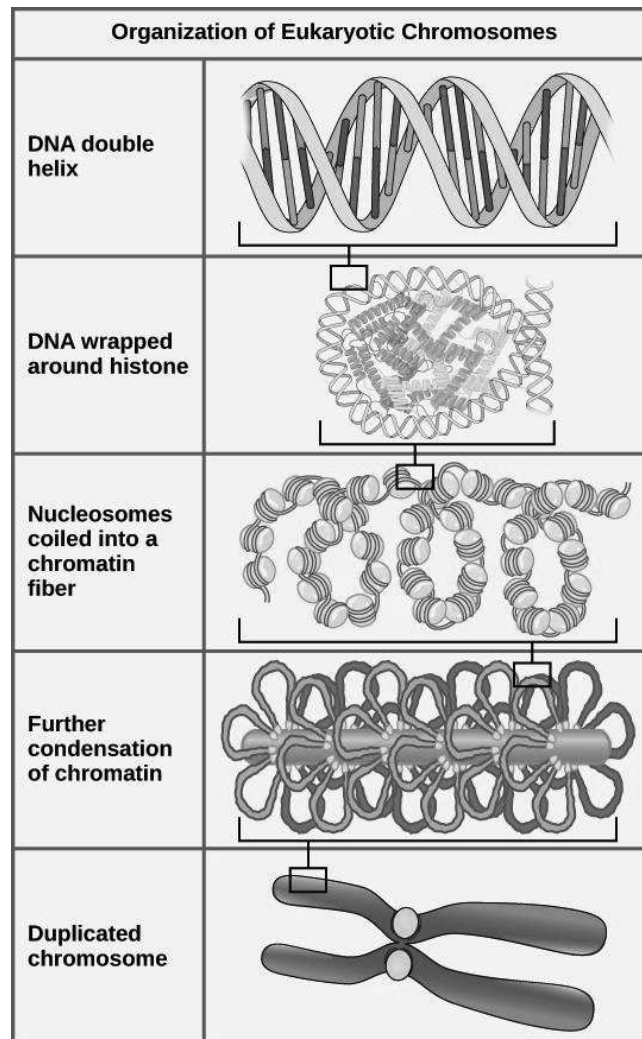


Figure A- 4 Evolution à différentes échelles de la structuration et de la compaction de l'ADN (Molnar & Gair, 2015)

Afin de se structurer spatialement et de façon ordonnée, l'ADN est capable de s'enrouler autour d'une famille de protéines spécifique : les Histones, formant ainsi une suite de structures appelées nucléosomes. Ces nucléosomes eux-mêmes se compactent les uns contre les autres pour former une structure dense appelée chromatine.

Cette structure peut alors se compacter encore plus lors de la métaphase de la mitose sous forme de chromosome (Figure A- 4). En plus des Histones, d'autres protéines peuvent s'associer à l'ADN lors de la structuration en chromosome, ce sont des « protéines d'échafaudage » (« scaffold proteins »).

La structure de l'ADN est ainsi incroyablement complexe, et la moindre attaque chimique provenant des irradiations pourrait complètement perturber tout le processus de structuration de l'ADN.



## 2/ Dommages sur l'ADN

Les proportions effets indirects/directs sur l'ADN sont grandement discutées. Avec des rayons  $\gamma$ , il a été estimé que 50 % des dommages sur l'ADN seraient dû aux effets indirects provenant de la radiolyse de l'eau. Les 50 % restants sont donc attribués aux effets directs. Cependant, des effets dits « quasi-direts » sont ici considérés dans cette catégorie, correspondant à des ionisations de l'eau de la sphère de solvatation de l'ADN, la proportion d'effets « purement directs » n'est pas précisément déterminée (Sevilla & Bernhard, 2008). La proportion élevée de dommages directs provient de la structuration de l'ADN sous forme de chromatine, limitant donc la présence de molécules d'eau proche de l'ADN (Bernhard & Close, 2003).

La particularité des dommages issus des rayonnements ionisants provient du fait que ces derniers ne sont pas organisés de façon homogène partout sur l'ADN et peuvent parfois être localisés dans des clusters, rendant ainsi particulièrement difficile leur réparation par les processus prévus à cet effet (Cadet *et al.*, 1997).

### Dommages sur les bases

L'espèce la plus réactive avec les nucléotides est le radical hydroxyle,  $\text{HO}\cdot$ , que ce soit avec le désoxyribose ou les bases azotés. Ses constantes de vitesses de réaction avec les quatre bases sont des constantes de réactions dites « limitées par la diffusion ». Il réagit majoritairement avec les doubles liaisons des bases donnant dans un premier temps une hydroxylation qui pourra évoluer vers d'autres produits selon la nature de la base.

Sur les bases de type purine, G et A, les produits finaux pourront résulter en une ouverture de cycle ou en la formation d'un formamide en position C8, lieu de l'attaque du radical  $\text{HO}\cdot$  (Figure A- 5). Dans le cas des bases pyrimidines,  $\text{HO}\cdot$  mène à la formation d'un radical peroxy puis à un produit doublement hydroxylé. Le radical hydroxyle peut également arracher un proton à la fonction méthyle, menant à terme à la formation d'alcools et d'aldéhydes.

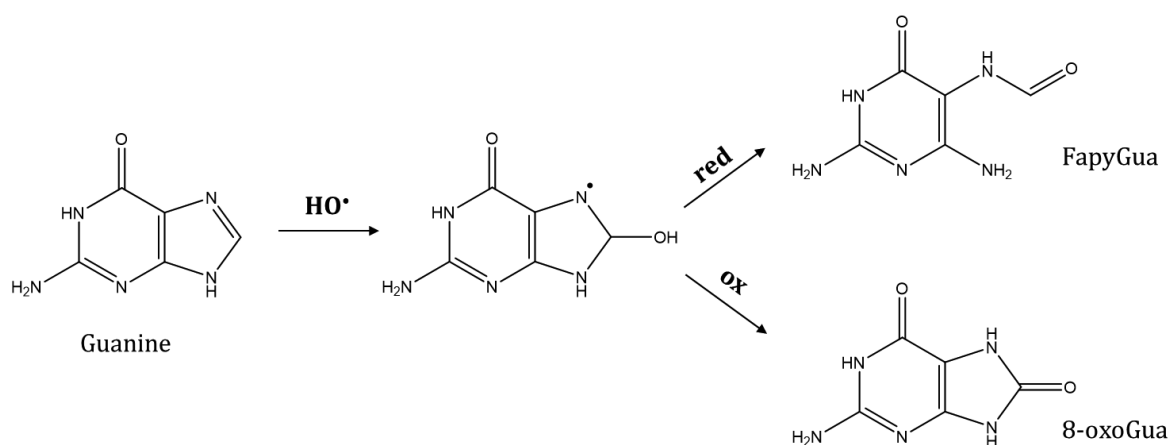


Figure A- 5 Action du radical hydroxyle sur une purine avec l'exemple de la guanine

Les dégâts directs sur la molécule d'ADN sont, dans approximativement 90% des cas, des ionisations, comme dans le cas des molécules d'eau (Uehara *et al.*, 1999). Il a été montré que les cations ainsi formés sur les bases menaient au final, suite à une hydrolyse ou à une déprotonation, que les produits formés sont identiques à ceux provenant d'attaques du radical hydroxyle.

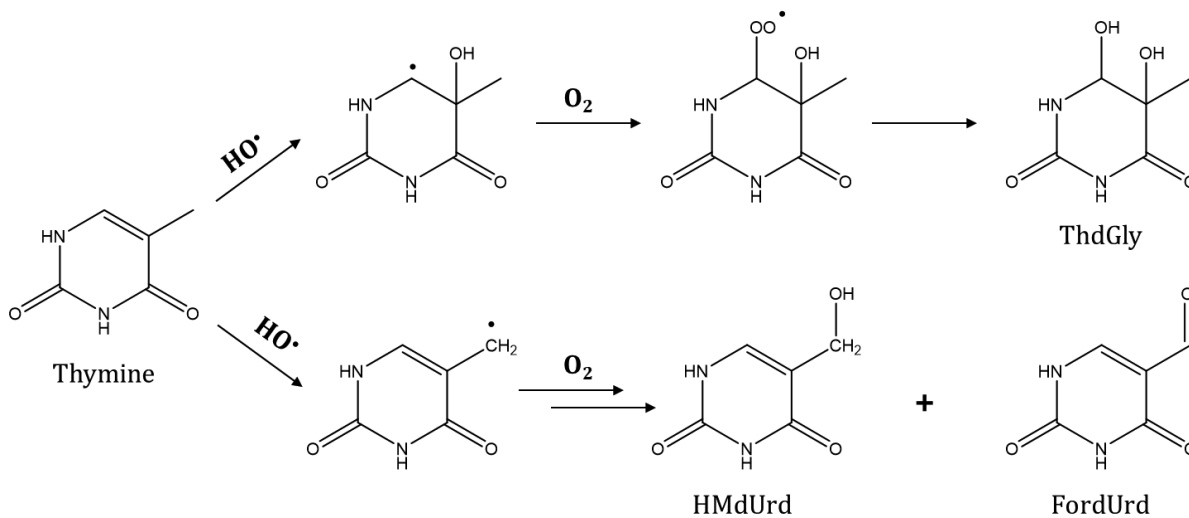


Figure A- 6 Action du radical hydroxyle sur une pyrimidine avec l'exemple de la thymine

Le système de l'ADN est d'autant plus complexe que des transferts de charges sont possibles, avec des constantes de vitesse allant de l'ordre de  $10^5$  à  $10^7$  s<sup>-1</sup> selon la base donneuse et la base accepteuse (Berlin & Siebbeles, 2008).

Les dommages peuvent cependant également être causés sur les unités désoxyribose des nucléotides. Techniquement, 50% des effets sont situés sur le squelette phosphate/sucre, mais une grande partie de ces attaques seraient transférées sur les bases pyrimidines par mécanisme de transfert de charge ou de radicaux ; laissant ainsi 10% seulement de radicaux formés sur les sucres (Shukla *et al.*, 2005) sous irradiations par des photons.

La proportion de dommages sur les bases/sucres sont toutefois dépendantes du TEL, avec une augmentation des dommages situés sur les sucres avec le TEL (Becker *et al.*, 1996). De plus, le rendement de radicaux témoins d'une rupture immédiate de liaison augmente avec le TEL, suggérant une augmentation en proportions des effets directs. Les dommages ainsi situés sur les bases ou sucres, que ce soit par effets directs ou indirects, pourront mener à des ruptures du ou des brins d'ADN, créant ainsi des dommages structurels importants (Pogozelski & Tullius, 1998).

#### Dommmages structurels de l'ADN

Deux types de ruptures des brins d'ADN peuvent être distinguées : les ruptures simple brin (SSB, Single Strand Break) ou les ruptures doubles brins (DSB, Double-Strand Break). Tandis que le premier type peut être efficacement réparé au sein des cellules, comme il est possible d'utiliser le second brin comme modèle, le second est plus délicat et est considéré comme la lésion de l'ADN la plus mortelle. De plus, les rayonnements ionisants pouvant créer des clusters de lésions, il sera d'autant plus difficile de les réparer efficacement et correctement.

Une des conséquences de ces ruptures peut être la mort cellulaire si trop de lésions sont non réparées. Les mécanismes de réparation seront toutefois déclenchés la majorité du temps, mais pourront mener à des erreurs dans la réparation, recréant ainsi les mauvais nucléotides et modifiant l'information génétique contenue par l'ADN, menant donc à des mutations. Ces ruptures pourront aussi mener à des aberrations chromosomiques.

Le TEL impactant fortement la densité de lésions produits, et ce pour les deux effets, les ruptures double brins seront formées en proportions plus importantes à mesure que le TEL augmente. Cependant, il a été observé que le nombre total de lésions diminue avec l'augmentation du TEL (Roots *et al.*, 1990). Cela témoigne de l'importance des effets indirects sur les dommages observés sur l'ADN, car une augmentation du dépôt d'énergie entraîne une augmentation des recombinaisons radicalaires à temps courts et donc une diminution de la quantité d'espèces disponibles pour réagir avec l'ADN (Douki *et al.*, 2006).

L'ADN est ainsi la clé de voûte de la cellule et les dégâts situés sur cette biomolécule sont cruciaux dans le devenir d'une cellule. Cependant, il a été démontré par l'utilisation de *microbeams* qu'une irradiation spécifique du cytoplasme engendre des dommages sur l'ADN, suggérant que des dommages sur d'autres biomolécules produisent au final des dommages sur l'ADN dans le noyau et ainsi la mort cellulaire ou des mutations (Wu *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2009). Un candidat est l'ARN, mais de par sa ressemblance avec l'ADN les effets sur celui-ci ne seront pas discutés car similaires ;

## Annexe 2 Interactions avec le vivant : les lipides

Les lipides représentent approximativement 10% de la masse des cellules et sont majoritairement situés dans les différentes membranes de la cellule. Bien que les dommages à l'ADN ont été longtemps considérés comme seuls responsables de la mort cellulaire, il est désormais prouvé que les membranes, et donc les lipides qui les constituent, sont aussi des cibles critiques des rayonnements ionisants (Benderitter *et al.*, 2003),

### 1/ Structures des lipides

Les lipides trouvables dans nos cellules peuvent être classés en trois familles. La première, la plus simple, est celle des acides gras, constitués d'une fonction acide carboxylique et d'une longue chaîne carbonée pouvant contenir des insaturations sous la forme de doubles-liaisons. La seconde est celle des sphingolipides, constitués d'une sphingosine (Figure A- 7b.) et d'une chaîne carbonée d'acide gras. Les derniers sont les phospholipides, caractérisés par la présence d'un groupement phosphate rattaché à deux chaînes carbonées minimum. Un lipide peut alors être à la fois un sphingolipide et un phospholipide. Dans tous les cas, ils sont constitués d'une tête polaire hydrophile et d'une (ou plusieurs) chaîne carbonée hydrophobe.

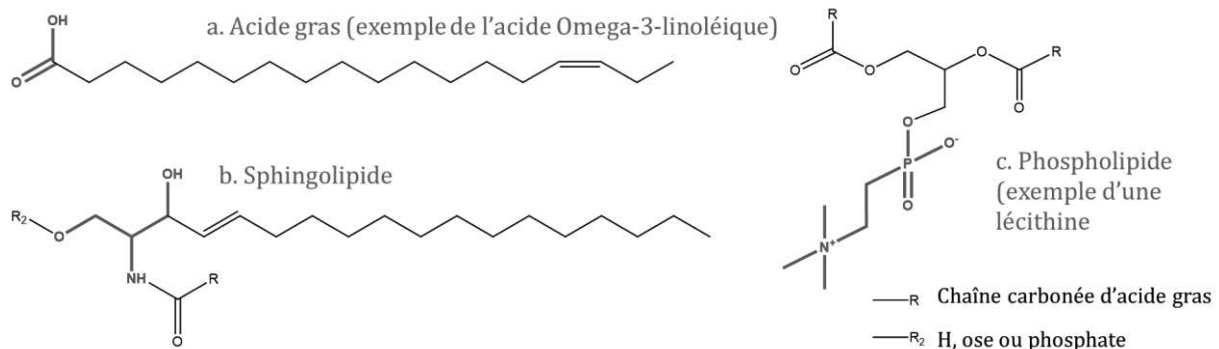


Figure A- 7 Représentations des différents types de lipides présents dans une cellule

Les lipides se trouvent principalement dans les membranes, dont ils sont les principaux constituants, au-delà de 50% (van Meer *et al.*, 2008). Les phospholipides sont par ailleurs les lipides les plus représentés, soit 70% des lipides présents dans les membranes (Cooper, 2000).

Au-delà de leur structure moléculaire, ils adoptent une organisation spatiale fortement influencée par leur polarité. Les lipides mono-chaîne, les acides gras libres, s'organiseront ainsi sous forme de micelle en milieu aqueux, donc dans les cellules. Les lipides poly-chaînes s'organiseront eux sous forme de bicouches, qui pourront s'organiser pour former une vésicule<sup>10</sup> appelé liposome contenant un milieu aqueux à l'intérieur pour remplir leur fonction (Figure A- 8).

<sup>10</sup> Organite permettant de stocker, transporter ou digérer des produits / déchets cellulaires

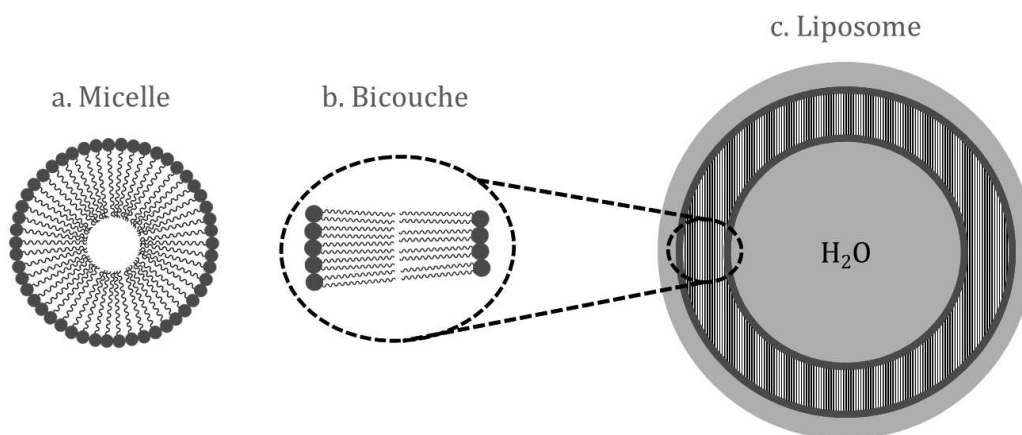


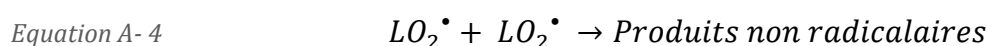
Figure A- 8 Structure adoptée par les différents lipides en milieu aqueux et donc dans les cellules, d'après GARDES-ALBERT, 2008

Les membranes lipidiques peuvent être complexes, adoptant des structures d'organisation supérieure avec protéines, on parle alors de complexes lipido-protéiques. Elles ne sont pas seulement les limites des cellules, ce sont elles qui gèrent la transmission de signaux intra et extra-cellulaires (Albanese & Dainiak, 2003). La structure de ces lipides pourra donc être modifiée sous irradiation, menant à des conséquences importantes sur les fonctions des membranes.

## 2/ Dégâts observés sur les lipides et leurs conséquences

Bien que les proportions exactes soient discutées, il semblerait que la majorité des dégâts proviennent des effets indirects et surtout du radical  $\text{HO}^\bullet$ . Toutefois, celles-ci dépendent du système étudié et notamment l'influence du TEL sur ces proportions n'est pas encore élucidée (Gardes-Albert, 2008). La grande majorité des altérations moléculaires observées sur les lipides sont des peroxydations. Ces dernières sont initiées par l'abstraction d'un atome d'hydrogène par  $\text{HO}^\bullet$  (Equation 1-45, LH représentant un lipide) et le radical ainsi formé pourra réagir avec l'oxygène pour produire un radical peroxy.

Les abstraction sont favorisées lorsque l'hydrogène se trouve entre deux doubles liaisons (Wagner *et al.*, 1994). Le radical peroxy pourra alors réagir avec un autre lipide pour former le peroxyde et un autre radical  $\text{L}^\bullet$ . Cette étape montre à quel point l'action du radical peut être importante : un nouveau radical se forme, pouvant alors continuer les réactions ce qui en fait un processus de réactions en chaîne. La propagation se fait très efficacement, les lipides étant organisés et localement très concentrés. La terminaison du processus de réaction en chaîne se fait par une recombinaison radicalaire formant alors des produits non radicalaires (Equation A- 1 à A-5).



Toutefois, l'oxydation causée par le radical hydroxyle peut aussi mener à une fragmentation des chaînes lipidiques (Shadyro *et al.*, 2004). Avec les peroxydations, ces dommages auront pour effet de modifier l'aspect et les propriétés des membranes, comme la viscosité, la rigidité et surtout la perméabilité. Ces propriétés modifiées causeront ainsi une modification de l'état physique des membranes et donc leur capacité à protéger/délimiter les cellules ainsi que leur gestion des signaux cellulaires (Benderitter *et al.*, 2003). Cette modification est donc très certainement une des raisons des apoptoses déclenchées sans dégâts sur l'ADN, et pourrait même jouer un rôle dans **l'effet Bystander**. De plus, la présence importante de peroxydes de lipides augmente le stress oxydatif au sein des cellules et peut déclencher l'apoptose (Reisz *et al.*, 2014).

La structure complexe des lipides avec des protéines, omniprésentes dans les cellules, laisse potentiellement suggérer un impact de ces dernières sur les dommages causés aux membranes. Leur omniprésence, leur mobilité et leurs rôles variés dans les cellules en fait également des candidates majeures pour expliquer les dommages causés à l'ADN et les morts cellulaires observés lors d'irradiations cytoplasmiques.

## Annexe 3 : Le projet ProBioTion : Vers l'élaboration de films de protéines autoportés sous irradiation

### Etat de l'art et contexte de l'étude

Une importante application de la radiolyse de biomolécules protéiques est le Footprinting, l'étude de la structure et de la dynamique moléculaire des protéines grâce aux hydroxylations causées par le radical hydroxyle. Les analyses sont généralement réalisées par spectrométrie de masse et permettent d'étudier l'évolution structurale des protéines avec une résolution temporelle allant de la milliseconde à la seconde (Kiselar & Chance, 2010). Les oxydations peuvent être repérées sur les structures grâce à des variations de masse facilement reconnaissables, comme les oxydations de la cystéine en acide sulfonique de cystéine (+48 Da), de méthionine en sulfoxyde de méthionine (+16) ou encore des hydroxylations d'acides aminés aromatiques (+16 Da) (Xu & Chance, 2005). Ces méthodes permettent de visualiser la structure notamment en déterminant les portions de structure primaire accessibles au solvant (W. Huang et al., 2015)

Toutefois, le type d'application qui nous intéressera ici est **l'utilisation des rayonnements ionisants pour (i) produire des biomatériaux (fonctionnalisés ou non) à base de protéines et (ii) greffer des protéines à la surface de polymères pétro-sourcés, afin de conférer au matériau des propriétés particulières et d'en faire un matériau actif.**

Les protéines sont des matériaux fonctionnels par excellence, car elles remplissent déjà de nombreuses fonctions dans le corps et pas uniquement au sein des cellules. Le collagène en est un parfait exemple, il est le principal constituant des matrices extracellulaires en ajoutant une importante résistance mécanique aux tissus (Meyers *et al.*, 2011).

Les protéines sont des macromolécules, pour certaines de haut poids moléculaire, dont la structure est assurée et maintenue par des liaisons hydrogène, hydrophobes et par des interactions électrostatiques. En plus de garantir la structure moléculaire des protéines, ces liaisons permettent une structuration intermoléculaire importante. Ainsi, cela donne aux protéines une forte propension à former, par réticulation, des films plus ou moins solides. Elles semblent alors représenter d'excellentes candidates pour la formation de biomatériaux fonctionnels, en remplacement de plastiques pétro-sourcés. Les possibilités sont nombreuses, de par leur très grande variété et leur diversité structurale.

Les biomatériaux à base de protéines promettent des propriétés uniques en termes de biodégradabilité et de biocompatibilité. Les applications de ce type de matériaux sont ainsi variées et peuvent concerner les secteurs agroalimentaires avec des applications pour les emballages (Calva-Estrada *et al.*, 2019). Un autre domaine d'intérêt pour de tels matériaux est le secteur médical.

Ces matériaux biocompatibles à base de protéines sont envisagés pour l'administration de médicaments, la réalisation de biocapteurs pouvant être placés *in vivo* (Silva *et al.*, 2014) ou encore en tant que matrices supports pour la régénération des tissus (Sengupta & Heilshorn, 2010).

Les films autoportants à base de biomolécules sont essentiellement produits par extrusion à chaud, par la technique de coulée avec un solvant, combinée à l'ajout d'un agent plastifiant, tel le glycérol, ou d'un agent réticulant ou encore par voie enzymatique. On peut ainsi citer la formation de matériaux polymères à base de caséine, une protéine peu coûteuse provenant du lait (Chevalier *et al.*, 2018), par la méthode de coulée.

La BSA (Bovine Serum Albumin) est une protéine particulièrement intéressante, car elle est disponible en abondance, financièrement abordable et non toxique. Elle a déjà été utilisée dans diverses études menant à la formation d'hydrogels biocompatibles et dont la caractérisation est grandement simplifiée par les propriétés spectroscopiques bien connues de la BSA. Différentes voies de synthèse (chimiques ou physiques) ont été mises en œuvre et démontrées comme fonctionnelles, mais elles ne sont cependant pas exemptes de défauts. En effet, ces différentes méthodes impliquent l'utilisation d'agents réticulant (*crosslinkers*), la modification de la protéine afin de faciliter la formation de gel, ou encore sa dénaturation<sup>11</sup> par méthode thermique. Ainsi, la protéine se trouve altérée ou dénaturée, ce qui peut modifier ses propriétés, voire réduire sa biocompatibilité du fait de l'ajout d'additifs.

P. T. Smith *et al.*, 2020 ont développé des résines à base de BSA méthacrylate pour impression 3D. La résine obtenue possédait des propriétés mécaniques proches de celles de résines habituellement utilisées dans ce domaine et a permis d'obtenir des objets de résolution similaire. Pour ce faire, les résines de BSA ont été obtenues par photopolymérisation, mais l'ajout de polyéthylène glycol diacrylate (PEG-DA) s'est avéré nécessaire pour obtenir un matériau avec les propriétés souhaitées. Baler *et al.*, 2014 ont utilisé un procédé thermique pour la formation de tels biomatériaux à base de BSA. En se plaçant sous la température de dénaturation, ils ont réussi à empêcher la dénaturation totale de la protéine. Ils ont toutefois dû se placer en milieu acide, menant malgré tout à une perte partielle de la structure de la protéine.

La préparation de films à base de protéines par traitement par rayonnements ionisants (faisceaux d'électrons, rayons X ou ions accélérés) constitue une alternative intéressante aux méthodes « traditionnelles ».

Généralement moins chère que les traitements enzymatiques, l'irradiation par faisceaux d'électrons ou rayons X ne laisse pas de résidus à l'inverse des traitements chimiques et peut être utilisée pour la formation de films ou en post traitement. La quantité de modifications induites dans le matériau est directement contrôlée par la dose d'irradiation et le traitement peut également permettre la stérilisation du produit.

(Brault *et al.*, 2007) ont cherché à mettre au point un film protéique biodégradable formé à partir d'un sel de caséine en induisant le processus de polymérisation par irradiation gamma. Il s'est avéré que l'ajout d'agent plastifiant (glycérol) était indispensable afin de produire un film souple et peu friable.

---

<sup>11</sup> Perte de structure de la protéine.



Une étude menée par (Lacroix *et al.*, 2002) (Ouattara *et al.*, 2002). a montré que l'irradiation par des rayonnements gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) permettait d'améliorer les propriétés mécaniques et la perméabilité à la vapeur d'eau de films pré-formés à base de caséinate de calcium, de glycerol et d'extrait de petit lait. L'irradiation n'est pas sans conséquence pour la structure des protéines. Sous irradiation, celles-ci adoptent une structure plus ordonnée et plus stable. Ainsi, la gélification a pu être reliée à une augmentation des proportions des structures  $\beta$  sous irradiation dans une étude par FTIR sur les films à base de caséine (Cieśla *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont par la suite été obtenus sur d'autres protéines, comme la gélatine de poissons (Benbettaïeb *et al.*, 2016) ou le gluten (S. L. Lee *et al.*, 2005). La conformation des protéines change alors, notamment par réticulation entre les différentes macromolécules.

Dans le cadre du projet « ProbiotioN », nous nous sommes fixés comme premier objectif de contribuer au **développement de films biosourcés et potentiellement biodégradables, à base de BSA, par l'intermédiaire des techniques d'irradiations.**

Assurer le greffage, par irradiation, d'une protéine à la surface d'un polymère pétro-sourcé est également une piste très intéressante pour la création de matériaux fonctionnalisés.

Les films thermoplastiques ou élastomères ne disposent que de peu de fonctions réactives en surface. Un greffage chimique d'une protéine à leur surface par le biais d'agents de couplage est donc extrêmement difficile, et nécessite de recourir à une étape préalable de traitement de surface (physique ou chimique) : chlorination, traitement plasma, UV/ozone ou encore polymérisation plasma. Le second objectif du projet « ProbiotioN » est **d'évaluer l'efficacité du procédé de radiolyse pour greffer, en une seule étape, une protéine en surface de films thermoplastiques ou élastomères tout en conservant une bonne rétention de l'activité biologique.** Pour ce second axe du projet, la protéine choisie est le Lysozyme (LSZ). Cette protéine possède en effet une activité enzymatique importante envers la bactérie *Micrococcus lysodeikticus* qui pourra être testée pour vérifier la fonctionnalisation de la surface et le maintien de l'activité enzymatique (Hall *et al.*, 2014).

Le projet ProBioTion est un projet collaboratif impliquant différentes équipes de l'IPHC, de l'IS2M (Institut de Science des Matériaux de Mulhouse) et de Aerial-CRT. Il s'agit d'un projet financé par l'ITI HiFunMat (Hierarchical & Functional Materials for health, environment & energy). La liste des personnes impliquées est disponible en *Annexe 15* et les deux axes du projet sont résumés dans la *Figure A- 9*.

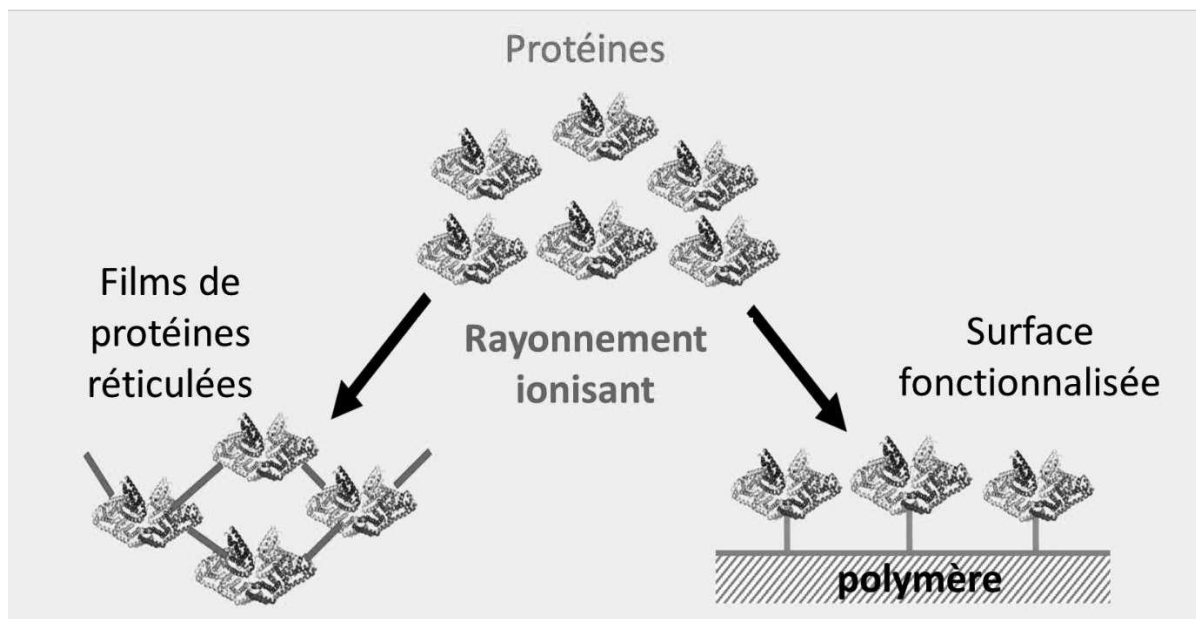


Figure A- 9 Schéma récapitulatif des deux axes du projet ProBioT'ion

## Présentation des expériences

Les deux protéines (Lysozyme et BSA) proviennent de Sigma-Aldrich et ont été utilisées sans purification préalable. Avant toute utilisation, les solutions aqueuses de ces deux protéines (à 25 % en masse) ont été systématiquement centrifugées à 9000 rpm pendant 15 minutes pour éliminer d'éventuels agrégats et impuretés.

Toutes les irradiations ont été réalisées sur la plateforme FeeriX d'Aerial-CRT avec des électrons de 10 MeV en conditions aérées à l'air libre.

### *Préparation des gels autoportants et analyses associées*

Les solutions concentrées ont été irradiées pour former des gels dans différentes conditions, selon les caractérisations requises.

#### Mesure du taux de gel et du taux de gonflement

Les taux de gel et taux de gonflement ont été déterminés par mesures gravimétriques en suivant le protocole suivant :

Pour chaque dose, 1.2 mL de solution de protéine ont été placés dans une boîte de pétri. Après irradiation, la solution concentrée ou le gel (selon la dose appliqué) est pesé ( $m_{init}$ ) puis placé dans une cage de maille 125  $\mu\text{m}$  et immergé dans un volume d'eau important. Les gels gonflent, jusqu'à atteindre un maximum au bout de 48h. Ce temps atteint, l'excès d'eau non liée a été retirée par centrifugation (9000 tr/min, 15 min). Les gels ont été pesés (masse notée  $m_{gonf}$ ), séchés, et à nouveau pesés ( $m_{final}$ ).

$$\text{Equation A- 6} \quad \text{Gonflement} = m_{\text{gonf}} / m_{\text{finale}}$$

$$\text{Equation A- 7} \quad \text{Taux de gel} = m_{\text{finale}} / m_{\text{init}}$$

L'Equation A- 6 permet d'obtenir le gonflement, c'est-à-dire la masse d'eau que peut piéger le gel par rapport à sa masse lorsqu'il est sec. L'Equation A- 7 permet d'obtenir le taux de gel (proportion de produit retenu par la maille de 125µm).

#### Mesure du taux de protéines insolubles

Pour déterminer le taux de protéines insolubles (analyses par HPLC), les gels ont été préparés en irradiant des volumes plus petits (100 µL) placés dans des tubes eppendorf.

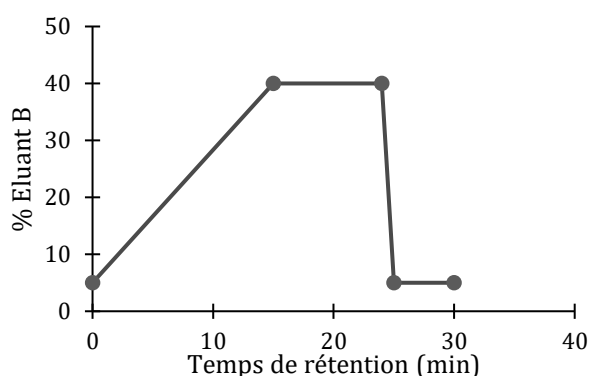
Les matériaux obtenus ont été immergés dans 20 mL d'eau pendant une nuit, sous agitation. Le surnageant a ensuite été centrifugé durant 15 minutes à 9000 rpm, ce qui correspond à un seuil de coupure de 140 nm environ. Le surnageant obtenu a été analysé par HPLC.

La séparation a été réalisée sur une colonne de type BEH-C4 (150 x 4.6 mm, i.d. 5µm, Waters) à un flux de 1 mL/min, en utilisant des éluants constitués d'eau + acide formique (0.2 %) (A) et d'acétonitrile + 0.1 % acide formique (B) en mode gradient. Ce gradient est répertorié dans le *Tableau A- 1* et fut utilisé pour les analyses des deux protéines, BSA et LSZ. La séparation a été réalisée à 20 °C, et la détection assurée par l'ensemble des détecteurs de la chaîne HPLC (**Chapitre 2 - Le couplage HPLC-MS**).

La part de protéine encore soluble a été déterminée par le ratio entre l'intensité mesurée du pic de la protéine après irradiation et avant irradiation, grâce à un témoin non irradié ainsi qu'avec une courbe d'étalonnage établie avec des standards de la protéine non irradiée.

Tableau A- 1 Gradient d'élution des analyses de la BSA et du LSZ

Temps de rétention (min)	% A	% B
0	95	5
15	60	40
24	60	40
25	95	5
30	95	5



#### Mesure des propriétés mécaniques des matériaux formés

Enfin, les mesures de caractérisation mécanique ont été réalisées à partir de solutions (4 mL), placées dans des tubes de scintillation liquide afin de former, sous irradiation, des matériaux dans une forme cylindrique et simplifier les caractérisations. Ces caractérisations ont été réalisées par Damien Favier et Marina Pecora de l'Institut Charles Sadron (ICS) de Strasbourg.

Ainsi, la résistance à la déformation, ou dureté, et le module d'élasticité des solides formés ont été déterminés par micro-indentation, sur les gels de BSA uniquement.

*Etude de la structure secondaire de la protéine :*

La structure secondaire des protéines, avant et après irradiation a été déterminée par spectroscopie FTIR (spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier). La bande IR donnant les informations désirées étant la bande amide I, située autour de  $1640\text{cm}^{-1}$ , les analyses FTIR doivent être réalisées idéalement dans un milieu exempt de  $\text{H}_2\text{O}$ . En effet, à la bande Amide I va se surimposer à une bande liée à une déformation O-H dans la molécule d'eau. Pour cette raison, les solutions de protéines dans  $\text{D}_2\text{O}$  ont été préparées et irradiées.

Une solution de protéine à 5 % en masse a donc été préparée dans  $\text{D}_2\text{O}$ . Elle a été centrifugée (15min, 9000 rpm) pour éliminer agrégats et impuretés, puis des cycles successifs d'ultrafiltration (concentration de la solution, puis reprise dans  $\text{D}_2\text{O}$  et nouvelle concentration) ont été réalisés dans des centricons de seuil de coupure 10 kDa.

Un petit volume ( $4\mu\text{L}$ ) de solution concentrée obtenue (25% en masse) a été piégé entre deux films de Polypropylène (PP, épaisseur de  $5\mu\text{m}$ ) pour former un assemblage suffisamment fin pour être analysé par FTIR.

Les analyses ont été réalisées avec le dispositif présenté dans le chapitre 2 (Les analyses Infra-rouge (FTIR)). Les spectres FTIR ont été traités en suivant la procédure décrite par (Yang *et al.*, 2015). La bande I a été lissée et doublement dérivée en suivant un algorithme de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964).

La déconvolution a été faite à l'aide du logiciel libre Fytik (Wojdyr, 2010) et l'attribution des bandes faite selon les données reportées par (Yang *et al.*, 2015). Pour ces échantillons, les doses appliquées ont été de 250 Gy à 250 kGy.

*Préparations pour l'adsorption sur élastomère*

Le greffage du Lysozyme sur un élastomère (ici du polyéthylène, PE) et le maintien de son activité enzymatique ont été testés lors des expériences du projet.

Pour ce faire, 3 mL d'une solution de LSZ de concentration 5g/L ont été placés au contact d'une feuille de PE de 24mm de diamètre, pendant une nuit, pour permettre l'adsorption de la protéine à la surface du polymère. Au matin des irradiations, ces films de PE ont été rincés avec de l'eau ultrapure à la pipette de transfert (volumique équivalent pour chaque film). Les irradiations ont ensuite été réalisées sur ces films, soit à l'état sec, soit mis en contact avec de l'eau (1.2 mL).

Des irradiations ont également été faites sur des films de PE mis en contact avec la solution de LSZ à 5g/L juste avant l'irradiation, donc sans pré-adsorption préalable du LSZ.

Les doses utilisées ici étaient comprises entre 250 Gy et 1000 Gy, des tests préliminaires ayant montré une disparition totale de l'activité à des doses supérieures.

## Mesure de l'activité enzymatique du lysozyme

Les caractérisations de l'activité enzymatique du Lysozyme ont été menées par A. Ponche de l'IS2M, sur les gels de Lysozyme formés sous irradiation à partir de solutions concentrées et sur le lysozyme adsorbé sur des films de PE.

Le principe de ces analyses repose sur la capacité du Lysozyme à lyser la membrane de la bactérie *Micrococcus lysodeikticus*. Une suspension de cette bactérie a été préparée, ce qui crée une solution turbide. Suite à l'ajout de lysozyme, la lyse des membranes de la bactérie, par l'action de l'enzyme, entraîne une diminution de la turbidité de la suspension. L'évolution de la turbidité est suivie par spectroscopie UV-Visible. L'absorbance est mesurée à 450 nm en fonction du temps. La variation de l'absorbance  $\Delta A_{450}/\text{min}$ , déterminée à partir de la partie (initiale) linéaire de la courbe  $A_{450} = f(t)$  dépendra directement de l'activité enzymatique de la protéine : elle sera d'autant plus marquée que la lyse est importante.

## Formation et caractérisation de gels autoportants de BSA

### La formation des gels

Les irradiations de solutions concentrées de BSA dans les boîtes de pétri ont permis de mettre en évidence la formation de gels sous irradiation. L'évolution de l'aspect des échantillons avant et après irradiation selon la dose appliquée est présentée dans la *Figure A- 10*.

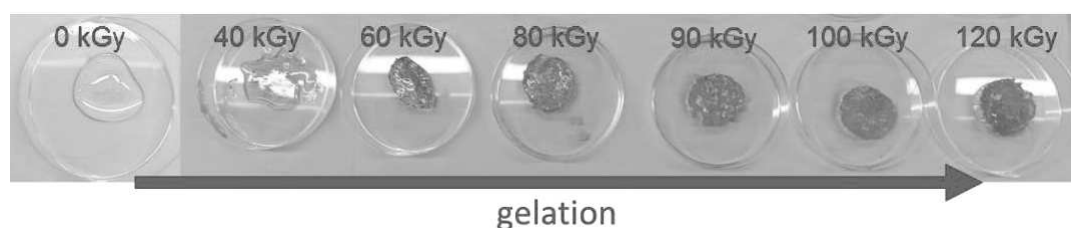


Figure A- 10 Formation du gel de BSA sous irradiation par des électrons de 1 MeV à différentes doses

Les gels se forment véritablement pour des doses égales ou supérieures à 60 kGy. Pour une dose s'élevant à 40 kGy, la solution est fortement épaissie. Le gel à 60 kGy est mou, et durcit jusqu'à 100 kGy. Cette valeur de dose semble être celle pour laquelle le gel ne durcit plus, du moins à l'œil nu, sans caractérisation mécanique rigoureuse. La couleur est également modifiée. Avant irradiation, la solution de BSA non irradiée est transparente et légèrement jaune. Après irradiation, les gels obtenus sont d'une teinte jaune-orangée de plus en plus foncée avec une augmentation de la dose appliquée.

La preuve de concept est d'ores et déjà apportée : les gels de protéines se forment sous irradiation, sans ajout de plastifiant/agent réticulant et sans traitement chimique ou thermique. L'intérêt de ce projet reposant également sur l'obtention de gels de protéines qui restent structurées, il faut alors caractériser les gels obtenus pour vérifier leurs propriétés.

## Caractérisations chimiques

## Détermination du taux de gel, du taux d'insolubles et du gonflement

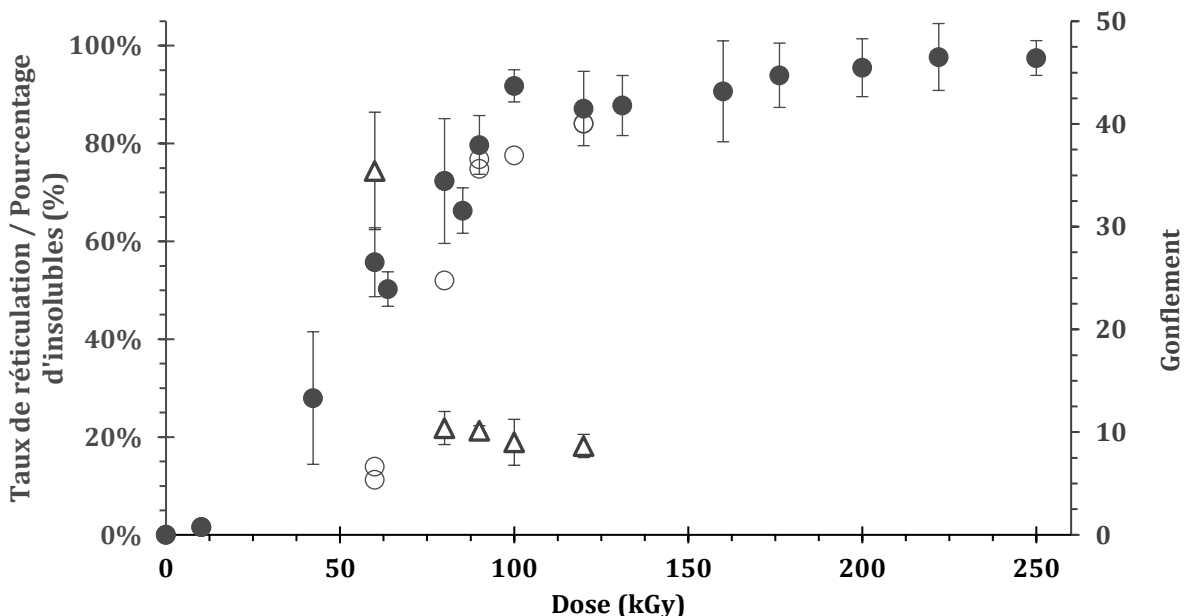
Les premières caractérisations réalisées sur les gels obtenus sous irradiation correspondent au taux de réticulation, déterminé par mesure gravimétrique, au taux d'insolubles (diamètre supérieur à 140 nm environ) par analyses HPLC, ainsi qu'au taux de gonflement des gels formés sous irradiation. Les résultats pour la BSA sont présentés dans la *Figure A- 11*.

Une augmentation importante du taux de protéines insolubles / du taux de gel est observée sous irradiation, jusqu'à atteindre un plateau à une dose de 100 kGy environ correspondant à approximativement 90% de part insoluble pour le gel de protéine.

Une forte incertitude apparaît également pour les doses les plus faibles, car il s'agit de la dose où le gel se forme et où une très faible différence dans la dose peut induire un changement majeur au niveau de la gélification et du taux de gel.

Par ailleurs, l'accord entre les mesures gravimétriques et par HPLC est parfait pour les hautes doses, mais une différence importante est observée pour les « faibles » doses (< 90 kGy). Cette différence s'explique par le seuil de coupure qui diffère entre les mesures gravimétriques et par HPLC.

Lors des analyses gravimétriques, les agrégats de taille inférieure à 125  $\mu\text{m}$  n'ont pas été retenus par la cage et ont alors été comptés dans la part soluble, car non pesés. Or, ils ne sont pas nécessairement solubles. Pour les analyses HPLC, seules les fractions du matériau réellement solubles ont été analysées et mesurées.



*Figure A- 11 Evolution en fonction de la dose du taux de réticulation déterminé par mesures gravimétriques (O), du pourcentage d'insolubles déterminés par HPLC (●) et du gonflement (Δ, axe secondaire). Ces mesures concernent les gels issus de la BSA.*

A noter que la seule évaporation d'une solution concentrée de BSA (30% en masse) conduit aussi à la formation d'un film autoportant. Mais, contrairement aux matériaux formés sous irradiation, ce film est hydrosoluble.

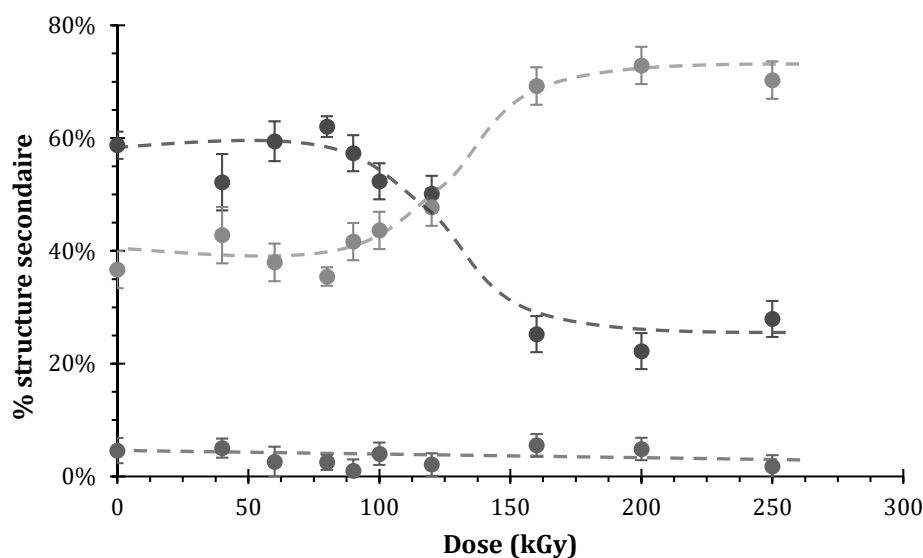
Le gonflement, à la différence du taux de gel, diminue avec la dose. Ceci s'explique par le fait que sous irradiation, la réticulation des protéines va induire la formation d'un réseau de plus en plus dense ce qui va alors réduire l'espace disponible pour piéger des molécules d'eau.

#### Evolution de la structure secondaire

Les analyses FTIR réalisées sur les gels fins formés dans D<sub>2</sub>O ont permis d'étudier l'évolution de la structure secondaire des protéines à différentes doses (*Figure A- 12*). La protéine native, avant irradiation, présente une large majorité d'hélices  $\alpha$  (59%), 36% de structures  $\beta$  et 5% de pelotes. Ces valeurs sont proches des valeurs obtenues par diffraction des rayons X sur des cristaux de BSA pour les hélices (67%) mais diffèrent au niveau des structures  $\beta$  (18%) et des pelotes (15%) (Peters, 1995). Le constat est similaire pour la comparaison avec d'autres données concernant la BSA en solution (Abrosimova *et al.*, 2016).

De 0 à 80 kGy, la structure de la protéine ne semble pas être modifiée, ou du moins l'irradiation n'impacte pas de façon notable les différents motifs de structure secondaire. Au-delà, les résultats présentés montrent une forte diminution de la proportion d'hélices  $\alpha$  au profit des structures  $\beta$ . Les pourcentages de pelotes ne sont modifiés à aucune des doses étudiées ici.

Cette tendance se poursuit jusqu'à une dose de 160 kGy à partir de laquelle les motifs de structure secondaire ne semblent plus être impactés par l'irradiation.



*Figure A- 12 Evolution des proportions des différents motifs de structure secondaire moyenne de la BSA (hélices  $\alpha$  ●, feuillets  $\beta$  ●, pelotes ●) en fonction de la dose. Les lignes hachurées représentent uniquement un guide.*

Les proportions d'hélices  $\alpha$  passent ainsi de 60% à 25% des structures secondaires au bénéfice des structures  $\beta$  qui représentent 70% des motifs à haute dose contre 36% pour la protéine native. Ainsi, la protéine se réorganise pour adopter une nouvelle structure, probablement plus stable, autour des feuillets et coudes  $\beta$ . Une fois cette structure stable atteinte, elle ne semble plus être modifiée, quelle que soit la dose appliquée.

Cette augmentation des proportions de structures  $\beta$  fait écho à ce qui a déjà été observé dans d'autres études, où de la caséine a été irradiée sous rayons  $\gamma$  ( $^{60}\text{Co}$ ) ce qui a conduit à une augmentation des feuillets et coudes  $\beta$  en plus d'une meilleure rigidité des films (Cieśła *et al.*, 2006).

La modification importante des proportions de structure secondaire débute, de plus, à la dose où le taux de gel atteint son plateau (90% de part insoluble), suggérant alors que les modifications de structures se font majoritairement après l'agrégation et pas simultanément.

### Analyses UV-Vis

En parallèle des analyses FTIR, des analyses UV-Visible ont été conduites pour caractériser les modifications de la BSA sous irradiation (Figure A- 13). Les spectres UV-Vis sont disponibles pour la solution non irradiée et pour les gels formés à 80 kGy, 100 et 200 kGy.

La solution non irradiée présente un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 279 nm, caractéristique des acides aminés aromatiques que sont le tryptophane et la tyrosine. La phénylalanine possède un maximum caractéristique à 260 nm, qui intervient aussi certainement dans la bande d'absorption observée ici et induit un élargissement du pic.

A 80 kGy, cette bande est toujours présente et est beaucoup plus fine, la contribution de Phe semblant avoir disparu. Un nouveau pic apparaît également à 320 nm, qui pourrait indiquer la formation de di-tyrosines.

Les spectres des doses plus élevées sont nettement moins résolus avec une absorption étendue de l'UV au domaine du visible justifiant le jaunissement important des gels sous irradiation.

La bande à 280 nm, nettement moins intense, semble se décaler à 275 nm ce qui correspond aux résidus Tyr et Trp se trouvant dans des environnements plus exposés à l'eau. Ce décalage s'observe par ailleurs à des doses où la structure secondaire change radicalement.

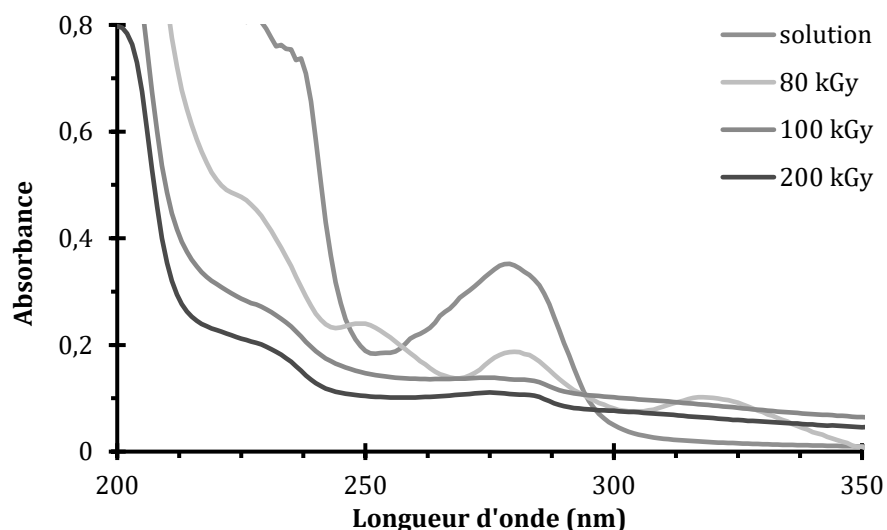


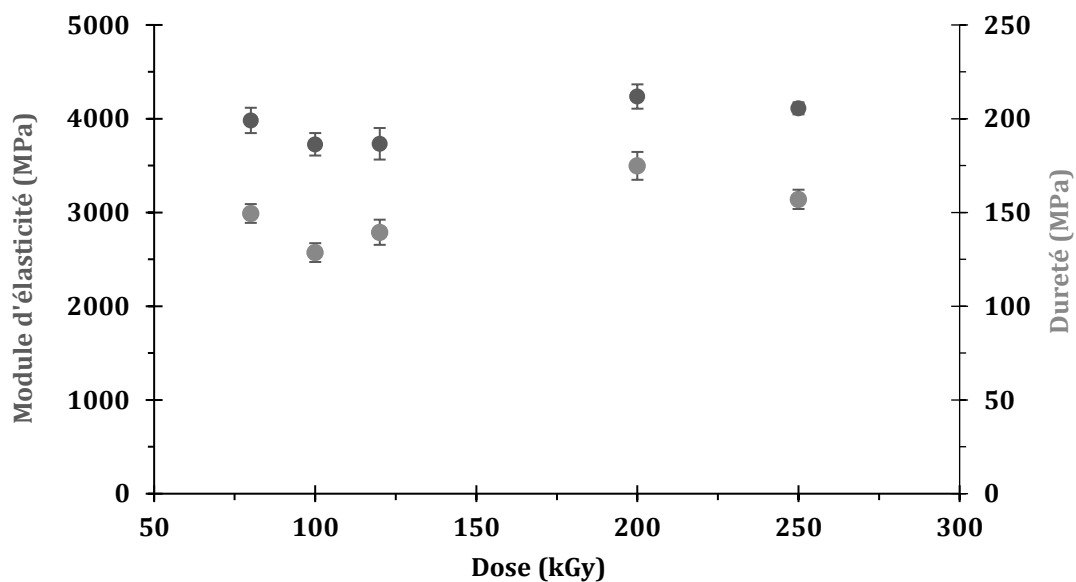
Figure A- 13 Spectres UV de gels de BSA irradiés à différentes doses (80 kGy, 100 kGy et 200 kGy) et de la solution concentrée de BSA avant irradiation



### Caractérisation mécanique

La dureté, correspondant à la résistance à la déformation, et le module d'élasticité, correspondant à la capacité du gel à récupérer d'un stress, ont été mesurés par micro-indentation. La *Figure A- 14* présente l'évolution de ces deux grandeurs en fonction de la dose, ainsi qu'une photographie d'un bioplastique obtenu à 200 kGy.

Aucun effet clair de la dose n'est observé sur ces deux grandeurs. Ces valeurs sont par ailleurs très similaires à celles obtenues pour des polymères d'origine pétrolière comme le PMMA (Guillonnet al., 2011) et surtout le Nylon 6. Ces mesures ont été réalisées sur des gels secs, car l'hydratation a tendance à diminuer fortement la dureté et le module d'élasticité. Il serait intéressant de comparer les valeurs de dureté et d'élasticité ainsi obtenues avec celles du gel de protéine hydrosoluble obtenu par simple séchage d'une solution concentrée de BSA.



*Figure A- 14 Evolution selon la dose du module d'élasticité des bioplastiques formés à partir de BSA (axe principal, ●) et de leur dureté (axe secondaire, ●) (en haut) et photographie d'un bioplastique formé sous irradiation à très haute dose (en bas).*

## Les gels de Lysozyme

### *La formation des gels*

Comme pour la BSA, des irradiations réalisées dans des boîtes de pétri ont permis d'étudier la formation de gel de LSZ sous irradiation. Des photographies des gels obtenus sont présentées dans la *Figure A- 15*. La transformation de la solution en gels n'intervient que pour des doses supérieures ou égales à 100kGy, soit à des doses bien plus élevées que dans le cas de la BSA. A dose équivalente, les gels de LSZ sont également nettement moins durs. Ici également, la couleur change avec l'irradiation, et une teinte de plus en plus jaune est observée lorsque la dose appliquée augmente.



*Figure A- 15 Formation du gel de Lysozyme sous irradiation par des électrons de 1 MeV à différentes doses*

### *Caractérisations chimiques*

#### Détermination du taux de gel et du taux d'insolubles

Les mesures gravimétriques n'ont pas pu être faites sur les gels formés sous irradiation (doses de 0 à 120 kGy) de solutions concentrées de LSZ, car la totalité de l'échantillon passe à travers le maillage des cages utilisées pour les mesures gravimétriques.

Cela signifie alors que si des agrégats se forment lors de la gélification, ils sont tous de taille inférieure au seuil de coupure de 125  $\mu\text{m}$ . Des mesures gravimétriques pour des doses au-delà de 120 kGy seront réalisées dans le futur pour déterminer si le caractère hydrosoluble est maintenu également à ces doses élevées.

Les analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse ont, en plus de déterminer le taux d'insolubles, permis de caractériser la part de LSZ soluble.

Dans la dose 0, deux pics, notés pic 1 et pic 2 (*Figure A- 16*), apparaissent sur le chromatogramme à 5.8 et 11.7 min. Le second pic est prédominant. Les deux espèces présentent le même spectre de masse, correspondant à différents états de charge du LSZ (14304,95 Da),

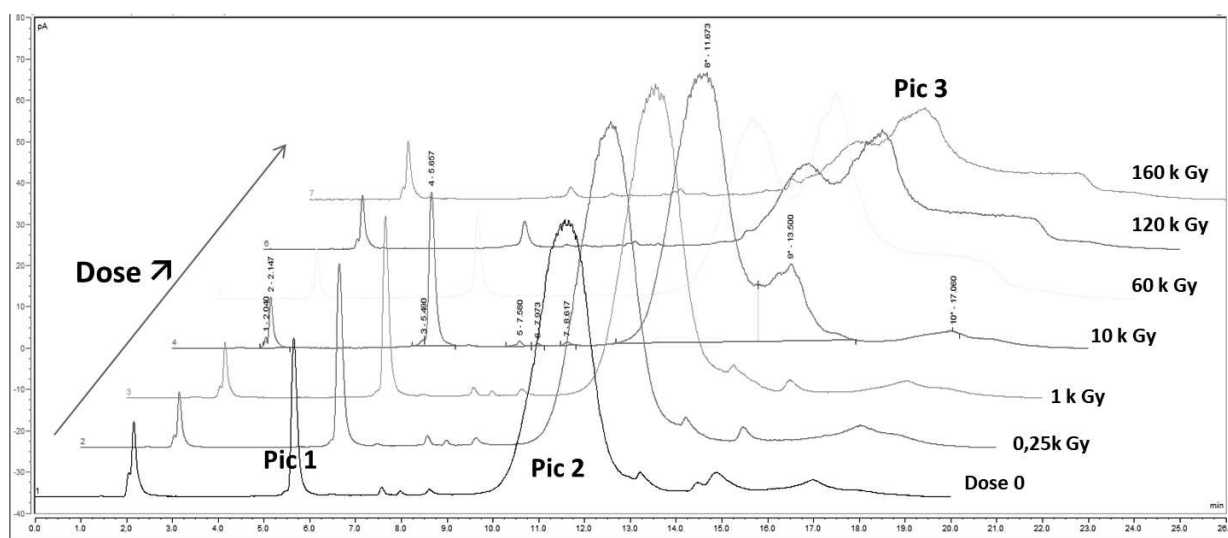


Figure A- 16 Chromatogrammes des parts solubles des gels de LSZ irradiés à différentes doses (0-160 kGy).

Lorsque la dose appliquée augmente, l'intensité de ces deux pics diminue au profit d'un troisième pic qui apparaît sur les chromatogrammes, celui-ci est noté pic 3.

Grâce au couplage HPLC-MS, il a été possible de déterminer la masse de la protéine correspondant à ce nouveau pic. L'analyse de son spectre de masse conduit à un poids moléculaire de 14306,93 Da, soit une différence de masse de +2 Da par rapport au LSZ natif, différence liée à l'ajout de deux atomes d'hydrogène sur la structure de la protéine. Cette différence de masse est typique d'une modification singulière des protéines : la rupture d'un pont disulfure. Ainsi, la liaison covalente entre deux cystéines - le LSZ en possède 8 au total - se rompt pour reformer une liaison S-H sur chaque cystéine. Les ruptures de ponts disulfure ont été, dans la littérature, directement reliées à une déstabilisation de la structure des protéines (Lipinski, 2011). Ainsi, cette rupture pourrait être une première étape vers un changement de structure du Lysozyme lui permettant alors de se réticuler.

Ainsi, il est possible de représenter l'évolution des différentes espèces en fonction de la dose en considérant le gel formé comme une quatrième espèce qui se forme après l'espèce ayant subi des ruptures de ponts disulfure (Figure A- 17).

A faible dose, le taux d'insoluble reste nul (à l'erreur expérimentale près). A partir de la dose seuil de 60 kGy, le taux d'insoluble augmente de façon conséquente, comme dans le cas de la BSA. Toutefois, aucun plateau n'apparaît clairement même aux doses les plus hautes dans le cas du LSZ. Une dose de 250 kGy est nécessaire pour atteindre un taux d'insoluble de 92%, un taux qui avait été atteint dès 100 kGy dans le cas de la BSA.

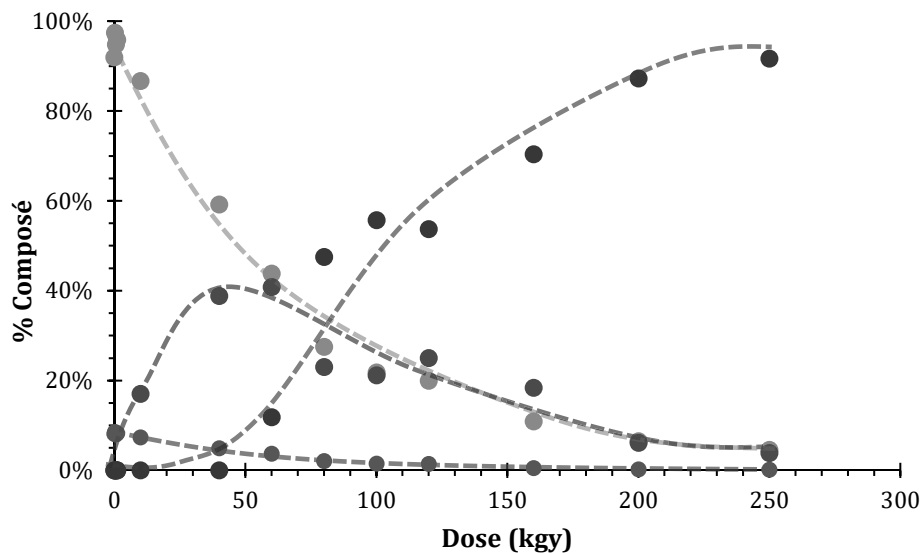


Figure A- 17 Evolution des proportions des différentes espèces selon la dose. Pic 1 (LSZ, ●) ; Pic 2 (LSZ, ●) : Pic 3 (LSZ ayant subi une rupture de pont disulfure, ●) et part insoluble (●). Les lignes hachurées servent de guide.

L'évolution de l'intensité du pic 3 avec la dose suit une courbe en cloche avec un maximum vers 60 kGy, la dose pour laquelle on observe la formation d'agrégats de taille supérieure à 140 nm et où le système d'étude prend l'aspect d'un gel. On peut émettre l'hypothèse que la protéine modifiée par rupture d'un pont disulfure constitue un intermédiaire dans la formation des gels.

En effet, l'évolution des différents composés suit parfaitement un schéma réactionnel  $2(+1) \rightarrow 3 \rightarrow 4$  où 2(+1) correspond au LSZ natif dont la quantité diminue avec la dose ; 3 le LSZ ayant subi une rupture de ponts disulfure et 4 le LSZ réticulé et insoluble. Le fait que la part insoluble augmente plus rapidement que le pic 3 ne diminue suggère également que cette espèce continue d'être formée par dégradation du LSZ natif au cours de l'irradiation.

Ces ruptures de ponts disulfure ont été, dans la littérature, directement reliées à une déstabilisation de la structure des protéines (Lipinski, 2011). Ainsi, cette rupture pourrait être une première étape vers un changement de structure du Lysozyme lui permettant alors de se réticuler.

#### Evolution de la structure secondaire

Comme pour la BSA, les analyses FTIR réalisées sur les gels fins formés dans D<sub>2</sub>O ont permis d'étudier l'évolution de la structure secondaire des protéines sous irradiation à différentes doses (Figure A- 18).

D'après nos analyses FTIR, à l'état natif en solution concentrée, LSZ est majoritairement structuré autour de structures  $\beta$  (52%), avec tout de même une forte proportion d'hélices  $\alpha$  (35 %). Les pelotes représentent 13% des motifs de structure observés. Ces proportions relatives sont comparables aux données cristallographiques sur cette protéine, à savoir 45% d'hélices  $\alpha$  pour 47% de structures  $\beta$  et 8% de pelotes, (K. Watanabe et al., 1981). Des agrégats formés par liaisons intermoléculaires faibles entre structures  $\beta$  sont observés dès la dose 0 dans le cas du LSZ, ce qui ne l'était pas pour la BSA. Ils donnent lieu à une bande d'absorption vers 1618 cm<sup>-1</sup>(Shivu *et al.*, 2013). Leur pourcentage a été estimé à 2% de la structure globale.

Les conformations à l'état natif de LSZ et la BSA sont très différentes, avec une majorité de structures  $\beta$  pour le LSZ alors que les hélices  $\alpha$  constituent le motif principal de la BSA. Sous irradiation, le pourcentage d'hélices  $\alpha$  diminue pour les deux protéines, montrant la forte sensibilité à l'irradiation de ce motif. La proportion de pelotes reste inchangée (aux erreurs expérimentales près) sur toute la gamme de dose étudiée.

Dans le cas du LSZ, la part de structures  $\beta$  augmente avec la dose, en raison d'une augmentation importante et continue de la proportion des agrégats intermoléculaires. La proportion de feuillets  $\beta$  et coudes beta n'évolue pas de façon très marquée.

Il est important de souligner que si, dans le cas de la BSA, on notait une dose seuil vers 80 kGy au-delà de laquelle seulement une dénaturation de la protéine était visible, la modification de structure secondaire du LSZ est continue et immédiate, observable dès la première dose appliquée. En revanche, aucun plateau n'apparaît à très haute dose.

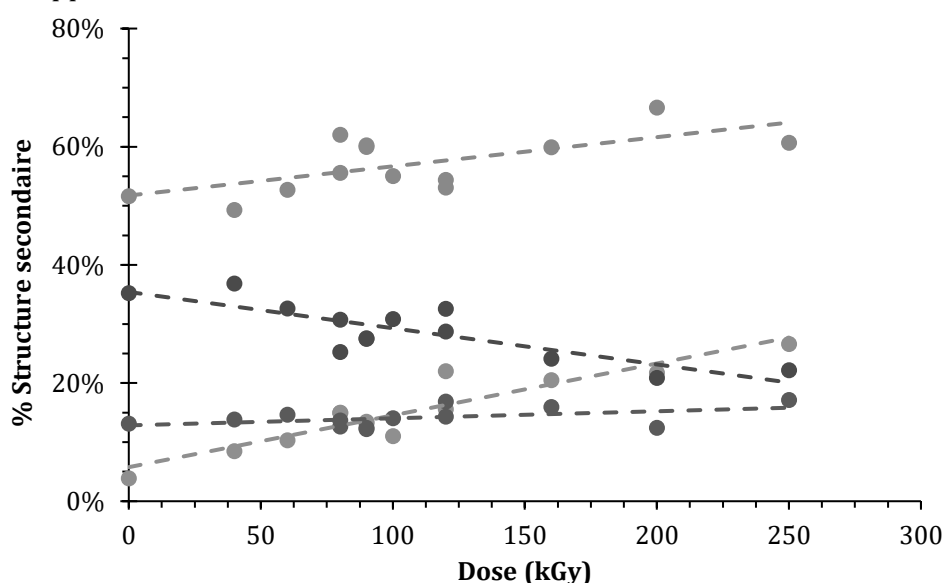


Figure A- 18 Evolution des proportions des différents motifs de structure secondaire moyenne de la BSA (hélices  $\alpha$  ●, structures  $\beta$  (intra et inter) ●, dimères ●, pelotes ●) en fonction de la dose. Les lignes hachurées représentent uniquement un guide.

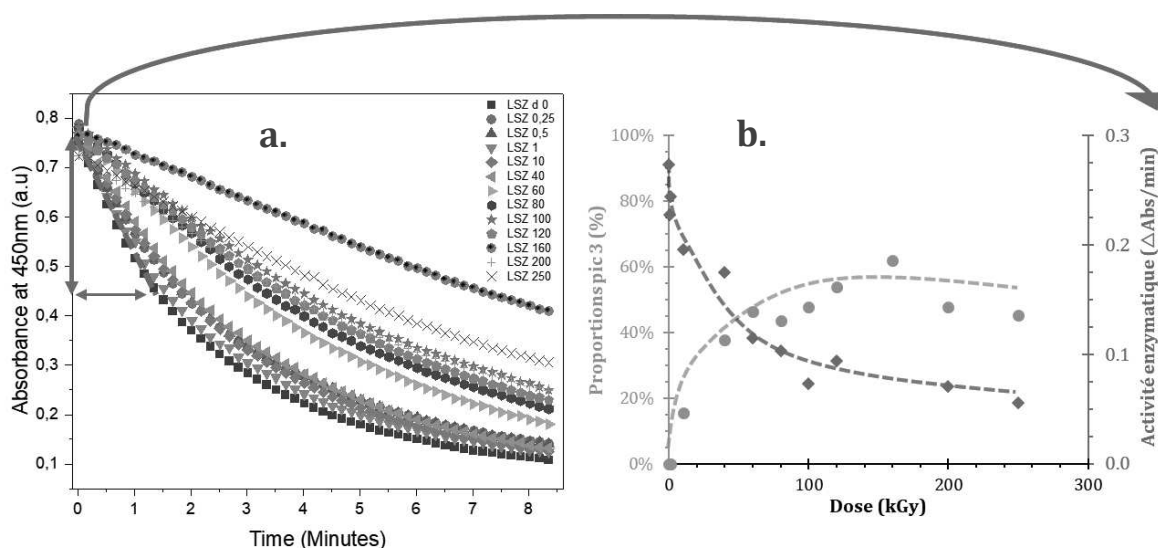
Le LSZ adopte ainsi une nouvelle structure certainement plus stable. Sa structure finale ne semble toutefois pas atteinte sur la gamme de dose étudiée. Cela rejoint l'observation réalisée sur les proportions de protéines insolubles, ou aucun plateau n'était atteint là-aussi.

De plus, la diminution du LSZ natif au profit d'une espèce ayant subi des ruptures de ponts disulfure observée précédemment va également dans ce sens. D'autres études ont montré que ces ruptures ont une implication directe dans la diminution des proportions d'hélices  $\alpha$  au profit des structures  $\beta$  (Moriyama & Takeda, 2017; Ohta *et al.*, 1995; Windsor *et al.*, 1993), ce qui correspond exactement à ce qui est observé ici.

## Caractérisation de l'activité enzymatique

Le lysozyme présente une activité enzymatique importante vis-à-vis de la bactérie *Micrococcus lysodeikticus* (M.L.). Cette activité a été mesurée sur la part de LSZ soluble (analyse sur les solutions en contact avec les gels durant une nuit). Le lysozyme a d'abord été quantifié puis les mesures d'activité ont été faites pour un ratio LSZ/Bactérie constant. Les résultats sont représentés dans la *Figure A- 19*.

L'activité enzymatique se définit comme la pente de la diminution de l'absorbance en fonction du temps sur le régime linéaire (temps courts). La diminution d'absorbance mesurée apparaît clairement comme étant importante et très proche (bien que très légèrement inférieure) de celle du LSZ non irradié pour les faibles doses (quelques centaines de Gy), avec une absorbance à 450 nm qui passe de 0.8 à environ 0.2 en 5 minutes, montrant qu'à faible dose, l'activité de la protéine est en grande partie maintenue. Une chute importante de l'activité apparaît entre 20 et 60 kGy.



*Figure A- 19 Evolution de l'absorbance à 450nm dans une solution contenant M.L. et la fraction soluble des gels de LSZ à différentes doses en fonction du temps (à gauche, a.).*

*Evolution de l'activité enzymatique (définie comme la pente de la diminution de l'absorbance en fonction du temps sur le régime linéaire de cette diminution) en fonction de la dose appliquée en rouge et des proportions de LSZ ayant subi une rupture de pont disulfure en bleu (à droite, b.).*

La *b.* présente l'évolution de l'activité enzymatique en fonction de la dose et montre une diminution importante et rapide jusqu'à 60 kGy, dose à laquelle la diminution d'activité ralentit de façon conséquente. La superposition de la fraction de LSZ ayant subi une rupture de pont disulfure parmi la part soluble permet de constater que la forte perte d'activité coïncide avec la forte augmentation des proportions de ce composé. Lorsque les proportions de LSZ ayant subi la rupture se stabilisent, ce qui correspond à la formation d'agrégats, la perte d'activité devient alors plus lente. Cela signifierait donc que la perte d'activité est directement corrélée à la déstructuration du Lysozyme par rupture des ponts disulfures. La dose de 160 kGy montre toutefois un comportement radicalement différent, inattendu, aussi elle n'a pas été représentée sur la *Figure A- 19b.*

Même à 250 kGy, on constate que le LSZ restant « soluble », c'est-à-dire les molécules isolées et/ou agrégats dont la taille moyenne reste inférieure à 140 nm environ, conserve une activité enzymatique.

En conclusion, le Lysozyme, tout comme la BSA, forme bien des gels sous irradiation et sans additif ou traitement supplémentaire. Ce gel bien qu'ayant une structure différente de celle de la protéine native reste structuré et conserve une activité enzymatique. Par contre, il a été montré lors de cette étude que les gels formés jusqu'à des doses de 120 kGy (valeur max sondée) sont constitués exclusivement d'agrégats de petites tailles. Le LSZ n'apparaît pas comme un très bon candidat pour la formation de bioplastiques insolubles dans l'eau. La suite de l'étude porte sur le comportement de cette protéine lorsqu'elle est greffée à la surface d'un polymère.

### 3/ Le lysozyme adsorbé

#### *Caractérisations chimiques – Analyse de la surface des films par IR-ATR*

Du LSZ a été adsorbé à la surface d'un film de polyéthylène, par mise en contact d'une solution de LSZ (5g/L) avec le polymère pendant une nuit. Les films ont ensuite été irradiés à sec, ou au contact d'eau. Parallèlement, des films de PP (sans pré-adsorption de l'enzyme) ont été immergés dans une solution de LSZ (5g/L) et irradiés de suite.

Pour étudier l'activité enzymatique du lysozyme sur la surface du polyéthylène (PE), les irradiations ont été réalisées dans les différentes conditions évoquées précédemment (). La quantité de LSZ présent sur la surface du PP a été déterminée par A. Ponche à l'IS2M, par analyses Infra-rouge en ATR (Réflexion Totale Atténuée). Les résultats pour les différentes conditions sont présentés dans la *Figure A- 20*.

Ainsi, une faible quantité de Lysozyme a été détectée sur les films sur lesquels du LSZ a été pré-adsorbé et qui ont été irradiés à sec. Pour les films également pré-adsorbés mais irradiés en présence d'eau, la quantité de lysozyme sur la surface était moindre, probablement en lien avec une désorption du LSZ. L'eau au contact du film n'a cependant pas été conservée et n'a donc pas pu être analysée pour vérifier cette hypothèse.

Dans le cas des films irradiés sans pré-adsorption au contact de la solution de LSZ 5g/L, l'enzyme n'a pas été détectée à la surface du polymère. Ainsi, l'irradiation ne favorise pas le greffage direct du Lysozyme sur la surface du PE, dans les conditions de concentrations utilisées tout du moins. Ainsi, les mesures d'activités enzymatiques n'ont concerné que les films où le LSZ fut pré-adsorbé, car il s'agit des seuls où l'enzyme est présente en quantité suffisante pour être détectée à la surface des films.

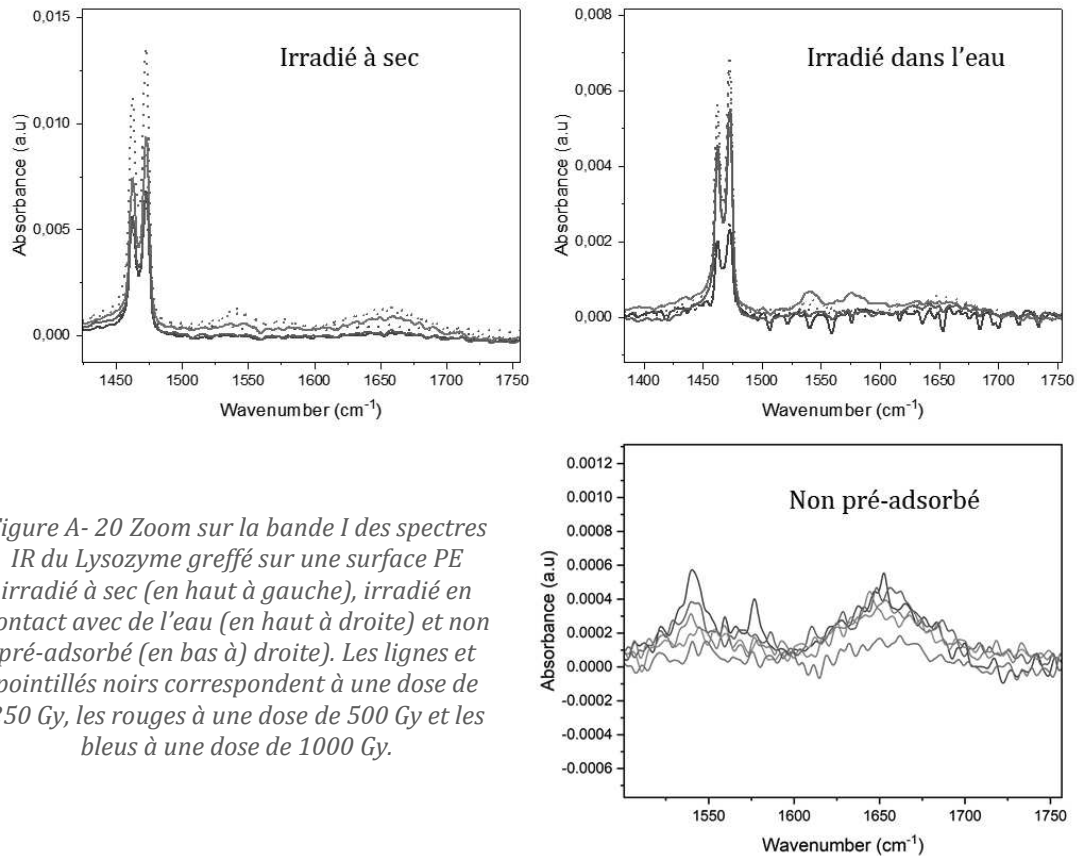


Figure A- 20 Zoom sur la bande I des spectres IR du Lysozyme greffé sur une surface PE irradié à sec (en haut à gauche), irradié en contact avec de l'eau (en haut à droite) et non pré-adsorbé (en bas à droite). Les lignes et pointillés noirs correspondent à une dose de 250 Gy, les rouges à une dose de 500 Gy et les bleus à une dose de 1000 Gy.

### Caractérisation enzymatique

Comme montré sur la *Figure A- 21*, aucune activité enzymatique n'a été mesurée pour les films irradiés en contact avec de l'eau et ce quelle que soit la dose déposée. En revanche, pour les gels irradiés à sec, une activité modérée a tout de même été détectée à 500 Gy et 1000 Gy. L'activité semble alors diminuer avec la dose bien qu'aucune activité ne soit mesurée dans l'échantillon irradié pour une dose de 250 Gy.

La différence importante entre les irradiations à sec et en contact avec de l'eau suggère alors que la majorité de la dégradation de l'enzyme et ainsi la perte de son activité enzymatique provient majoritairement des effets indirects des électrons, par l'action des espèces formées lors de la radiolyse de l'eau ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{e}^-_{\text{aq}} \dots$ ).



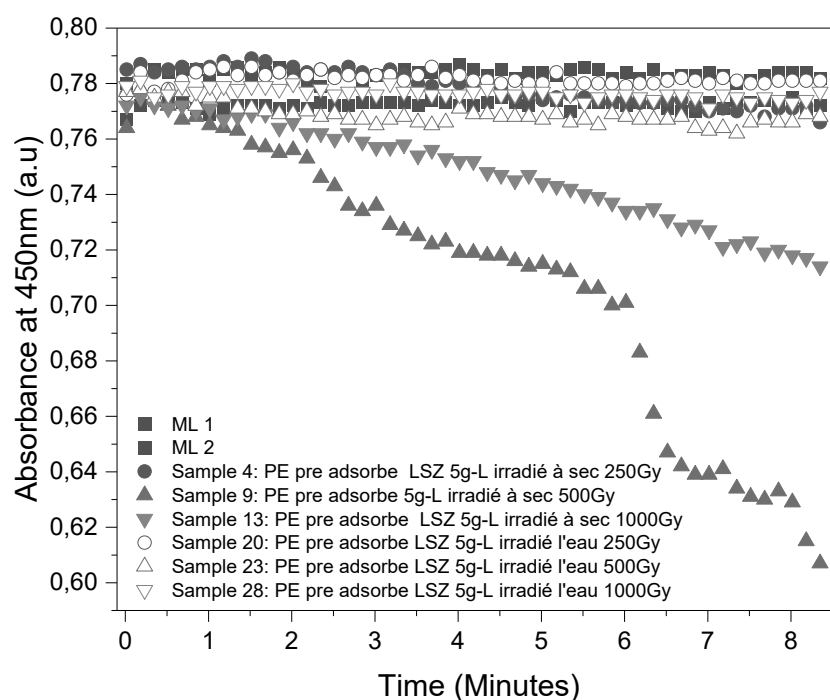


Figure A- 21 Evolution de l'activité enzymatique du LSZ adsorbé sur du PE et irradié à sec ou en présence d'eau à différentes doses. L'activité enzymatique est caractérisée par l'évolution de l'absorbance à 450 nm en fonction du temps.

## Conclusion partielle

ProBioTion est un projet multidisciplinaire dans lequel les équipes de l'IPHC, d'IS2M et d'Aerial ont combiné leur expertise pour développer des films à base de protéines et autoportants ainsi que des matériaux fonctionnalisés par des protéines, en irradiant des solutions concentrées de protéines avec des particules de haute énergie. Des électrons de 10 MeV (Aerial-Feerix) ont été utilisés pour assurer la structure cohésive des films, en évitant l'ajout d'agents de réticulation ou de plastifiants ainsi que tout traitement chimique ou thermique. Des tentatives de greffage (covalent), par traitement ionisant, des protéines sur un polymère, afin d'obtenir une surface fonctionnalisée ont été faites.

En raison de sa grande disponibilité et de son faible coût, la BSA (Bovine Serum Albumin) a été choisie comme premier candidat pour la formation de tels bioplastiques. Sous irradiation, des films ont été formés sans ajout de plastifiants ou de traitements chimiques/thermiques ultérieurs. La preuve de concept a ainsi été apportée : les gels de protéines se forment spontanément sous irradiation sans ajout de plastifiants.

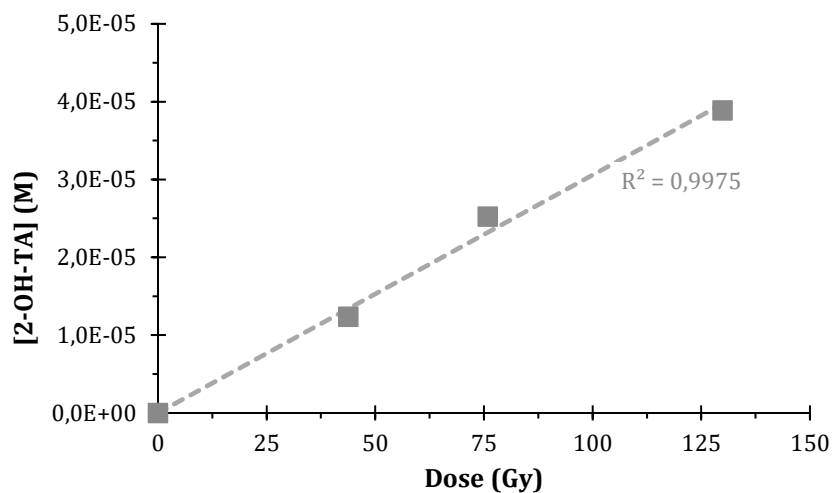
Les gels obtenus ont été caractérisés et leur réticulation a été estimée par HPLC et mesures gravimétriques. La fraction insoluble augmente fortement avec la dose pour atteindre plus de 90% dès 100 kGy, traduisant une importante réticulation. Cette augmentation du degré de réticulation entraîne également une baisse de la capacité de gonflement de la protéine.

Un effet seuil est confirmé par de multiples analyses autour d'une valeur de 80kGy, tant du point de vue de la structure du film que des structures secondaires de la protéine modifiées par le rayonnement. Les mesures par spectroscopie infrarouge ont permis de déterminer l'évolution de la structure secondaire de la protéine irradiée avec la dose. Elles montrent de forts changements de cette structure, avec conversion des hélices alpha en feuillets bêta à partir des doses auxquelles une réticulation significative est observée. Les protéines restent toutefois structurées, la formation de pelotes n'augmentant pas de manière significative sous irradiation. Enfin, des analyses par indentation d'échantillons de BSA irradiée à forte dose indiquent que les matériaux formés présentent des dureté et élasticité comparables à celles du Nylon6.

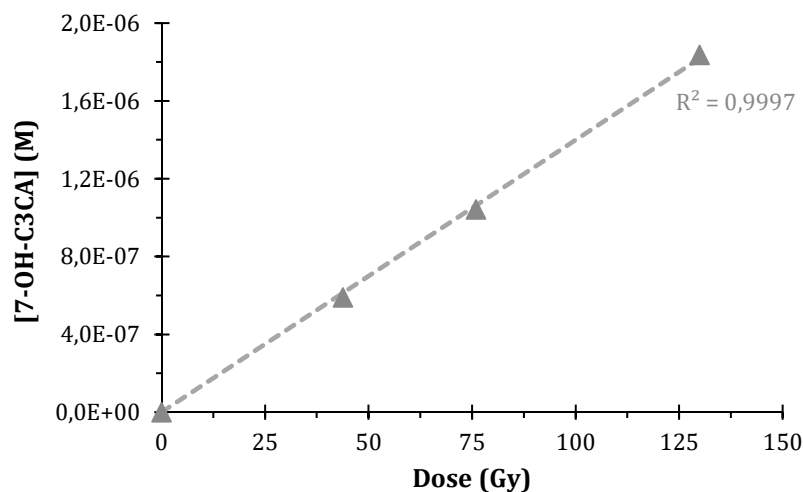
Pour étudier la faisabilité de la fonctionnalisation de surface par des protéines sous irradiation, le lysozyme (LSZ) a été utilisé car il possède une activité enzymatique claire vis-à-vis d'une bactérie, *Micrococcus lysodeikticus*. Comme pour la BSA, les gels ont été caractérisés par différentes techniques. Il a été montré que l'irradiation induit la rupture d'un pont disulfure de la chaîne peptidique, conduisant à la formation d'agrégats et à une altération de la structure secondaire de la protéine. Cette dernière se dénature en effet, de façon continue avec la dose appliquée, les hélices alpha étant le motif le plus sensible à l'irradiation. A la différence des gels de BSA, les gels de LSZ présentent un caractère hydrosoluble important. L'activité enzymatique de la fraction hydrosoluble a été étudiée et il a été montré qu'elle était dépendante de la dose d'irradiation.

Concernant le LSZ greffé sur une surface élastomère (ici du polypropylène, PP), Le LSZ physisorbé voit son activité enzymatique disparaître lorsque les films sont irradiés en présence d'eau, même à faible dose, ce qui traduit l'influence de la radiolyse de l'eau sur la dégradation de la protéine et probablement également de la désorption inhérente au processus d'immersion. Lorsque les films de polypropylène sur lequel est adsorbé LSZ sont irradiés à sec dans les mêmes conditions, l'activité enzymatique est maintenue, mais aucune corrélation claire n'a pu être établie entre l'activité enzymatique résiduelle et la dose appliquée.

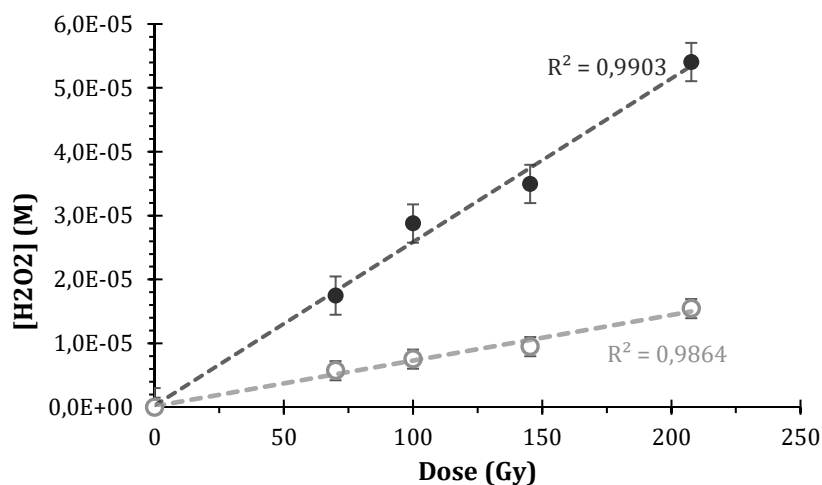
Pour la suite du projet, la capacité de ces gels, en particulier ceux de BSA, d'adsorber de molécules d'intérêt (polluants organiques, molécules avec activité antimicrobienne...) sera évaluée. En effet, un matériau capable d'adsorber des composés toxiques sans l'être lui-même, serait un atout majeur sur des thématiques de dépollution. Pour un aspect santé, c'est la propriété inverse à savoir la désorption de composés d'intérêt potentiellement thérapeutique qui serait un atout.



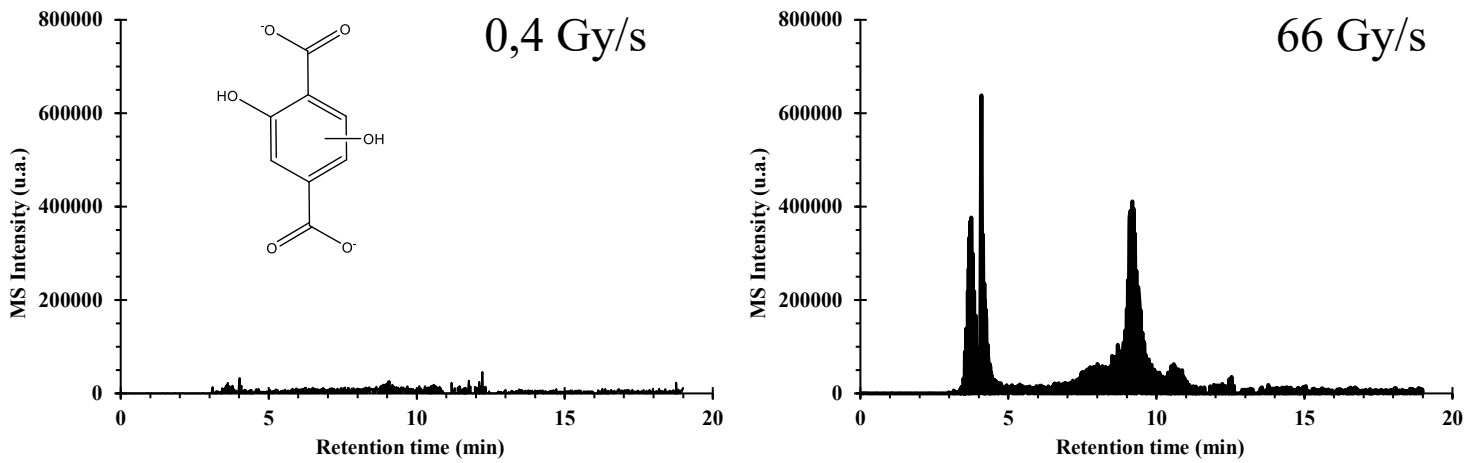
*Annexe 4 Evolution of 2-OH-TA concentration as a function of the dose under 6 MeV X-rays irradiations.*



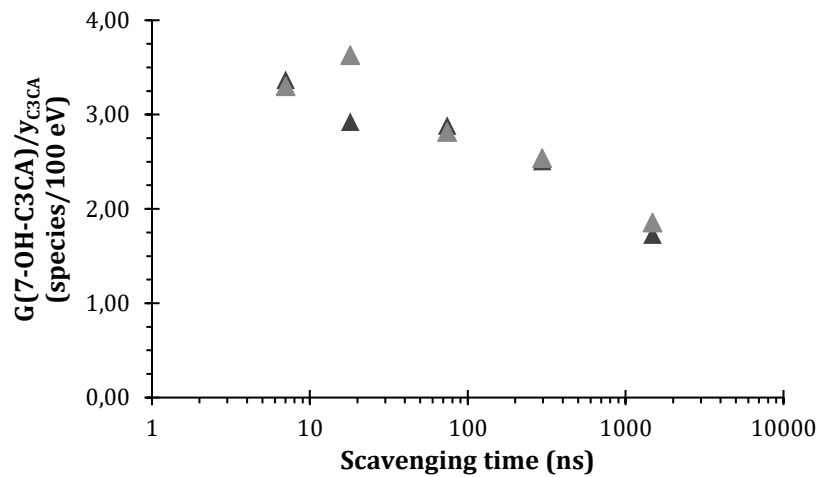
*Annexe 5 Evolution of 7-OH-C3CA concentration as a function of the dose under 6 MeV X-rays irradiations.*



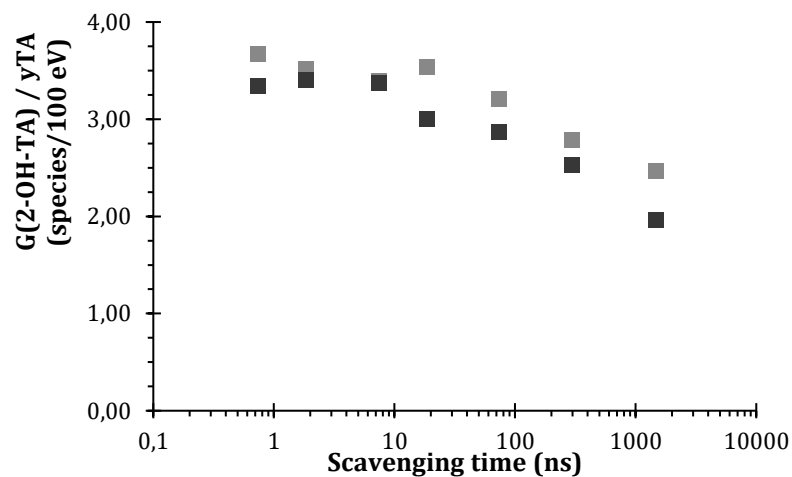
*Annexe 6 Evolution of hydrogen peroxide concentration in KBr and formate solutions as a function of the dose under 24 MeV proton beam irradiations. Light blue and open symbols are for KBr solutions, Dark blue and full symbols are for formate solutions.*



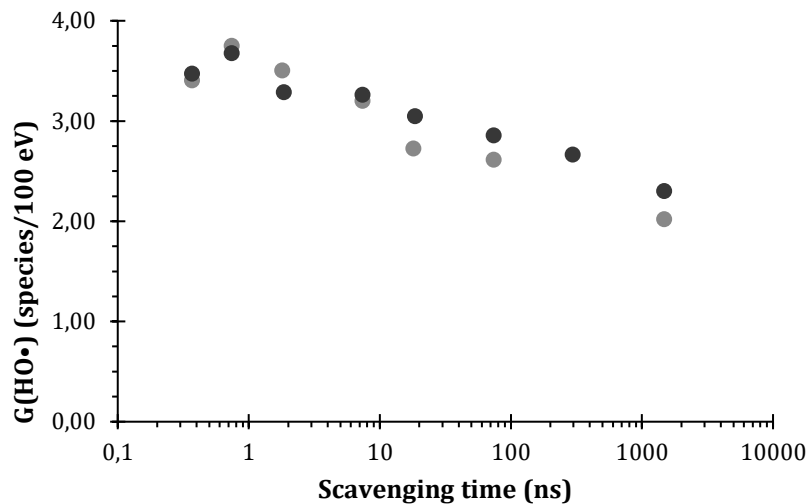
**Annexe 7** Comparison of the ion chromatograms obtained by selecting  $m/z$  197 for solutions of TA exposed to 24 MeV proton beam in the irradiation cell (= track-average measurements) at low dose-rate (left, 0.4 Gy/s) and high dose-rate (right, 66 Gy/s).  $[TA]_0 = 3.38$  mM



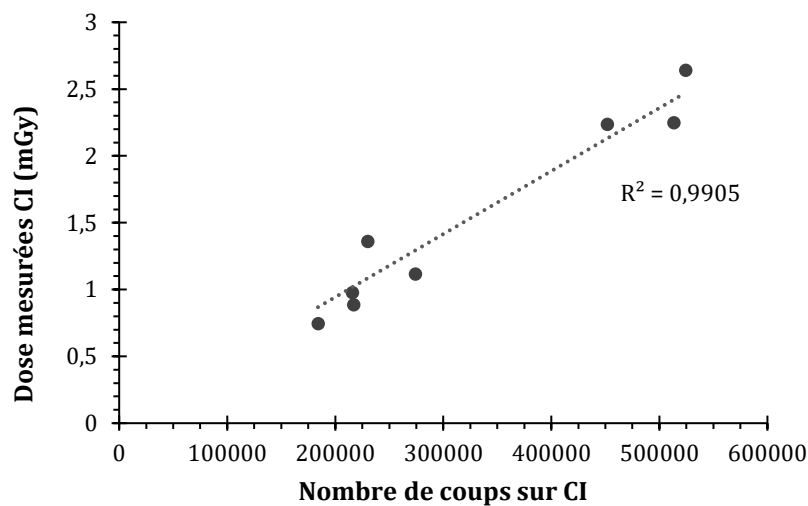
**Annexe 8** Evolution of the radiolytic yield of 7-OH-C3CA divided by its formation yield ( $y_{C3CA}$ ) as a function of the scavenging time for oxygen saturated solutions (orange) and aerated solutions (blue).  $y_{C3CA} = 4.7$  %. Experiments were conducted under 6 MeV X-rays



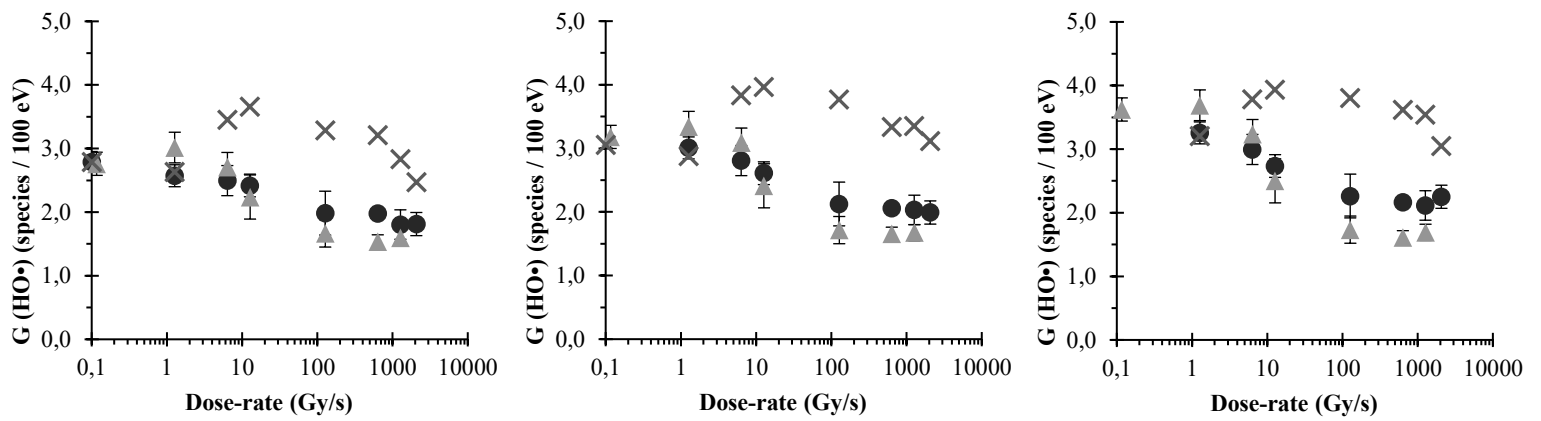
**Annexe 9** Evolution of the radiolytic yield of 2-OH-TA divided by its formation yield ( $y_{TA}$ ) as a function of the scavenging time for oxygen saturated solutions (orange) and aerated solutions (blue).  $y_{TA} = 35\%$ . Experiments were conducted under 6 MeV X-rays



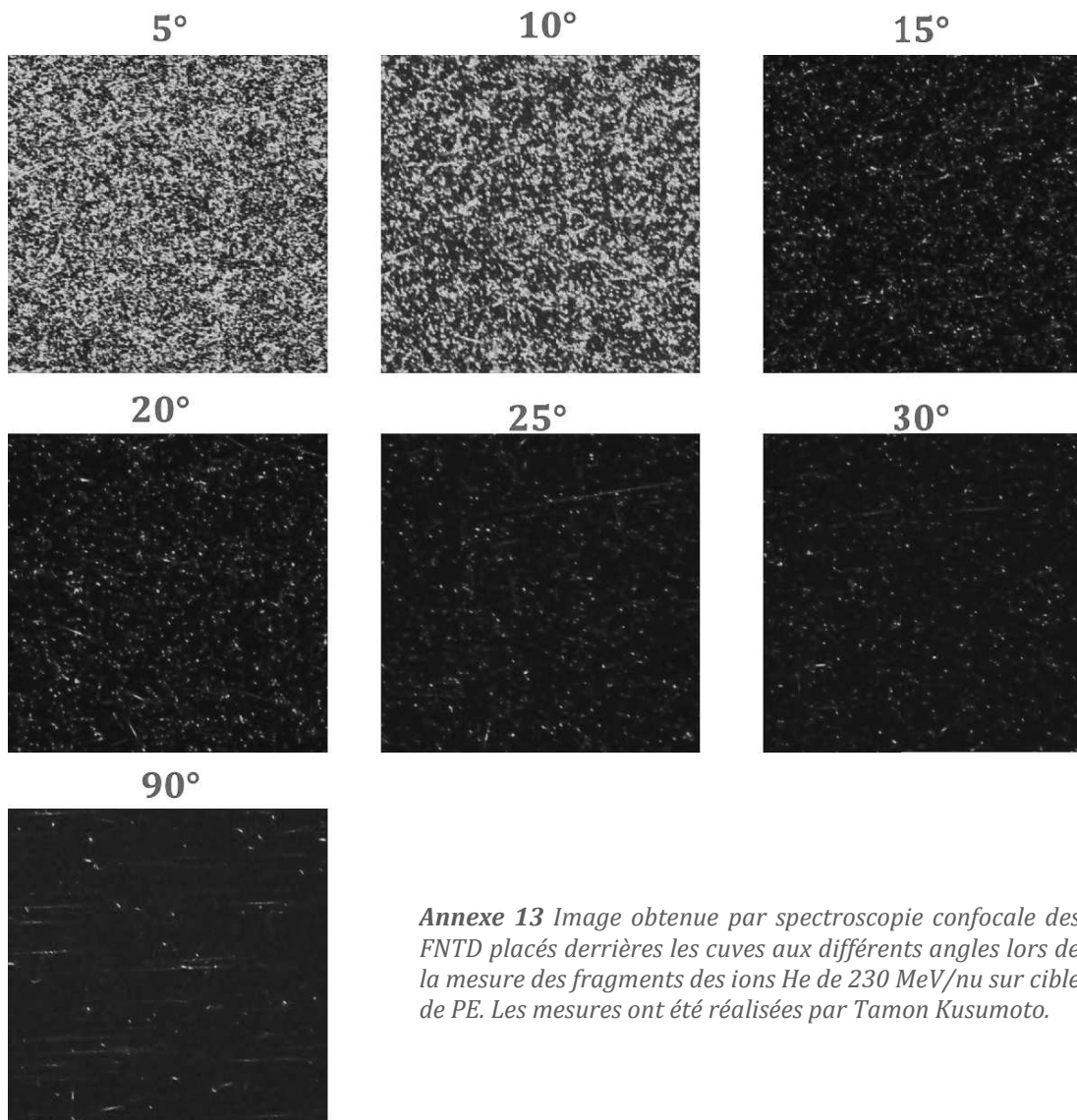
**Annexe 10** Evolution of the radiolytic yield of hydroxyl radical measured by KBr/Formate probe system as a function of the scavenging time for oxygen saturated solutions (orange) and aerated solutions (blue). Experiments were conducted under 6 MeV X-rays



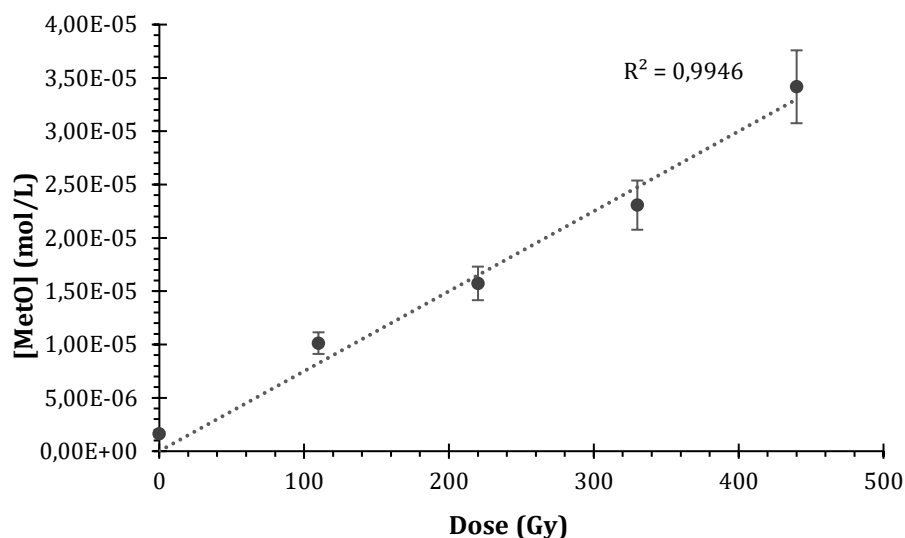
**Annexe 11** Evolution de la dose mesurée par la Chambre de Markus placée derrière la cuve à 20° de la cible en PE en fonction du nombre de coups du faisceau primaire.



*Annexe 12 Evolution de G(HO•) en fonction du débit de dose sous irradiation par des électrons de 1 MeV pour la sonde KBr/formiate (●), C3CA (▲) et TA (X). A gauche : t = 74 ns ; au centre t = 18.5 ns ; à droite t = 7.4 ns.*



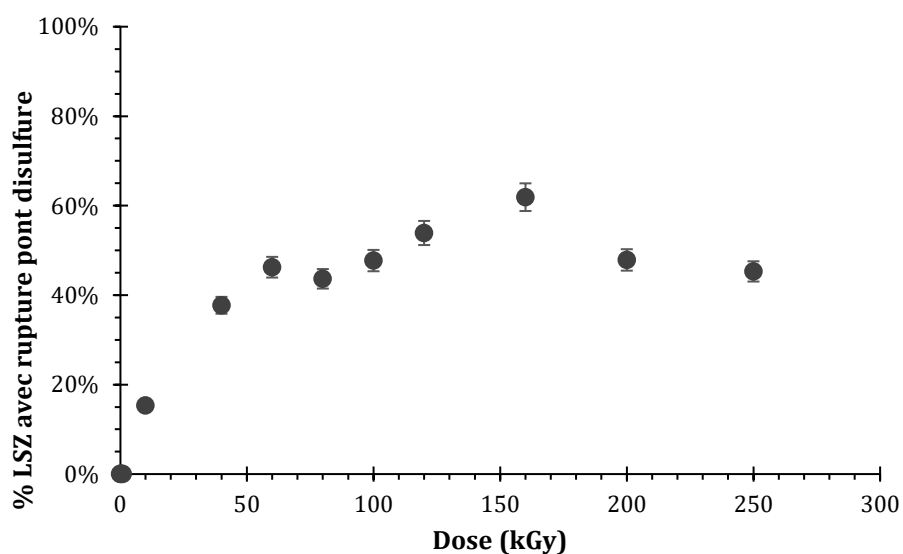
*Annexe 13 Image obtenue par spectroscopie confocale des FNTD placés derrière les cuves aux différents angles lors de la mesure des fragments des ions He de 230 MeV/nu sur cible de PE. Les mesures ont été réalisées par Tamon Kusumoto.*



*Annexe 14 Evolution de la concentration en sulfoxyde de méthionine en fonction de la dose sous irradiation par des protons de 2 MeV*

*Annexe 15 Tableau des personnes impliquées dans le projet PROBIOTION*

NOM Prénom	Poste	Laboratoire
PONCHE Arnaud	McF	IS2M
LUDWIG Nicolas	IR	Aerial-CRT
GALINDO Catherine	IR	IPHC
RAFFY Quentin	McF	IPHC
PEAUPARDIN Philippe	IR	IPHC
DANVIN Antoine	Doctorant	IPHC
ARNONE Aurélia	Doctorante	IPHC



*Annexe 16 Evolution de la proportion de LSZ présentant des ponts disulfures par rapport à la quantité totale de LSZ analysé par HPLC-CAD.*





# Effets du TEL et du débit de dose sur la radiolyse de l'eau et de biomolécules protéiques

## Résumé

Dans un contexte radiothérapeutique, la majorité des dégâts d'un point de vue moléculaire découlent des effets dits indirects. Ces effets proviennent de la radiolyse de l'eau, qui se décompose sous l'influence des rayonnements pour former des espèces réactives envers les biomolécules. En raison de leur proportion importante dans les cellules, les protéines sont des cibles de choix pour ces effets.

Cette thèse s'inscrit alors dans une étude fondamentale des mécanismes de radiolyse de biomolécules protéiques selon différents paramètres : le transfert d'énergie linéique (TEL) et le débit de dose. Le premier fait écho à l'hadronthérapie et le second à la thérapie FLASH.

De la radiolyse de l'eau aux acides aminés, ces deux effets seront étudiés et comparés pour des rayonnements ionisants de différentes natures (photons, électrons, ions). Les ions étant capables de fragmenter lors de leur pénétration de la matière, cette propriété sera également étudiée à travers nos systèmes. Enfin, les compétences acquises sur la radiolyse de biomolécules protéiques seront appliquées pour le développement de films de bioplastiques à base de protéines sous irradiations sans ajout d'additifs ou de traitements ultérieurs.

Mots clefs : Chimie sous rayonnement, Radiolyse de l'eau, biomolécules protéiques, TEL, débit de dose, ions accélérés

## Résumé en anglais

In a radiotherapeutic context, the majority of damage from a molecular point of view derives from so-called indirect effects. These effects arise from the radiolysis of water, which breaks down under the influence of radiation to form species reactive towards biomolecules. Because of their high proportion in cells, proteins are prime targets for these effects.

This thesis is part of a fundamental study of the radiolysis mechanisms of protein biomolecules according to different parameters: linear energy transfer (LET) and dose rate. The former echoes particle therapy, the latter FLASH radiotherapy.

From radiolysis of water to amino acids, these two effects will be studied and compared for different types of ionizing radiation (photons, electrons, ions). As ions are capable of fragmenting as they penetrate matter, this property will also be studied using our chemical systems. Finally, the skills acquired in the radiolysis of protein biomolecules will be applied to the development of protein-based bioplastic films under irradiation without the addition of additives or further processing.

Keywords: Radiation chemistry, water radiolysis, protein biomolecules, LET, dose-rate, accelerated ions