



**HAL**  
open science

# Modélisation, simulation et analyse numériques de l'interaction nanoparticules - rayons X. Applications à la radiothérapie augmentée.

Paul Retif

► **To cite this version:**

Paul Retif. Modélisation, simulation et analyse numériques de l'interaction nanoparticules - rayons X. Applications à la radiothérapie augmentée.. Automatique / Robotique. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0023 . tel-01754644v2

**HAL Id: tel-01754644**

**<https://hal.science/tel-01754644v2>**

Submitted on 4 Oct 2016

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

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

---

# Modélisation, simulation et analyse numériques de l'interaction nanoparticules - rayons X. Applications à la radiothérapie augmentée.

## THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 16 mars 2016

pour l'obtention du

**Doctorat de l'Université de Lorraine**

(Mention Automatique, Traitement du Signal et des Images, Génie Informatique)

par

Paul RETIF

### Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	M. Xavier FRANCERIES M. Stéphane ROUX	MCU. Université Paul Sabatier Toulouse (HDR) Pr. Université de Franche-Comté (HDR)
<i>Examineurs :</i>	M. Albert LISBONA M. Alain NOEL Mme. Muriel BARBERI-HEYOB M. Thierry BASTOGNE	PhD. Institut de Cancérologie de l'Ouest PhD. Université de Lorraine (HDR) Pr. Université de Lorraine (Co-directeur de thèse, HDR) Pr. Université de Lorraine (Directeur de thèse, HDR)
<i>Invités :</i>	Dr. Philippe QUÉTIN	Chef de service radiothérapie - curiethérapie CHR Metz-Thionville



---

# Modélisation, simulation et analyse numériques de l'interaction nanoparticules - rayons X. Applications à la radiothérapie augmentée.

## THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 16 mars 2016

pour l'obtention du

**Doctorat de l'Université de Lorraine**

(Mention Automatique, Traitement du Signal et des Images, Génie Informatique)

par

Paul RETIF

### Composition du jury

<i>Rapporteurs :</i>	M. Xavier FRANCERIES M. Stéphane ROUX	MCU. Université Paul Sabatier Toulouse (HDR) Pr. Université de Franche-Comté (HDR)
<i>Examineurs :</i>	M. Albert LISBONA M. Alain NOEL Mme. Muriel BARBERI-HEYOB M. Thierry BASTOGNE	PhD. Institut de Cancérologie de l'Ouest PhD. Université de Lorraine (HDR) Pr. Université de Lorraine (Co-directeur de thèse, HDR) Pr. Université de Lorraine (Directeur de thèse, HDR)
<i>Invités :</i>	Dr. Philippe QUÉTIN	Chef de service radiothérapie - curiethérapie CHR Metz-Thionville





## Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier Thierry Bastogne, Professeur de l'Université de Lorraine, directeur de cette thèse. Pour votre aide précieuse à tous les niveaux, votre bonne humeur, votre motivation, votre disponibilité sans faille. J'estime avoir beaucoup de chance d'avoir été votre étudiant et vous remercie encore une fois pour tout ce que vous avez fait.

Merci au Docteur Quélin Philippe, chef du service de Radiothérapie-Curiethérapie du CHR Metz-Thionville, qui a tout fait pour que cette thèse puisse débiter, qui m'a autorisé à entreprendre ce travail en parallèle de mon activité de physicien médical, pour votre sympathie, vos nombreux conseils ainsi que pour votre dévouement aux malades et à l'hôpital public que j'admire et que je partage.

Merci à Muriel Barberi-Heyob, Professeur de l'Université de Lorraine, co-directrice de cette thèse, vous avez su m'aider, me guider et m'appuyer chaque fois que j'en ai eu besoin.

Je remercie également vivement les autres membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail et de m'apporter leurs précieux conseils dans la finalisation de ce manuscrit : M. Albert Lisbona, chef du service de physique médicale à l'Institut de cancérologie de l'Ouest au centre René-Gauducheau de Saint-Herblain également Président de la Société Française de Physique Médicale ; M. Alain Noël ; M. Xavier Franceries, Maître de Conférences à l'Université Paul Sabatier de Toulouse et M. Stéphane Roux, Professeur de l'Université de Franche-Comté.

Un grand merci aussi à Sophie Pinel pour tous ces échanges scientifiques que nous avons eus et tes remarques toujours judicieuses qui m'ont permis de me remettre constamment en question et m'interroger profondément sur tous les points abordés dans cette thèse.

Je remercie le CHR Metz-Thionville qui m'a accordé sa confiance en me finançant durant cette thèse à mi-temps me permettant ainsi d'acquérir une expérience clinique tout en menant à bien mes travaux de recherche.

Merci à tous mes collègues du CHR Metz-Thionville qui ont assuré la réalisation de toutes les tâches de physique médicale durant mes absences, une semaine sur deux, pendant ces 3 années de thèse. Un énorme merci à Robert Dionisio qui m'a presque tout appris - "avant, j'avais un pote...". Merci infiniment à M. Grelot ainsi qu'à Corinne Dupré qui m'ont enseigné ce que doit être un physicien médical : un être rigoureux en toutes circonstances, pragmatique et inventif. Merci à tous : physiciens, dosimétristes, radiothérapeutes et manipulateurs du service, ne pouvant pas tous vous citer. Une pensée également pour Romain et Wael avec qui j'ai adoré travailler et surtout passer du temps entre amis.

J'ajouterai également que j'adresse toute ma gratitude à l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au laboratoire. Mes camarades et amis thésards ou non, Tiphaine, Levy, Jean-Baptiste, Magali, Karima, Amine, Meriem, Héna, Alicia, Valérie et Aurélie. Tous ceux que je ne peux pas citer car la liste serait trop longue. Je tiens à remercier en particulier M. Alain Richard que j'ai eu la chance de contacter avant de commencer cette thèse et sans qui elle n'aurait peut-être jamais débuté.

Merci à ma famille, pour tout le soutien et les encouragements durant la rédaction de ce

manuscrit. Merci, à ceux avec qui je n'ai pas pu passer assez de temps et qui se reconnaîtront, pour votre compréhension et votre patience.

Finalement, et j'insiste, merci de tout cœur pour tout ce que tu as toujours fait pour moi, tous ces sacrifices. Merci mille fois pour m'avoir toujours soutenu dans tout ce que j'ai voulu entreprendre. Je ne l'oublierai jamais, merci maman ; c'est à toi que je dédie ce travail.

*"Quel imbécile que je suis, s'écria Poirot. Tout cela est tellement limpide ! Vous ne trouvez pas ?",  
Monsieur le détective privé Hercule Poirot, Mrs McGinty est morte (1952), Agatha Christie.*



# Sommaire

<b>Table des figures</b>	<b>ix</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>Partie I Etat de l'art des nanoparticules activées par rayonnement à finalité médicale</b>	<b>5</b>
1 Préambule . . . . .	7
1.1 Contexte . . . . .	7
1.2 Problème posé . . . . .	7
1.3 Positionnement . . . . .	7
1.4 Objectifs et originalité . . . . .	7
1.5 Méthode et outils . . . . .	8
1.6 Résultats . . . . .	9
1.7 Conclusions et perspectives . . . . .	9
2 Introduction . . . . .	10
3 How to measure the nanoparticles-mediated improvement? . . . . .	11
3.1 In vitro assessment of radiation therapy effect . . . . .	11
3.2 Measurement of the DMF on survival curves . . . . .	12
3.3 Measurement of the NER (mono-dose) . . . . .	12
3.4 Measurement of ROS . . . . .	13
4 Parameters not depending on nanoparticles design . . . . .	14
4.1 Biological evaluation methodology . . . . .	14
4.2 The energy of the incidents X-rays (source) . . . . .	15
4.3 Irradiation setup . . . . .	23
5 Influence of nanoparticles design on the radiosensitization . . . . .	24
5.1 X-rays -nanoparticles interactions . . . . .	24
5.2 ROS generation upon X-rays . . . . .	25

5.3	Influence of nanoparticles design on tumor selectivity, cellular uptake, intracellular localization and biodistribution . . . . .	27
6	Future applications : <i>e.g.</i> photodynamic-therapy combined with high-Z radiosensitizers . . . . .	29
7	Conclusion and future perspectives . . . . .	30

---

**Partie II Méthode de conception de nanomatériaux structurés assistée par ordinateur 33**

1	Préambule . . . . .	35
2	Introduction . . . . .	36
3	Cahier des charges . . . . .	36
3.1	Rédaction du cahier des charges et des exigences sur la NP à concevoir	36
4	Méthodologie générale . . . . .	37
4.1	Conception d'un plan d'expériences numériques sous l'environnement R	37
4.2	Conception générale d'une simulation avec GATE . . . . .	38
4.3	Conception de l'environnement des NPs dans GATE . . . . .	38
4.4	Conception d'une NP et implantation dans GATE . . . . .	39
4.5	Conception du système à base de NPs dans GATE . . . . .	39
4.6	Sélection des paramètres de simulation dans GATE . . . . .	39
4.7	Réalisation des expériences numériques, archivage et prétraitement des résultats de simulation . . . . .	40
4.8	Analyse statistique de criblage des paramètres et sélection des paramètres actifs . . . . .	41
4.9	Détermination d'un modèle de type surface de réponse et valeurs des paramètres de conception permettant d'optimiser les réponses d'intérêt	41
5	Exemple de criblage virtuel de NPs en radiothérapie . . . . .	42
5.1	Planification d'expériences numériques (sous R) . . . . .	42
5.2	Modélisation (sous GATE) . . . . .	42
5.3	Simulation (sous GATE) . . . . .	44
5.4	Traitement des images (sous ImageJ) . . . . .	45
5.5	Analyses statistiques (sous R) . . . . .	45
6	Conclusion . . . . .	50

---

---

<b>Partie III</b>	<b>Analyse de robustesse <i>in silico</i> / <i>in silico</i></b>	<b>53</b>
1	Préambule . . . . .	55
1.1	Contexte, problème posé et positionnement . . . . .	55
1.2	Objectifs et originalité . . . . .	55
1.3	Méthode et outils . . . . .	55
1.4	Résultats . . . . .	56
1.5	Conclusions et perspectives . . . . .	56
2	Introduction . . . . .	56
3	Numerical Modeling & Simulation . . . . .	57
3.1	Geometry of the simulation . . . . .	57
3.2	Monte-Carlo simulator . . . . .	57
4	Prior Risk Analysis . . . . .	58
4.1	Identification of Factors . . . . .	58
4.2	Risk Ranking . . . . .	58
5	Screening of Relevant Factors . . . . .	61
5.1	Preliminary analysis . . . . .	61
5.2	Response variables . . . . .	62
5.3	Method & Results . . . . .	63
6	Discussion . . . . .	66
7	Conclusion . . . . .	66

---

<b>Partie IV</b>	<b>Analyse de prédiction <i>in silico</i> / <i>in vitro</i></b>	<b>69</b>
1	Contexte . . . . .	71
2	Problème posé, objectifs et originalité . . . . .	71
2.1	Exactitude du simulateur . . . . .	71
2.2	Objectifs . . . . .	71
2.3	Originalité . . . . .	71
3	Matériel, méthode et outils . . . . .	72
3.1	Matériel . . . . .	72
3.2	Méthode d'évaluation des résultats . . . . .	77
4	Résultats . . . . .	78
5	Conclusions et perspectives . . . . .	78

---



---

<b>Partie V</b>	<b>Analyse de prédiction <i>in silico</i> / <i>in cellulo</i></b>	<b>83</b>
1	Préambule . . . . .	85
1.1	Contexte, problème posé et positionnement . . . . .	85
1.2	Objectifs et originalité . . . . .	85
1.3	Méthode et outils . . . . .	86
1.4	Résultats . . . . .	87
1.5	Conclusions et perspectives . . . . .	87
2	Introduction . . . . .	88
3	Overview of the ranking process . . . . .	89
4	Experiments . . . . .	90
4.1	NPs and cells characteristics . . . . .	90
4.2	Distribution and quantification of NPs in cells . . . . .	90
4.3	Irradiation setup . . . . .	90
4.4	<i>In vitro</i> reference results . . . . .	91
5	Numerical modeling & simulation . . . . .	91
5.1	General information on our simulations . . . . .	91
5.2	<i>Scenario A</i> : classical Monte Carlo simulations . . . . .	93
5.3	<i>Scenario B</i> : our virtual screening process . . . . .	93
6	Results . . . . .	94
6.1	Monte Carlo ranking results . . . . .	94
6.2	<i>In vitro</i> analysis . . . . .	96
7	Discussion & conclusions . . . . .	98
<hr/>		
	<b>Conclusions générales et perspectives</b>	<b>103</b>
<hr/>		
<hr/>		
	<b>Bibliographie</b>	<b>105</b>

# Table des figures

1	Depth-dose curves normalized at the depth of maximum for 100 kV, 250 kV and 6 MeV beams (kV = photons, MeV = electrons). . . . .	15
2	Survival curve example. Illustration of our DMF assessment strategy. . . . .	21
3	Plot of the calculated DMF values from publications <i>versus</i> beam energy. For energies up to 200 kV, we identified 21 publications dealing with <i>in vitro</i> , 2 <i>in vivo</i> and 2 with both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experiments during the period 2008-2014. In the range from 200 kV to 1 MV, 3 <i>in vitro</i> publications were studied. Upon <i>in vitro</i> experiments, the DMF varies from 0.1 to 1.2. Lower values (which are representative of a high radiosensitization) were observed for lower energies. Concerning high-energy beams, 13 publications were analyzed for <i>in vitro</i> , 1 for <i>in vivo</i> experiments and 1 for both; 1 used a 4 MV beam, 13 a 6 MV, 1 a 10 MV and 1 a 15 MV. Upon <i>in vitro</i> experiments, the DMF varies from 0.7 to 0.8 for non targeted GNP, 0.5 for PEG-coated GNP and 0.6 for a Photofrin® and quantum dots combination. . . . .	22
4	Example of a standard irradiation setup for a 6 MV irradiation of a cell-well plate placed at the linear accelerator's isocenter under 5 cm of water-equivalent slabs. . . . .	24
5	Interactions of X-rays with NPs result directly or indirectly in the production of secondary species : photons, electrons and later ROS. Secondary photons or electrons are mostly generated either by photoelectric or Compton effect. The photoelectric effect interaction probability varies with $Z^4$ or $Z^5$ and dominant until the incident photon energy reaches $\approx 500$ keV . . . . .	26
6	From left to right : Illustration of a clinical scenario where a volume (blue) has to be irradiated while a part of an organ (green) has to be protected; A simple anterior beam is irradiating the blue volume; The beam energy is maximum in the irradiation field and is reduced out of the field; Given that the interaction probability is higher for low-energy photons, the radiosensitization in presence of NPs should be higher out of the irradiation field. In this case, the green volume that has to be protected would be in the most radiosensitized area. . . . .	27
7	Luminescence of APF probe after X-rays excitation of nanoparticles composed of a $Tb_2O_3$ core, polysiloxane shell in which and porphyrins are covalently linked. . . . .	30
8	Diagramme de classes des objets constituant le système de CAO Nano-iD . . . . .	39
9	Schéma de la constitution d'une NP dans GATE . . . . .	40
10	Vues orthogonales (face et profil) de NPs conçues sur GATE; à gauche, une NP avec un « loading » de $3*4 = 12$ atomes; à droite une NP avec un « loading » de $3*8 = 24$ atomes. . . . .	44
11	Exemple d'un cluster de $2*2*2$ NPs = 8 NPs agrégées. . . . .	45

12	Exemple d'un histogramme représentant le nombre de particules créées (ordonnées) en fonction de la nature des particules créées (abscisse). . . . .	46
13	Découpage de l'image sommée en régions d'intérêt. . . . .	46
14	Diagrammes en bâtons des paramètres du modèle de criblage des réponses Y1 à Y5 (gris : pas significatif, orange : probablement significatif, rouge : très probablement significatif). . . . .	48
15	Diagramme de Pareto des paramètres du modèle de criblage et par conséquent de l'influence des facteurs associés. . . . .	50
16	Graphical 2D representation of the geometry proposed by Delorme [1]; the yellow sphere is a GNP. . . . .	57
17	Ishikawa diagram of factors that have a potential impact on the simulation results	59
18	Diagram of the criticality score. Scores were calculated using the formula (7) and the values of the impact and uncertainty listed in Table 9 and 10. Green scores were considered non-significant and were not further analyzed. . . . .	60
19	3D view of a dose image with a visible enhancement in the GNP (white sphere); calculation boundaries are in green ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ) and analysis volumes boundaries in yellow . . . . .	62
20	On the left, 3D view of a dose image, the cube is cut into 3 slices A, B and C - on the right, 2D map of the dose enhancement, each slice is divided into 9 VOI (example is slice B). . . . .	63
21	Pareto diagrams of the estimated model parameters : $b_i$ for the dose enhancement in the seven studied volumes of interest and for the computational duration; . . .	65
22	Bar diagrams of the estimated model coef. : $b_i$ for the dose enhancement in the seven studied volumes of interest and for the computational time . . . . .	68
23	Vue du dessus, 3D et de face de la géométrie modélisée dans GATE . . . . .	74
24	Placement de sphères selon 1 dimension. . . . .	75
25	Placement de sphères selon 2 dimensions. . . . .	75
26	Placement de sphères selon 2 dimensions. . . . .	75
27	En (a), une vue 2D conceptuel où seules les sphères bleues contenues dans un volume sphérique ont été conservées; en (b), une vue 3D de l'utilisation de notre algorithme dans le cas d'une sphère globale de rayon 100 nm (en bleu) contenant de plus petites sphères de rayon 10 nm (en gris), le premier empilement hexagonal contenait 2002 sphères et après réduction, nous n'avons conservé que 527 sphères à l'intérieur du volume bleu; en (c) et (d), 2 répartitions aléatoires des sphères grises où seuls 50 objets ont été conservés. . . . .	76
28	Exemple de la répartition de dose dans notre système de 6 puits entourés de plaques RW3 dans les 3 plans transverse (a), sagittal (b) et frontal (c). La répartition de la dose a été normalisée à 100% au maximum du rendement en profondeur tracé le long de l'axe du faisceau. En (d), une vue des ROIs tracées dans le plan frontal avec en rouge la ROI du puits contenant les NPs. . . . .	79
29	Représentations visuelle des mesures de doses moyennes en [Gy] dans les ROI présentées en Figure 28 (d) sur les 5 coupes du plan frontal contenant les puits pour les 45 runs. Les points incohérents de (b) sont représentés en rouge. . . . .	80
30	Résultats du test de normalité d'Anderson-Darling. . . . .	81
31	Résultats de l'analyse de variance à un facteur. L'abscisse correspond aux doses moyennes dans les ROI des puits en Gy. Les barres horizontales indiquent l'intervalle de confiance à 95% pour chaque jeu de données. . . . .	81

---

32	Scheme of the irradiation setup that was used to deliver 2 to 10 Gy in the center of the well plates using a 6 MV beam with a field size of 30 cm x 30 cm . . . . .	91
33	Scheme of the geometry that was modeled in the simulator ; each volume material was set to G4_WATER except for the NPs that were either gold or iron structures	93
34	Energy spectrum of the particules entering into the U87 spherical structure . . .	94
35	TEM images of U87 cells in which we can see 20 nm iron NPs clusters (a) ; 20 nm gold NPs clusters (b) ; 50 nm gold NPs (c) and a control image without NP (d). .	95
36	Spectrum of the energy deposited into the cell structure in the presence of 20 nm iron NP clusters . . . . .	96
37	<i>Scenario A.</i> Mean $\pm$ 95% CI of the mean dose deposited into the cell structure for each type of NP ; values of the mean dose deposited into the cell structure are normalized so that the mean dose in water is equal to 1.000 ; results for the 50 nm gold NP are statistically different . . . . .	96
38	<i>Scenario B.</i> In ordinate, for each type of NP : values of the mean dose deposited into the cell structure normalized so that the mean of the values (green line) in water is equal to 100% ; values are horizontally distributed from the run #1 to #21	97
39	<i>Scenario B.</i> Mean $\pm$ 95% CI of the mean dose deposited into the cell structure for each type of NP ; values of the mean dose deposited into the cell structure are normalized so that the mean dose in water is equal to 1.000 ; results for the 20 nm iron NP are statistically different . . . . .	98
40	Radiation dose response curves for U87 cells exposed or not to NPs. Surviving fractions were normalized to that of non irradiated control cells in each of the experiments to correct for the direct cytotoxic effect of organometallic nanoparticles. Error bars are 95% CI. . . . .	99
41	3D view of a dose image from the <i>scenario B</i> with a visible enhancement in the vicinity of the iron NP clusters (black spheres) which are located inside the U87 cell ; the image boundaries are in red (1 $\mu$ m x 1 $\mu$ m x 1 $\mu$ m) . . . . .	100
42	Timeline comparison of our accelerated process versus a classical <i>in vitro</i> process. The <i>in silico</i> virtual screening process could save up to 56 days compared to the usual approach. . . . .	101



# Introduction générale

Le travail présenté dans ce manuscrit a été mené de façon partagée entre l'Unité de Physique Médicale du CHR Metz-Thionville et le département Santé Biologie Signal (SBS) du Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN, Université de Lorraine, CNRS UMR 7039). Il s'agit d'un travail interdisciplinaire situé à la frontière entre la biologie, l'automatique et la physique et dans lequel des spécialistes de ces trois domaines ont mis leurs compétences en commun au service de la nanomédecine en cancérologie. Cette thèse traite, en particulier, de l'utilisation des nanoparticules (NPs) qui, localisées à l'intérieur d'une zone tumorale, pourraient permettre d'augmenter les effets de la radiothérapie. Ces NPs sont alors dites radiosensibilisantes et on parle ainsi de radiothérapie augmentée par les NPs.

Afin de donner une définition non-ambigüe et standard de ce qu'est une NP, nous nous proposons de citer la norme ISO/TS 27687 : 2008 [2] qui spécifie que :

"Les nano-objets sont des substances dont l'une au moins des trois dimensions physiques est comprise entre 1 et 100 nm et qui présentent des propriétés spécifiques à l'échelle nanométrique. Un nano-objet ayant trois dimensions dans le domaine nanométrique sera appelé nanoparticule, avec deux dimensions nanofil et avec une dimension nanofeuillet. Pours, ils se présentent sous forme d'agrégats et/ou d'agglomérats de granulométrie moyenne dépassant le micron. Ils peuvent être utilisés en tant que tel (purs) ou intégrés à des matrices solides, liquides ou pulvérulentes. Lorsque les nano-objets sont inclus ou intégrés à la structure d'un matériau, les termes de nanomatériaux ou nanocomposites sont utilisés."

A noter, également, que les normes ISO/TS 800004-6 : 2013 et 800004-7 : 2011 [3,4] traitent respectivement de la liste des termes et définitions applicables à la caractérisation des nano-objets ainsi que des diagnostics et thérapies pour les soins de santé utilisant des nanoparticules.

Les nano-objets et par conséquent les NPs disposent de propriétés uniques qui les rendent très attractives sur le plan de l'innovation. Ces caractéristiques inédites sont notamment dues au fait que lorsque la taille d'une particule diminue, sa surface (relativement à son poids ou son volume) augmente. Ces nouvelles propriétés physico-chimiques et mécaniques ont pleinement contribué à l'apparition des NPs dans des domaines très divers tels que la santé, l'aéronautique, l'informatique ou l'automobile.

Les NPs peuvent être « fonctionnalisées » ce qui signifie que leur surface est modifiée afin de leur donner des fonctions supplémentaires (*e.g.* hydrophobie, anticorrosion, conduction). La fonctionnalisation est particulièrement intéressante pour les applications biomédicales (furtivité).

Tous semblent s'accorder sur le fait que le premier à avoir abordé le concept de nanotechnologie était le physicien Richard Feynman en 1959 durant son oral intitulé "There are plenty of room at the bottom" [5]. Il y aborda un grand nombre d'hypothétiques applications pouvant résulter de manipulations de la matière à l'échelle nanométrique.

Un point particulier de son discours mérite d'être développé :

"A friend of mine (Albert R. Hibbs) suggests a very interesting possibility for relatively small machines. He says that, although it is a very wild idea, it would be interesting in surgery if you could swallow the surgeon. You put the mechanical surgeon inside the blood vessel and it goes into the heart and "looks" around (of course the information has to be fed out). It finds out which valve is the faulty one and takes a little knife and slices it out."

Il aura décrit de manière très imagée ce qui sera bientôt l'application des NPs dans le domaine de la santé : un dispositif d'origine humaine, injecté à un patient, capable de cibler la zone à traiter puis d'avoir une action thérapeutique. Les nanoparticules, ayant des tailles jusqu'à mille fois inférieures à une cellule humaine, peuvent ainsi transporter des principes actifs comme des agents anticancéreux, aider à localiser des tumeurs ou/et être utilisées en tant qu'agent thérapeutique en fonction de leurs propriétés physiques et chimiques. Un intérêt majeur des nanoparticules réside dans la possibilité de pouvoir cibler plus spécifiquement les cellules tumorales. Certaines nanoparticules peuvent aussi améliorer l'efficacité de thérapies classiques en cancérologie comme la radiothérapie utilisée dans le traitement de plus de 50% des cancers. En effet, une des limites de la radiothérapie est que la dose nécessaire pour détruire les cellules néoplasiques (*i.e.* tumorales) est très proche de la dose nocive pour les cellules normales. De plus, dans certains cas, malheureusement, les cellules tumorales sont particulièrement radio-résistantes et l'effet des traitements classiques est alors réduit. Au lieu d'agir sur la nature et la puissance des rayonnements utilisés, l'innovation thérapeutique via la nanomédecine vise à augmenter la sensibilité du tissu cible tumoral aux rayons ionisants grâce à des nanoparticules

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse sont divisés en trois grandes parties qui concernent l'utilisation des nanoparticules pour augmenter les effets de la radiothérapie. Chaque partie a fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique dont le contenu a été intégralement incorporé en anglais à ce travail de thèse.

La première est le fruit d'une recherche bibliographique des articles scientifiques affichant les mots clef *radiation therapy* (ou *radiotherapy*) et *nanoparticles* publiés durant la période 2008-2014 et qui s'est concrétisée par la parution d'un état de l'art dans une revue internationale [6]. Ce dernier identifie les paramètres jouant un rôle clef dans l'augmentation de la radiothérapie par les nanoparticules. Nous avons étudié les paramètres qui ne dépendent pas du design de la NP : (i) la méthode d'évaluation biologique, (ii) l'énergie de la source de rayonnement et (iii) la méthode d'irradiation puis l'influence des caractéristiques physico-chimiques de la NP sur : (i) les interactions entre les rayons X et les NPs, (ii) la génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) par les NPs sous irradiations et enfin (iii) la sélectivité tumorale, la captation des NPs par les cellules, la localisation intracellulaire des NPs et leur biodistribution. Nous avons réalisé une analyse numérique de l'influence de l'énergie des rayonnements incidents sur le degré de radiosensibilisation des NPs en étudiant les courbes de survie présentées dans 64 articles. Cette analyse a mis en évidence une forte variabilité des résultats obtenus avec des sources de faible énergie et une étonnante homogénéité dans ceux qui sont liés à des faisceaux produits par des accélérateurs de particules (haute énergie). Le manque de standardisation dans l'évaluation de la radiothérapie augmentée par les NPs nous est apparu comme un frein et un verrou à leur futur développement clinique. C'est également ce qui a été observé par Etheridge *et al.* dans un article intitulé "*The big picture on nanomedicine : the state of investigational and approved nanomedicine products*" [7] et dans lequel il spécifie que "*Many of the revolutionary nanomedicine technologies anticipated in the literature may be 20 or more years from clinical use.*". C'est

---

cette même citation qui nous a motivé dans l'orientation stratégique de la problématique pour ce travail de thèse : comment réduire significativement le temps de développement préclinique des NPs à visée radiosensibilisante ?

Suite à cette étude de la littérature et avec l'objectif d'améliorer la pertinence des études précliniques qu'une plateforme informatique de simulation Monte-Carlo des interactions NPs – rayons X a été développée (basée sur Geant4-GATE). Cette dernière a pour objectif de réaliser un classement *in silico* rapide et fiable des NPs radiosensibilisantes, permettant d'identifier de façon efficiente les nanostructures présentant les propriétés les plus prometteuses. La seconde partie de cette thèse consiste en : (i) une description technique du savoir faire associant ce simulateur à une méthode de plans d'expériences numériques qui a fait l'objet du dépôt d'une enveloppe Soleau à l'INPI puis (ii), une analyse de robustesse du simulateur, visant à identifier les paramètres de variabilité intrinsèques au simulateur et à quantifier leur influence sur la variation des résultats. Le savoir faire exposé dans cette partie (technologie intitulée "Nano-iD") nous a permis de remporter le prix de la "Technologie offrant les meilleures opportunités de développement économique en Lorraine" identifiée dans le cadre de la Bourse aux Technologie "Matériaux, Energies et Procédés" organisée le 6 juin 2014 à l'Ecole des Mines de Nancy. Concernant l'analyse de robustesse du simulateur, afin d'avancer vers une plus grande standardisation des pratiques, il nous a paru indispensable de caractériser le code que nous souhaitons utiliser pour notre processus de classement *in silico*. Pour cela, nous avons établi une méthodologie d'analyse de robustesse des simulateurs dédiés aux nano-radiosensibilisateurs et l'avons utilisée sur Geant4-GATE. Cette analyse de robustesse a fait l'objet d'une soumission à publication dans le journal IEEE Transactions on Nanobioscience d'un article intitulé "Robustness Analysis of a Geant4-GATE Simulator for Nano-Radiosensitizers Characterization" [8].

Enfin, dans une troisième partie, nous avons utilisé notre outil de simulation pour l'appliquer au screening (criblage) virtuel de NPs radiosensibilisantes. Nous avons tout d'abord réalisé une analyse de prédiction *in silico* / *in vitro* en tentant de prédire la dose déposée, au niveau macroscopique, dans un objet test contenant des NPs diluées dans l'eau. Ceci nous a conduit à développer un code nous permettant de répartir de façon aléatoire des structures (NPs) dans l'espace. La divergence parfois constatée entre les résultats *in silico* et *in vitro* nous a amené à nous concentrer sur la prédiction *in silico* / *in cellulo*, faite elle, au niveau microscopique. Suite à l'étude de la littérature et aux constatations faites dans la première partie du manuscrit, nous avons pris le parti, original et innovant, de tenir compte de la biodistribution des NPs dans nos simulations Monte-Carlo de prédiction *in silico* / *in cellulo*. Dans cette dernière étude, nous avons pu mettre en évidence dans un cas simple en comparant 3 NPs et un type de cellule (glioblastome U87), que grâce à notre processus de criblage virtuel, nous étions capable de prédire *in silico* le classement *in cellulo* de l'effet radiosensibilisant des NPs étudiées. Si ce processus était appliqué à une plus grand échelle, nous avons la conviction qu'il permettrait de diminuer de façon significative le temps de développement préclinique des NPs à visée radiosensibilisantes. Ce processus de criblage virtuel *in silico* / *in cellulo* a fait l'objet d'une soumission à publication dans le journal Nanoscale d'un article intitulé "Monte Carlo simulations guided by imaging to predict the *in vitro* ranking of radiosensitizing nanoparticles".

Les perspectives à court et moyen termes de mes recherches sont développées dans le chapitre de conclusion de ce manuscrit.





## Première partie

# Etat de l'art des nanoparticules activées par rayonnement à finalité médicale



# 1 Préambule

## 1.1 Contexte

Cette première partie est le fruit d'une recherche bibliographique grâce à laquelle nous avons souhaité accumuler des connaissances, les plus variées possible, sur l'utilisation des NPs en radiothérapie. L'équipe du projet BEAM "Cybernétique des thérapies par rayonnements" du département SBS du CRAN ayant déjà une expérience de l'utilisation des NPs en thérapie photodynamique [9–12], cette étude nous a paru indispensable afin de mettre en exergue les verrous de la stratégie NPs et radiothérapie .

## 1.2 Problème posé

L'utilisation des NPs en général et pour la radiothérapie augmentée en particulier, est un domaine en pleine expansion. Le nombre de publications scientifiques sur le sujet ne cesse d'augmenter d'année en année si bien qu'il devient impératif de publier des études de revues dont le but est de résumer les travaux et les dernières connaissances utiles. D'autant plus que le champ des disciplines concernées est très vaste : biologie, physique, mathématique, automatique, informatique pour n'en citer que quelques-uns.

Au travers de cette analyse critique de la littérature, nous avons également pu constater des différences significatives dans les approches choisies par les auteurs. Une grande majorité des articles sur le sujet vise à évaluer le pouvoir radiosensibilisant d'une NP en particulier. Néanmoins, la plupart des équipes ont utilisé un type de cellule, une source d'irradiation, une méthode d'évaluation de la survie des cellules ou même une méthode de calcul de l'effet radiosensibilisant différent, ce qui rend impossible la comparaison des résultats.

Nous avons également constaté qu'une partie des conditions expérimentales, d'irradiation notamment, utilisées pour évaluer les NPs étaient loin des conditions réunies classiquement en radiothérapie (équilibre électronique, prise en compte de la rétro-diffusion, etc.) ce qui pose implicitement des questions quant à la reproductibilité et la fiabilité des résultats.

## 1.3 Positionnement

Nous avons réalisé une étude bibliographique des articles scientifiques affichant les mots clef *radiation therapy* (ou *radiotherapy*) et *nanoparticles* publiés durant la période 2008-2014. Cette étude a fait l'objet d'un article de revue dans laquelle nous avons souhaité faire apparaître le regard du physicien médical, absent de la quasi-totalité des articles étudiés [6].

Suite aux constatations faites précédemment et après avoir étudié plus de 64 articles qui traitaient de l'évaluation du pouvoir radiosensibilisant de NPs, nous avons souhaité formuler certaines remarques et faire des propositions allant dans le sens d'une standardisation des pratiques.

## 1.4 Objectifs et originalité

Lors de l'écriture de cette revue de la littérature, nous avons 4 objectifs majeurs :

- premièrement, donner une vision nouvelle de la littérature sur la radiothérapie augmentée par les NPs en y apportant, en plus de la vision du biologiste et du chimiste, celle du physicien médical jusque là absente des analyses sur le sujet ;
- avoir une approche pluridisciplinaire en identifiant un maximum de paramètres influents sur la radiosensibilisation qu'ils soient liés à la NP en elle-même (taille, matériau, couche

externe, etc) ou à son environnement (méthode d'évaluation biologique, énergie de la source d'irradiation, méthode d'irradiation, etc) ;

- proposer des pistes de standardisation permettant, à l'avenir, de pouvoir effectuer des comparaisons entre les études afin d'accumuler plus facilement des données multi-centriques nous facilitant la compréhension des mécanismes responsables de la radiosensibilisation par les NPs et nous permettant d'amener plus rapidement des nano-objets vers des études cliniques ;
- identifier une méthode de mesure de la radiosensibilisation cliniquement pertinente et l'utiliser en menant une étude quantitative sur un maximum d'articles expérimentaux afin d'identifier une influence, notamment de l'énergie de la source de rayonnement, dans l'efficacité des NPs.

Ces objectifs sont également l'expression de l'originalité de notre étude et de notre volonté, au moment de son écriture, de voir apparaître des NPs en études cliniques le plus rapidement possible.

## 1.5 Méthode et outils

Après avoir étudié les différentes mesurandes de l'augmentation de la radiosensibilisation par les NPs et avoir sélectionné les plus pertinentes, nous nous sommes focalisés sur l'étude des paramètres indépendants du design de la NP :

- la méthode d'évaluation biologique ;
- l'énergie de la source de rayonnement ;
- la méthode d'irradiation (le montage expérimental en particulier).

puis l'influence des caractéristiques de la NP sur :

- les interactions entre les rayons X et les NPs ;
- la génération d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) par les NPs sous irradiations ;
- la sélectivité tumorale, la captation des NPs par les cellules, la localisation intracellulaire des NPs et leur biodistribution.

Afin d'évaluer l'impact de l'énergie de la source de rayonnement sur l'augmentation de la radiothérapie par les NPs, nous avons utilisé la mesurande préconisée par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) [13] afin d'analyser 64 études expérimentales. Cette dernière est le *Dose Modifying Factor* (DMF) défini comme suit :

$$DMF = \frac{\text{Dose nécessaire pour atteindre un certain \% de survie cellulaire en présence de NP}}{\text{Dose nécessaire pour atteindre le même effet en absence de NP}} \quad (1)$$

Nous avons mesuré cette grandeur sur l'ensemble des courbes de survie cellulaire disponibles dans les 64 articles étudiés et avons synthétisé les valeurs de DMF obtenues en fonction de l'énergie de la source utilisée pour irradier les NPs. Nous avons choisi de fixer la "dose nécessaire pour atteindre le même effet en absence de NP" à 2 Gy puisque c'est une dose cliniquement pertinente. Nous n'avons pas réalisé de distinction entre les types de NP ou de cellule irradiées par manque de données comparables. L'ensemble des 64 articles étudiés et les DMF associés aux courbes de survie disponibles ont été résumés dans un tableau afin de permettre, en toute transparence, à d'autres auteurs d'étendre cette étude ou d'évaluer leurs propres résultats. Nous avons également profité de cette étude pour recenser les articles analytiques ou utilisant une méthode de Monte-Carlo pour évaluer ou prédire le pouvoir radiosensibilisant d'une NP.

Finalement, dans une dernière partie, nous avons souhaité présenter une application future potentielle des NPs radiosensibilisantes combinant la thérapie photodynamique à la radiothérapie externe.

## 1.6 Résultats

Parmi les différentes informations recueillies durant cette étude bibliographique, voici celles que nous avons trouvées les plus intéressantes.

Nous avons distingué 3 grands groupes de mesurandes de l'augmentation de la dose par les NPs. Nous pensons que le DMF est l'indice de modification de dose le plus utile. Néanmoins, pour l'appliquer, il est souvent nécessaire de réaliser des interpolations entre les points constitutifs de la courbe de survie et certains auteurs ont choisi d'utiliser le modèle Linéaire Quadratique (LQ) afin d'approximer au mieux son allure. Cependant, *a priori*, rien n'indique que le modèle LQ soit applicable à de la radiothérapie augmentée par les nanoparticules, il est donc important de l'utiliser avec beaucoup de précautions. L'étude du DMF nous a permis de déceler une tendance quant à l'influence de l'énergie de la source dans les résultats. Alors que les résultats sont très hétérogènes pour les basses et moyennes énergies (faisceaux de rayons X de 30 à 400 kV), ils sont étonnamment proches pour les faisceaux de haute énergie (6 ou 18 MV). Nous pensons que ceci est dû à la grande variabilité dans la conception des sources de basses et moyennes énergies alors que les faisceaux générés par des accélérateurs de particules médicaux sont très semblables. Ceci les rend de fait très adaptés aux comparaisons inter-laboratoires. De plus, nous souhaitons mettre l'accent sur le fait qu'alors même que la quasi totalité des études Monte-Carlo sur le sujet prévoient une augmentation de la dose par les NPs irradiés par un faisceau de haute énergie plus que négligeable, nous avons mis en exergue, pour la première fois, qu'en moyenne le DMF associé aux faisceaux de 6 MV était de 0,65 ; si ce chiffre était transposé à la clinique, cela voudrait dire que l'effet obtenu avec une irradiation de 2 Gy / séance en absence de NP serait le même qu'une irradiation de 1,3 Gy / séance en présence de NPs dans la zone à irradier. Cela permettrait donc de diminuer très significativement les effets secondaires indésirables dues à l'irradiation des tissus sains ou d'augmenter fortement les doses sur les zones à irradier.

Certaines questions sont toujours en suspens en ce qui concerne les interactions entre les rayons X et les NPs. La théorie de l'interaction photons-matière prédit que les principaux mécanismes menant à une ionisation dans le cadre de la radiothérapie sont la diffusion Compton (prédominant à haute énergie) et l'effet photoélectrique. Ce dernier ayant une probabilité d'occurrence proportionnelle à  $Z^4$  ou  $Z^5$  ( $Z$  étant le nombre de proton des atomes du milieu traversé), son importance sera augmentée si la tumeur contient des NPs métalliques dont le  $Z$  est élevé. Cependant le rôle des électrons Auger reste controversé. Certains auteurs comme McMahan *et al.* semblent affirmer que la contribution des électrons Auger dans le processus de radiosensibilisation par les NPs était dominante [14] tandis que Douglass *et al.* ont réussi à prouver le contraire en utilisant le même code de simulation Monte-Carlo (Geant4) [15].

## 1.7 Conclusions et perspectives

Le manque de standardisation dans l'évaluation de la radiothérapie augmentée par les NPs nous apparaît comme un frein à leur futur développement clinique. C'est également ce qui a été observé par Etheridge *et al.* dans un article intitulé "*The big picture on nanomedicine : the state of investigational and approved nanomedicine products*" [7] et dans lequel il spécifie que "*Many of the revolutionary nanomedicine technologies anticipated in the literature may be 20 or more years from clinical use.*"

Ce constat est devenu notre fil conducteur pour la suite de cette thèse puisque suite à cette étude bibliographique, nous avons décidé d'élaborer un processus de criblage informatique permettant d'accélérer la détection des nanoparticules les plus prometteuses dans le but de faciliter l'étape de développement préclinique. Cette dernière étant la plus longue et la plus onéreuse du

processus d'élaboration d'un nano-médicament.

Cette partie a fait l'objet d'une publication dans le journal *Theranostics* en 2015 [6] et qui est retranscrite ci-après. Cet article a été sélectionné pour faire la couverture du mois de septembre 2015 du journal ce qui a fait l'objet d'une nomination aux PEPITs 2015 du CRAN qui retracent les événements marquants du laboratoire durant l'année.

## 2 Introduction

Nanomedicine is based on drug delivery using organic nanomaterials as nanocarriers [16]. Inorganic-based nanomaterials are mostly developed for other health care applications such as *in vitro* diagnosis and *in vivo* imaging. For example, magnetic nanoparticles (NP) are used for cell sorting applications in clinical diagnosis or magnetic resonance imaging (MRI) [17]. More recently, nanomaterials have been developed to play a pivotal therapeutic role by their own. A prominent illustrative example is NPs-based magnetic hyperthermia being developed for the treatment of cancer by the startup Magforce. In this treatment, aminosilane-coated magnetic NPs are injected into the tumor and subsequently heated with a newly developed magnetic field applicator in order to induce apoptotic cell death [18].

Over the last decades, many research programs dealt with *in vitro* and *in vivo* applications of NPs in radiation therapy. Given that radiation therapy is not a selective antitumor treatment, the main challenge for radiation oncologists, medical physicists and radiobiologists is to increase its therapeutic efficacy without increasing damages dealt to the surrounding healthy tissues. Hence, the goal of combining NPs with radiation therapy is to increase the differential effect between healthy and tumor tissues.

Different mechanisms of interaction between X-rays and NPs are expected according to NPs chemical nature. We could distinguish between (i) high atomic number Z, NPs that enhance the photoelectric and Compton effects (and thus the subsequent emissions of secondary electrons) to increase conventional radiation therapy efficacy; (ii) X-ray triggered drug-releasing NPs that, for instance, uses drug-loaded NP [19]. Under irradiation, the NP capsule is destroyed and the drug is released inside the targeted tissues. (iii) Self-lighting photodynamic NPs that are usually made of a lanthanide-doped high-Z core [20]. Once irradiated by X-rays, the scintillator core emits a visible light and activates a photosensitizer that generates singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) for tumor destruction. These NPs combine both photodynamic therapy (PDT) that generates reactive oxygen species (ROS) and enhanced radiation therapy (high-Z core).

The present review focuses on the radiosensitization strategies that use high-Z NPs. In this context, these NPs can intensify the production of secondary electrons and ROS that in turn enhance radiation therapy effects. The most studied NPs are gold-based NPs (GNPs) that were widely described in particular by Hainfeld *et al.* [21]. Recent studies have also reported the use of lanthanide-based NPs, titanium oxide nanotubes or cadmium selenide quantum dots [22–25]. For example, gadolinium-based NPs, besides their high-Z, offer an innovative approach due to their capacity to act as powerful contrast agents in MRI [26]. Interestingly, some authors used silver-based NPs to take advantage of its excellent surface enhanced Raman scattering and broad-spectrum antimicrobial activities [27].

There are only few NPs available on the market which is probably a consequence of the

difficulties to create large-scale production with adapted characterizations and the high-cost of the whole process. In a recent review, Coulter *et al.* [28] highlight the gap between the wealth of preclinical data supporting high-Z NPs as effective radiosensitizers and the low number of clinical studies (indeed only one phase I clinical trial) and regret the lack of rigorous and systematic methodologies to evaluate NPs efficacy. In agreement with this observation, we focused on the critical parameters that could influence the radiosensitizing power of nanoparticles and methods used to assess the radiosensitizing properties of high-Z nanoparticles *in silico*, *in vitro* and *in vivo*.

The aim of this review is not to establish for the first time an exhaustive list of the works in this field but rather propose constructive criticisms pointing out critical factors that could improve the nano-radiation therapy strategies. While most reviews show the chemists and/or biologists points of view, the present analysis is also seen through the prism of the medical physicist.

We have studied 64 papers that mentioned the words *radiation therapy* (or *radiotherapy*) and *nanoparticles* during the period late 2008 - 2014. In our meta-analysis, we have distinguished on one side, the factors unrelated to nanoparticle, and on the other, parameters depending on the nanoparticle design. Notably, we have carried out a numerical analysis to assess the influence of the irradiation source by measuring the dose modifying factor on survival curves for *in vitro* studies which used clinical X-rays only (no isotopes, ions, synchrotron or electron beams). Furthermore, this paper describes the multi-scale impact of nanoparticle design, as it could determine the interaction probability with ionizing radiations (we considered X-rays only), the capacity to generate ROS and the cellular localization or tissue distribution of NPs.

### 3 How to measure the nanoparticles-mediated improvement ?

In this part, following the description of recommended methods to measure *in vitro* radiation therapy efficacy, we will detail three approaches to assess the enhancement of radiation therapy efficacy by NPs : (i) the determination of the Dose Modifying Factor (DMF) based on survival curves, (ii) the determination of the Nanoparticle-mediated Enhancement Ratio (NER) after a single radiation dose and (iii) the variation of the ROS production upon irradiation.

When possible, the DMF should be chosen over the NER which can be seen as a “special case” of the DMF where only one irradiation dose had been applied. The measurement of the ROS production can be done alone or in addition to the DMF/NER evaluation in order to find which lethal effects are prevailing.

#### 3.1 In vitro assessment of radiation therapy effect

In radiation therapy, clinically relevant dose of radiation generate DNA damage that could lead to early cell death but rather result in cell death after one or more cell divisions. Hence, a cell is “radiobiologically dead” only if its reproductive integrity is lost. *In vitro*, the gold standard to evaluate the cytotoxicity of ionizing radiations is the clonogenic assay (also called CFU assay for Colony Forming Unit) as it tests every cell in the population for its ability to undergo unlimited division, thus taking into account the “cell reproductive death” [29]. Results of clonogenic assay are generally plotted as “survival curves” which represent the fraction of surviving cells as a function of the dose (typically 0 to 10 Gy). The linear-quadratic (LQ) model is the most common



representation used to fit the experimental curves and to describe cell survival. For a single fraction at a dose  $D$  [Gy], the fraction of surviving cells  $S$  is described by the LQ model as :

$$S = \exp - (\alpha \cdot D + \beta \cdot D^2) \quad (2)$$

where  $\alpha$  and  $\beta$  are two model parameters. The LQ model also allows the estimation of the SF<sub>2</sub> parameter that describes the survival fraction at 2 Gy, *i.e.* a dose fractionation widely used in clinical practice for curative treatments. Even though the LQ model is widely used in radiation therapy studies, it is also still controversial [30]. Moreover, it was not proven that the LQ model could describe dose-effect relations in the presence of NPs and it should therefore be used with care.

### 3.2 Measurement of the DMF on survival curves

To evaluate the efficacy increase in classical radiation biology, it is customary to use the Relative Biological Effectiveness (RBE) which is defined as the ratio of a dose of standard radiation (*e.g.* photons) to a dose of any other type of ionizing particles (*i.e.* protons, neutron, *etc*) to produce the same biological effect [31]. The RBE is clinically relevant as it could allow clinicians to adapt the delivered doses according to the performances of the new therapeutic system or strategy, in comparison to conventional treatments. For example, medical physicists and radiation oncologists would have to deliver 30 Gy with NPs instead of delivering 60 Gy, if the therapeutic strategy “X-rays with NPs” was characterized by a RBE of 2. The concept of RBE has already been discussed by the International Commission on Radiological Protection (ICRP) [32] and the International Commission on Radiation Units & Measurement (ICRU) [33].

The RBE is very close to the concept of DMF that applies to radiosensitizers or radioprotectors and should be useful and relevant with NPs. As defined by the International Atomic Energy Agency (AIEA) [13], the DMF is :

$$DMF = \frac{\text{Dose to produce an effect with radiosensitizer / radioprotector}}{\text{Dose to produce an effect without radiosensitizer / radioprotector}} \quad (3)$$

Typically, *in vitro* experiments yielding to survival curves and LQ model parameters are suitable and useful to determine the DMF.

For example using the results of Jain *et al.* [34] who irradiated MDA-MB-231 cells with a 6 MV accelerator, we measured a SF<sub>2</sub> of 72.3%. Then we observed that the dose in presence of 1.9 nm GNPs, which lead to a survival fraction of 72.3%, is 1.39 Gy. Therefore the DMF calculated from this particular set of results is equal to 0.695. As the DMF is inferior to 1, the GNPs used by Jain *et al.* have an *in vitro* radiosensitizing power at 6 MV regarding MDA-MB-231 breast cancer cells.

### 3.3 Measurement of the NER (mono-dose)

Even though the DMF is a relevant parameter for clinical practice, it is not systematically available in preclinical studies that evaluate and compare the radiosensitizing properties of specific NPs. Indeed, the DMF determination implies to test different doses of radiations and this approach is not always feasible, in particular in *in vivo* studies. Some authors have just compared biological effects induced by X-ray therapy in presence or absence of NPs for a single radiation dose. In these cases, only the “NP-mediated” Enhancement Ratio (NER, by similarity to the

well-known oxygen enhancement ratio) is available [35].

As an illustration, Xiao *et al.* [36], evaluated the viability of HeLa cells after an exposition to multifunctional core/satellite nanotheranostics followed by an irradiation of 6 Gy. We measured that the cell viability without nanotheranostics after a 6 Gy irradiation was 88%. The viability for 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of nanotheranostics after a 6 Gy irradiation was 69%. Therefore the NER for this result is 0.784.

### 3.4 Measurement of ROS

Although the role of ROS in the treatment of cancer is controversial, the evaluation of their production could bring new information concerning the radiosensitizing effect of the studied NPs.

Because of the high sensitivity and the simplicity in data collection, some authors [37–39] have chosen to assess the radiosensitizing power of NPs by measuring variations in the production of ROS upon irradiation. To assess that, authors have conducted experiments in solution (water or other solvent) or *in vitro* using chemical probes that fluoresce in presence of ROS. Fluorescence was commonly monitored using fluorescence spectroscopy or microscopic imaging techniques due to their high spatial resolution.

For example, Takahashi *et al.* proved the improvement of ROS generation of their CdSe NPs under irradiation using hydroethidine-dihydroethidium (DHE) which is a reagent that is converted to ethidium on reaction with ROS such as  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HOO}\cdot$  and  $\text{OH}\cdot$ . Generation of ROS was observed as a function of X-rays doses in aqueous solution, and its amount depended on the concentration of NPs [24]. More recently, Townley *et al.* evaluated the formation of ROS by their titanium NPs after irradiation in water using coumarin that reacts with ROS to generate highly fluorescent 7-hydroxycoumarin. In the absence of NPs they observed no fluorescence. In the presence of NPs, bright fluorescence indicated ROS production [40]. Few authors described results that followed the same tendency [28, 41–43].

According to the chemical probe chosen, authors have focused on different ROS. Misawa *et al.* reported the use of the chemical probe aminophenyl fluorescein (APF) to analyze the GNP-induced enhancement of  $\text{OH}\cdot$  as this fluorescein derivative yield a bright green-fluorescent product when it reacts with  $^1\text{O}_2$  or  $\text{OH}\cdot$  [38]. Similarly, Gara *et al.* [39] used phenol (PhOH), furfuryl alcohol (FFA) and histidine (HIS) as scavengers to evaluate the ROS formation of silicon NPs. They showed that the NPs are capable of enhancing the yields of  $\text{O}_2^-/\text{HO}_2\cdot$  and  $\text{OH}\cdot$  in aqueous suspensions as a consequence of X-rays absorption. Moreover,  $^1\text{O}_2$  is formed in irradiated solutions only in the presence of the NPs.

Among the 64 papers we analyzed, 7 papers are dealing with the *in vitro* evaluation of ROS. They all used the cell-permeable fluorogenic probe DCFH-DA, commonly known as dichlorodihydrofluorescein, supplied as the diacetate ester. It is used as an indicator of ROS. Following enzymatic or base-catalyzed cleavage of the diacetate groups, it is readily oxidized to the highly fluorescent product dichlorofluorescein (DCF).

## 4 Parameters not depending on nanoparticles design

The present paragraph focuses on nanoparticle-independent parameters that can significantly alter the radiosensitizing power of NPs, *i.e.* : (i) the biological evaluation methodologies, (ii) the energy of the incident photon beam and (iii) the irradiation setup.

### 4.1 Biological evaluation methodology

Consistently with classical experimental methods in radiobiology, lot of authors performed clonogenic assays to compare the cytotoxicity of radiations with or without NPs [24, 44–47]. Chang *et al.*, Liu *et al.* and Butterworth *et al.* reported radiation dose-survival curves, allowing the comparison of response profiles, while Chang *et al.*, Roa *et al.*, Rima *et al.* and Coulter *et al.* tested only one dose of radiation. Most of studies focused on results obtained after 2 Gy-irradiation as this dose is consistent with radiotherapy clinical fractionation [45, 46, 48]. To evaluate the radiosensitizing effect of NP, other biological tests such as viable cell count using Trypan blue, metabolic assays, apoptosis detection, or  $\gamma$ H2AX *foci* detection were also reported, alone and instead of clonogenic assays, or in addition and in comparison to them. It is noteworthy that in many cases, these biological tests have been conducted before clonogenic assays and applied to NP alone. Metabolic assays used were mainly based on the enzymatic reduction of tetrazolium dye (MTT, MTS, WST-1) but also on the resazurin sodium salt reduction (Alamar blue test) [35]. Except in Liu *et al.* study, articles concluded to a reduced cell viability rate when irradiation was combined with NP exposure [46]. When comparison was possible, results of metabolic assays and clonogenic assays were concordant [42, 45, 49, 50]. Even though the “time” was not systematically mentioned, it is noteworthy that these metabolic tests could have been performed at different time post-irradiation. According to whether they were made in short- or long-term after irradiation, the results obtained do not reflect the same mechanisms of cell loss. Indeed, Mowat *et al.* that have measured cell viability 7 days post-irradiation have included the radiation-induced mitotic cell death [51], while several works only considered the cell death occurring in the first 24h or 48h [45, 49].

Few authors have also investigated cell apoptosis to compare radiation cytotoxicity with or without NP exposure. Cell apoptosis have been detected by flow cytometry after Annexin-FITC staining [42, 52] or by identifying the sub-G1 population [28, 45]. Authors demonstrated an increase in cell apoptosis when irradiated cells were in contact with NP.

Instead of or in complement with methods to evaluate cell survival, many authors have compared the radiation-induced DNA damage in presence or absence of NP. Experiments were based on the detection of DNA double-strand breaks as they are the most lethal lesions. To do that, differential plasmid DNA migration on agarose gel electrophoresis [53, 54] and comet assays [55] have been reported. More frequently, *foci* of  $\gamma$ H2AX and/or *foci* of 53BP1 which are well-known as markers of DNA double strand breaks were detected by immunofluorescence techniques. *In fine*, the interpretation of results remains difficult because of the heterogeneity of protocols used. In some studies, authors have fixed cells rapidly post-irradiation and have thus investigated the number of radiation-induced lesions while in other cases [46, 56], authors have followed the capacity of cells to repair DNA double strand breaks, assuming that only unrepaired lesions could cause cell death [57].

*In vivo* experiments aiming to evaluate the radiosensitizing potential of NPs have been per-

formed using tumor xenografts in immunodeficient rodents and tumor growth or animal survival have been followed [26, 52, 58–60]. In case of NP with imaging application, orthotopic models, notably intracranial xenografts were preferred as they are more relevant than subcutaneous ones [26, 60]. According to studies, the route of NP administration differed : intratumoral injection reported by Maggiorella *et al.* or Chattopadhyay *et al.* allowed to overcome the problems of biodistribution [56, 59] ; by contrast, for intravenous or intraperitoneal administrations [52, 60] it could be necessary to optimize the drug-irradiation interval [26]. Generally, irradiation to treat tumor-bearing animals was delivered as a single dose comprised between 5 and 35 Gy [60, 61]. Only Maggiorella *et al.* have tested a fractionated schedule (2 x 4 Gy) [59].

Histological observation and immunohistochemical analysis have been carried out to illustrate treatment-induced cell death. Especially, the TUNEL assay allowing the apoptosis detection has been reported [44, 59].

## 4.2 The energy of the incidents X-rays (source)

In X-ray external radiation therapy, low energy beams (until 200 kV) have very few applications and are dedicated to skin treatments (< 5 mm in depth, *e.g.* melanoma, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, keloid) (Figure 1). Medium energies 200 kV to 1 MV (orthovoltage and supervoltage X-rays) were widely used for shallow treatments since the 1930's – 1940's but became less advantageous at the advent of high-energy electrons during the 1960's – 1970's. Nowadays, high-energy beams, also called megavoltage beams, (1 to 25 MV) are by far the most commonly used as they allow the treatment of deep tumors (> 2 cm in depth).

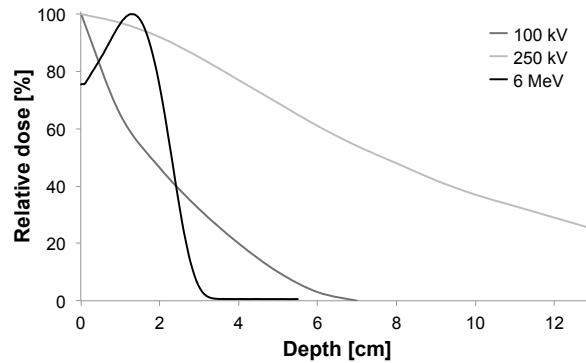


FIGURE 1 – Depth-dose curves normalized at the depth of maximum for 100 kV, 250 kV and 6 MeV beams (kV = photons, MeV = electrons).

As the impact of the beam energy on the RBE (without NPs) has already been shown [62], it is then legitimate to ask whether the beam energy would have an impact on the radiosensitizing properties of high-Z-NPs. Cell damages following interactions between X-rays and high-Z NPs mostly result from the photoelectric effect which is prevailing until the photon energy reaches 500 keV (*e.g.* for Au). As a consequence, one could conclude that the radiosensitizing effect of these NPs should be stronger for low-energy beams. However, radiation therapy beams are poly-energetic, and high-energy spectra have a low-energy component which triggers photoelectric effects. Moreover the medium- and high-energy components should theoretically interact with matter (here in high-Z NPs and biological matter) by Compton effect, therefore releasing lower

energy photons. These latter, depending on their energy, trigger in turn either photoelectric or Compton effects. That is why a substantial radiosensitizing effect of high-Z NPs can be expected for high-energy beams.

In order to assess this crucial question, we have carried a numerical analysis only based on *in vitro* results; corresponding studies have been summarized in Table 1. Indeed, among the publications that we studied, 18 evaluated the radiosensitizing effect of NPs using an analytical method or a Monte Carlo simulation algorithm (MCNP5, MCNPX, Geant4, PENELOPE or EGSnrc) often comparing kV and MV photons. We did not take them into account because Butterworth *et al.* [52] have already shown that *in vitro* experiments did not fit early physical predictions. Even though, we reported these publications in the Table 2.

TABLE 1 – *In vitro* or *in vivo* experiments dealing with the radiation therapy enhancement by nanoparticles

Reference	Experiments	Particles	Source	Material	Size [nm]	DMF
[57]	<i>In vitro</i>	$\gamma$	$^{125}\text{I}$	Au	50	
[48]	<i>In vitro</i>	NA	NA	Gd	5	
[40]	<i>In vitro</i>	X	250 kV	Ti	65	
[55]	<i>In vitro</i>	X	40 kV	Fe Bi	10 30	
[60]	<i>In vivo</i>	X	100 kV	Au	10	
[56]	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	X	100 kV	Au	30	0.74
[52]	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	$\gamma$	$^{137}\text{Cs}$	Au	4.8-46.6	
[59]	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	X or $\gamma$	$^{60}\text{Co}$ 6 MV	Hf	50	0.765
[28]	<i>In vitro</i>	X	160 kV	Au	1.9	
[26]	<i>In vivo</i>	X (synchrotron)	50-350 keV	Gd	2	
[42]	<i>In vitro</i>	X	90 kV 6 MV	Au	14	
[63]	<i>In vitro</i>	Electrons	60 keV	Au	41395	
[34]	<i>In vitro</i>	X or Electrons	160 kV 6 MV 15 MV 6 MeV	Au	1.9	0.499 0.695 0.695 0.706

*Continued on the next page ...*

4. Parameters not depending on nanoparticles design

... continued from previous page						
Reference	Experiments	Particles	Source	Material	Size [nm]	DMF
			16 MeV			0.718 0.745 0.776 1.18
[35]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	50	
[51]	<i>In vitro</i>	X	660 kV 6 MV	Gd	5	
[64]	<i>In vitro</i>	X	200 kV	Au	NA	
[46]	<i>In vitro</i>	X or Protons	6.5 keV 45 kV 160 kV 6 MV 3 MeV	Au	6.1	0.354 0.411 0.496
[65]	<i>In vitro</i>	X	160 kV	Au	1.9	0.46 0.516 0.908 0.949 0.977 1 1.17 1.22
[66]	<i>In vivo</i>	X (synchrotron)	20-190 keV 80-300 keV	Au	1.9	
[67]	<i>In vitro</i>	Carbon ions	276 MeV/amu	Pt	3	
[68]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	80 kV	Au	2	
[69]	<i>In vitro</i>	X	40 kV 80 kV 120 kV	Au	37.5	
[54]	<i>In vitro</i>	X	30 kV 80 kV 100 kV 120 kV	Au	8 20 37 74	0.2 0.25 0.5
Continued on the next page ...						

... continued from previous page						
Reference	Experiments	Particles	Source	Material	Size [nm]	DMF
			150 kV		92	
[70]	<i>In vitro</i>	X or Electrons	80 kV 150 kV 6 MeV 12 MeV	Au	1.9	0.1 0.221
[45]	<i>In vitro</i>	$\gamma$	<sup>137</sup> Cs	Au	10.8	
[71]	<i>In vitro</i>	$\gamma$	<sup>137</sup> Cs	La	10	
[71]	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	X or $\gamma$	200 kV <sup>60</sup> Co <sup>137</sup> Cs	Au	10.8	
[72]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	4.7	
[73]	<i>In vitro</i>	$\gamma$ or carbon ions	<sup>60</sup> Co 62 MeV	Au	1.9	
[74]	<i>In vitro</i>	X	105 kV 220 kV 6 MV	Au	50	
[75]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	13	
[76]	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	X (synchrotron)	50 keV 88 keV	Au	1.9 15	
[77]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Bi	50	
[78]	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	X	150 kV 175 kV	Au	23	0.66
[23]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Ti	10	0.627 0.637
[22]	<i>In vivo</i>	X	200 kV	Ti	10	
[37]	<i>In vitro</i>	X	120 kV	Fe	43891	
[39]	<i>In vitro</i>	X	4 MV	Si	3	
[38]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Au	5-250	
[41]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	NA	48	
[61]	<i>In vitro/In vivo</i>	X	6 MV	Au	28.9-47	
[25]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	CdSe	25	0.631
[79]	<i>In vitro</i>	X	150 kV	Ce	7	

Continued on the next page ...

4. Parameters not depending on nanoparticles design

... continued from previous page						
Reference	Experiments	Particles	Source	Material	Size [nm]	DMF
			10 MV			
[24]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	CdSe	10	
[80, 81]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	30-100 keV	Au	1.9	
[81]	<i>In vitro</i>	X	120 kV	Au	1	
<i>End</i>						



TABLE 2 – Analytical or Monte Carlo calculations concerning the radiation therapy enhancement by nanoparticles

Reference	Code	Particles	Source	Material	Size [nm]
[82]	GEANT4	X	150 kV 15 MV	Au	NA
[83]	MCNP5	X or $\gamma$	$^{125}\text{I}$ $^{169}\text{Yb}$ $^{192}\text{Ir}$ 50 kV	Au	1.9
[84]	EGSnrc	X or $\gamma$	$^{103}\text{Pd}$ $^{125}\text{I}$ $^{169}\text{Yb}$ $^{192}\text{Ir}$ 50 kV 6 MV	Au	1.9
[85]	Analytical calculation	X	6 MV	Au	100
[86]	PENELOPE	X	110 – 500 kV	Gd	NA
[87]	MCNP5 PENELOPE	X or $\gamma$	$^{103}\text{Pd}$ $^{125}\text{I}$ $^{169}\text{Yb}$ $^{192}\text{Ir}$ 6 MV	Au	1.9 5 30 100
[88]	GEANT4	X	6 MV 15 MV	Au	1.9
[14]	GEANT4	X	20 – 150 keV 160 kV	Au	1.9
[89]	PENELOPE	X	110 – 500 kV	I	NA
[90]	GEANT4	Electrons	50 keV 250 keV 1 MeV 4 MeV	Au	2 50 100

*Continued on the next page . . .*

... continued from previous page					
Reference	Code	Particles	Source	Material	Size [nm]
[59]	PENELOPE	X	200 keV 1 MeV 6 MeV	Hf	50
[91]	Analytical calculation	X	80 – 120 kV	Au	1.9
[92]	Analytical calculation	X	6 MV	Au	100
[15]	GEANT4	X	80 kV 6 MV	Au	400
[93]	PENELOPE	X	220 kV	Au	NA
[94]	MCNPX	X or $\gamma$	50 – 120 keV $^{60}\text{Co}$ 6 MV 18 MV	Au	30 50 100
[95]	GEANT4	X	6 MV	Au	10 100
[96]	Analytical calculation	X	6 MV	Au	1.9
<i>End</i>					

We divided the performed studies using medical X-rays into two categories : the first one corresponds to low and medium energies, *i.e.* comprised between 1 kV and 1 MV and the other one corresponds to high energies (*i.e.* 1 to 25 MV). When achievable, we measured the DMF in papers that contain survival curves to quantify the radiosensitizing effect of NPs. The "biological effect" was defined as the SF<sub>2</sub> without NPs (Figure 2).

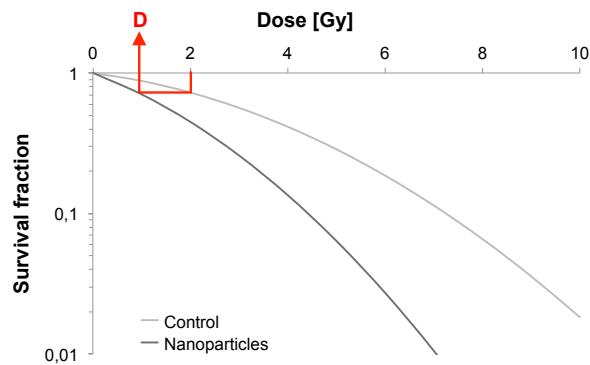


FIGURE 2 – Survival curve example. Illustration of our DMF assessment strategy.

A plot of the calculated DMF values versus beam energy is illustrated on the figure 3. Due to the multitude of irradiations settings and environments between experiments, the inter-study

comparison of the DMF should be considered with care. Moreover, in some studies, the energy is not the only parameter that varied. Therefore, in order to analyze the source energy parameter only, we have decided to focus on the analysis of papers where the energy was the only variable (Figure 3). Rahman *et al.* [70] reported high dose enhancement (DMF  $\leq 0.1$ ) at 80 and 150 kV in the same study. Survival curves were obtained using a colorimetric method. It seems that in the presence of NPs, curves do not follow the LQ model anymore ( $\alpha \rightarrow 0$  when the concentration increases). The authors concluded that their results gave an indication of some energy dependence because the source was the only parameter that was changed. Brun *et al.* [54] assessed the effect of 6 combinations energy/filtration. They could not clearly observe an energy dependence but did not directly measure the cell survival. Their conclusions were based on a plot of the dose enhancement factor *versus* the effective X-ray energy but the enhancement factor was linked to the loss of supercoiled DNA. In another study, Brun *et al.* [69] evaluated the enhancement of X-ray-induced degradations of human centrin 2 proteins (Hscen2). Centrins are small acidic proteins, highly conserved in eukaryotes, from algae and yeast to humans. They demonstrated that X-ray-induced degradations could not lead to explicit energy dependence. However, one could regret that non-standard biological assays were used in these studies. Recently, Rahman *et al.* [80] observed the influence of the energy of synchrotron-based mono-energetic photon beams (from 30 to 100 keV) and found out that the optimal energy was 40 keV. However, no correlation was made between the source energy and the *in-vitro* radiosensitization by NPs.

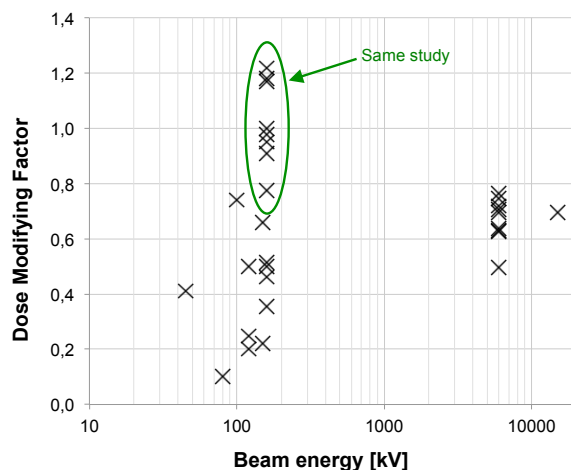


FIGURE 3 – Plot of the calculated DMF values from publications *versus* beam energy. For energies up to 200 kV, we identified 21 publications dealing with *in vitro*, 2 *in vivo* and 2 with both *in vitro* and *in vivo* experiments during the period 2008-2014. In the range from 200 kV to 1 MV, 3 *in vitro* publications were studied. Upon *in vitro* experiments, the DMF varies from 0.1 to 1.2. Lower values (which are representative of a high radiosensitization) were observed for lower energies. Concerning high-energy beams, 13 publications were analyzed for *in vitro*, 1 for *in vivo* experiments and 1 for both; 1 used a 4 MV beam, 13 a 6 MV, 1 a 10 MV and 1 a 15 MV. Upon *in vitro* experiments, the DMF varies from 0.7 to 0.8 for non targeted GNP, 0.5 for PEG-coated GNP and 0.6 for a Photofrin® and quantum dots combination.

Two papers [34,74] demonstrated a noteworthy influence of the energy on the radiosensitizing effect of NPs in SK-OV-3 (105 kV, 220 kV, 6 MV) and MDA-MB-231 (160 kV, 6 MV and 15 MV) cell lines. Concerning the results published by Jain *et al.* we measured, at 160 kV, DMF

values of 0.499, 1.180 and 0.776 for MDA-MB-231, DU145 and L132 cell lines respectively. Thus, the cell line parameter seems highly influent. However, for the 6 MV beam, we measured DMFs of 0.695, 0.718 and 0.706 for the 3 cell lines respectively. The DMF measured for MDA-MB-231 after a 15 MV irradiation is 0.695. Surprisingly, at high energies, results do not depend on the cell lines anymore, pointing out that kV irradiations are more subject to additional variations than MV ones.

As results DMF are, to some extent, disparate for low and medium energy X-rays, they are interestingly similar for high energies (6 MV in particular). This may be due to a noteworthy diversity of low- and medium-energy spectra. Indeed the later beams differ widely from one another for the following reasons (not exhaustive list) : large number of tube manufacturers, anode materials, filters, *etc* and this is certainly a major drawback for the comparison of studies. On the contrary, clinical MV spectra are remarkably similar which makes them more suited for comparisons.

Based on *in vitro* and *in vivo* studies published during 2008-2014, we found that there are evidences that the energy of the X-rays source has a major influence on the radiosensitizing power of NPs. We notably noticed that 6 MV irradiations resulted in a DMF close to 0.65 with a low variability even for different NPs designs or cell types. For example, applying a DMF of 0.65 to clinical situations means fractions of 2 Gy could be replaced by 1.3 Gy fractions with the same biological effect on tumors that contain NPs. It could be an important benefit for the patient with less side effects and a better treatment tolerance. Working at 6 MV, besides facilitating the comparisons of NPs, would allow easier transitions to clinics where high-energy X-rays are the standards. Nevertheless, as high-energy medical linear accelerators are not easily accessible, a standardization of low-energy irradiation protocols should be proposed to evaluate the radiosensitizing power of NPs in laboratory.

### 4.3 Irradiation setup

The irradiation methodology may drastically influence the studies results and only few authors have detailed this point. The irradiation should be reproducible, repeatable and close to the clinical situations. It is therefore recommended to comply with the following propositions. The absorbed dose should be correctly calculated : cells/tissues/tumor should be at the electronic equilibrium ( $\approx$  surrounded by sufficient water equivalent medium). If possible, cells or animal models should be surrounded with water equivalent materials that could bring scattered photons of lower energy (which interacts by photoelectric effect).

The energy held by the scattered photon is related to the energy of the incident photon [97]. Therefore backscattered photons, which carry less energy, are interesting for X-rays-NPs interactions purposes. Then the cells/tissues/tumor should be located in a low dose gradient : after the depth of the maximum dose and inside the beam, off the penumbra region. Sufficient medium should be placed after the cells/tissues/tumor in order to generate enough scattered photons (Compton effect). Finally, cells/tissue/tumor should be at a clinical distance from the source (e.g. 100 cm for a high-energy medical accelerator). Advices from a medical physicist could be of great use. The figure 4 illustrates an example of an irradiation scheme for a 6 MV accelerator treating a cell well plate.

For precise inter-study comparisons, the irradiation methodology should be the same with

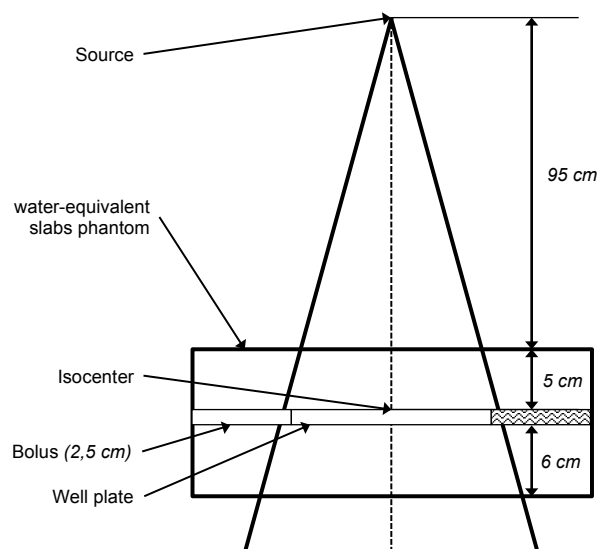


FIGURE 4 – Example of a standard irradiation setup for a 6 MV irradiation of a cell-well plate placed at the linear accelerator’s isocenter under 5 cm of water-equivalent slabs.

similar beam energy spectra. That is why high-energy beams (e.g. 6 MV) are well suited for that purpose.

## 5 Influence of nanoparticles design on the radiosensitization

NPs usually have a simple structure composed of a core, a shell and a surface [98]. In the case of radiosensitizing NPs, the core is usually made of high- $Z$  materials such as silver, lanthanides and most extensively of gold, in order to exploit the increased photon absorption. The shell, which is chemically or physically bound to the core, acts as a base on which surface molecules (which sometimes include active agents) are anchored or bound with or without spacers. However, the high  $Z$ -elements can also be chelated by ligands present at the surface or inside the nanoparticle. The surface molecules usually consist of site-, tissue-, cell- and/or receptor-specific molecules (targeting units). In the following paragraphs we will review the influence of the NPs design on : *(i)* interactions between X-rays and NPs, *(ii)* the ROS generation upon irradiation and *(iii)* the biodistribution of NPs.

### 5.1 X-rays -nanoparticles interactions

Theoretical principles of X-rays interactions with NP have already been described [47]. X-ray interactions with matter happen mostly at low energy where the photoelectric effect is dominant (Figure 5). The photoelectric effect occurs when the incident X-ray photon is absorbed by the atom, resulting in the ejection of an electron. This effect is prevailing until the photon energy reaches a medium energy (e.g. 500 keV for Au) with a cross-section varying with  $Z^4$  or  $Z^5$  depending on the material and is enhanced by an increased absorption by electron shells (K, L, M, etc.) at low energies. As the atom is left in an ionized state, a characteristic X-ray or an Auger-electron emission follows the ejection of a photoelectron. That is why the radiosensitizing NPs are based on high- $Z$  materials. More theoretical proofs can be found in the literature [21, 82]. The Auger effect especially concerns low- $Z$  atoms [99] and therefore would not be a major contributor to

the dose deposited in the presence of high-Z NPs. Indeed, it is dominant for  $Z < 15$  but almost equal to 0 for  $Z > 60$  [100].

For medium- or high-energy beams (always poly-energetic in clinical routine), the low-energy component of the spectrum will interact with matter by photoelectric effect and the medium- and high-energy components are more likely to interact by Compton effect. Compton effect occurs when the incident X-ray ejects an electron and a photon is scattered from the atom. This effect depends on the  $Z$  of the targets. The scattered photon, depending on its energy, will trigger either photoelectric or Compton effects.

Compton, Photo- or Auger-electrons can induce the emission of secondary electrons (also called delta rays) that are believed to be responsible for the majority of cells damages. One should notice that for very low energies photons, the ejected photoelectron might not carry a sufficient energy to cause subsequent ionizations. Opposite information about the dose deposited by Auger or photo-electrons in the vicinity of the NPs have been published in the literature. McMahon *et al.* found that the contribution of Auger electrons was dominant [14] and Douglass *et al.* claimed that the Auger electrons contribution was insignificant [15] even though they were using the same simulation code (Geant4). Some authors described an auto-absorption phenomenon that can be amplified by the size of the NPs and the presence of other high- $Z$  atoms in its vicinity (*e.g.* a cluster of NPs) [14]. Low-energy secondary species would be the first to be absorbed. Therefore the design of the NPs is of utmost importance concerning the radiation therapy enhancement ; high- $Z$  components can increase the number of secondary species because of a  $Z^5$  dependence of the photoelectric effect and bigger NPs or clusters tends to favorite the auto-absorption of low energy electrons.

Heavy metal-based NPs have also been suggested as effective tumor-targeting theranostic agents with dual functions : efficient targeted system for tumor imaging and irradiation dose amplifier for radiotherapy under the guidance of computed tomography imaging [101]. Guided by tumor-targeted X-ray computed tomography imaging, their radiosensitizing effect was investigated using a clinical megavoltage photon beam. In this innovative study,  $\text{BaYbF}_5 : 2\% \text{Er}^{3+}$  NPs could be excited by near-infrared laser and emit upconversion luminescence with greatly suppressed auto fluorescence, photo damage and toxicity, which could be ideal for cell or even tissue tracking.

## 5.2 ROS generation upon X-rays

The mechanisms involved in the ROS generation upon X-rays irradiation in the presence of NPs differ depending on the composition, size, and potential of these NPs. Thereby, Misawa *et al.*, using two kinds of fluorescent probe APF and DHE, compared the ROS production when GNP, from 5 to 250 nm, were subjected to X-rays irradiation and UV light in water [38]. GNP-induced enhancement of  $\text{OH}\cdot$  and  $\text{O}_2\cdot^-$  generation was confirmed. Moreover, the authors demonstrated that smaller diameter GNP with larger surface area showed a greater yield of ROS. The increase in ROS generation was also corroborated by recently published results of Klein *et al.*, which illustrates the in vitro formation of ROS in SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) loaded MCF-7 cells exposed to X-rays. In particular, they demonstrated that citrate-coated SPIONs may function as excellent radiosensitizers upon enhancing the impact of X-rays on the ROS generation for about 240% when compared with X-ray treated cells without internalized SPIONs. The ROS production in iron oxide NP loaded cells was explained to originate from

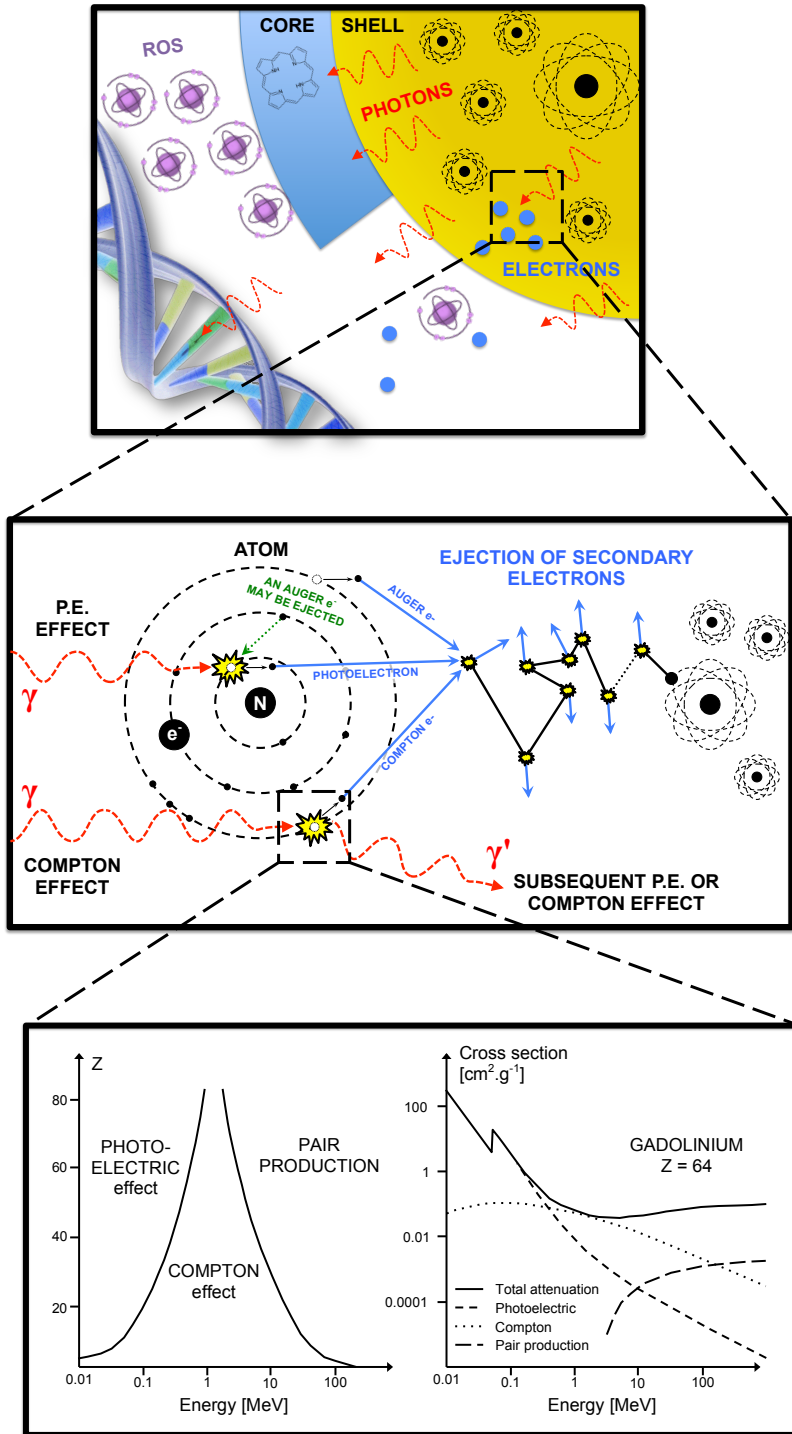


FIGURE 5 – Interactions of X-rays with NPs result directly or indirectly in the production of secondary species : photons, electrons and later ROS. Secondary photons or electrons are mostly generated either by photoelectric or Compton effect. The photoelectric effect interaction probability varies with  $Z^4$  or  $Z^5$  and dominant until the incident photon energy reaches  $\approx 500$  keV

both, the release of iron ions and the catalytically active surfaces of silica NPs with an oxidation of  $\text{SiO}_2$  following irradiation [37–39]. Interestingly, a link was evidenced between the intracellular localization of SPIONs, and the ROS generation; functionalization with an amine function of silica NPs can significantly increase the ROS production due to their positive surface charge, which facilitates NPs accumulation in the membranes of the endoplasmic reticulum, vesicles and especially mitochondria [81]. SPIONs presence in the membranes also induced a membrane lipid peroxidation, improving the radiosensitizing effect.

### 5.3 Influence of nanoparticles design on tumor selectivity, cellular uptake, intracellular localization and biodistribution

As organs at risks may be at the vicinity of the tumor and given that there is some evidence of an energy dependence of the radiosensitization by NPs, this observation has to be taken into consideration when prescribing NPs (Figure 6). Therefore, it is of utmost importance that radiosensitizing NPs concentrate in the tumor and not in the healthy organs at its vicinity. That is why it has been suggested that GNP-based radiosensitizers should have targeting moieties (*e.g.* glucose, antibodies) to improve NP uptake by tumor cells. For example, Chattopadhyay *et al.* demonstrated that trastuzumab-conjugated GNPs were well-internalized into HER-2 overexpressing SK-BR-3 breast cancer, while non-targeted NPs had little or no internalization in these cells, and trastuzumab-conjugated GNP have led to 5 times more DNA double strand breaks than the non-targeted GNP. It should also be noticed that the energy spectrum of radiation therapy beams always depends on the clinical setting (depth, field size, in-field localization of NPs, *etc.*). Scarboro *et al.* calculated 6 MV energy spectra variations with treatment parameters [102]. They showed that when the depth along the central axis increased, the low-energy contribution of the spectrum increased and the high-energy part decreased. For instance, for a 10 cm x 10 cm field, at a depth of 10.0 cm the flux of particles which carry an energy of 100 keV is two times more important than at a depth of 1.6 cm. Therefore, the radiosensitizing effect of NPs may be slightly more important for deep tumors. They also noticed that off axis spectra contained dramatically more low energy components than central axis ones.

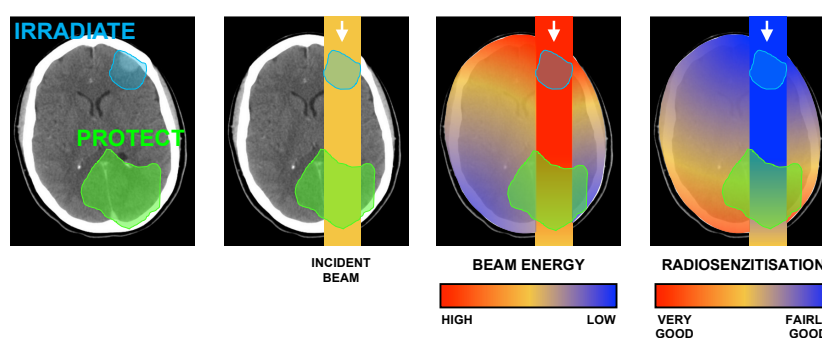


FIGURE 6 – From left to right : Illustration of a clinical scenario where a volume (blue) has to be irradiated while a part of an organ (green) has to be protected; A simple anterior beam is irradiating the blue volume; The beam energy is maximum in the irradiation field and is reduced out of the field; Given that the interaction probability is higher for low-energy photons, the radiosensitization in presence of NPs should be higher out of the irradiation field. In this case, the green volume that has to be protected would be in the most radiosensitized area.



At a cellular level, several studies aimed at estimating the diffusion abilities of secondary species induced in case of interactions between X-rays and NP and most of authors have concluded that the path of secondary electrons is very limited, from a few tens of nanometers to a few micrometers. For example, Chattopadhyay *et al.* using a 100 kVp X-ray beam and GNPs, reported that 99% of the Auger electrons were stopped before 100 nm, because of their low average energy and a very short penetration range [56,87]. Meesungnoen *et al.*, for their part, have described a penetration range shorter than 20  $\mu\text{m}$  for photoelectrons with an average energy of about 43 keV [103]. Given that the cell size was about 10-20  $\mu\text{m}$ , these works suggest that lethal effects resulting from X-rays and NP interactions could only be obtained if NPs are localized into and onto the cell. Hence, the internalization of NP into tumor cells is a pre-requisite. Cellular uptake of NPs is highly dependent on the design of the nano-object and numerous studies have demonstrated that modifications of the physicochemical properties of the NP have great consequences on the cellular entry and biological processes [104]. In a recent work, Rima *et al.* assessed the cellular internalization mechanisms for sub-5 nm gadolinium-based NPs and evidenced both passive diffusion for single particles and macropinocytosis in case of agglomerates [48]. Herein, significant radiosensitization was only found with NPs clusters.

Besides the impact on cellular uptake, NP design also determines their intracellular localization, which in turn exerts a critical impact on the induced radiosensitization. In particular, the functionalization of the NPs plays a central role in the redirection of the particle to specific cell subcompartments. For instance, Kong *et al.* demonstrated that their GNPs were mostly bound to the cell membrane, while thioglucose-GNPs were distributed in the cytoplasm, leading to a higher decrease in cell survival after X-rays irradiation [49]. However, in a recent study [105], a sub-50 nm nuclear-targeting rattle-structured upconversion core/mesoporous silica nanotheranostic system was designed to directly deliver radiosensitizing drug Mitomycin C into the nucleus for greatly enhanced damaging of the DNA with the assistance of X-ray irradiation. More importantly, the authors develop a new theranostic technique of “intranuclear radiosensitization”, meaning that the radiosensitizing drug molecules released into the nucleoplasm may not only efficiently break down the intranuclear DNA, but also effectively enhance the radiotherapy efficacy due to the intranuclear chemodrug-sensitized radiation enhancement effects. Moreover, *in vitro* significant radiosensitization has been noted for GNPs localized far from the cell nucleus [70]. Consistently, according to the recent literature in this field, it seems that the relative distance from the DNA is not a crucial factor [74,106].

Concerning *in vivo* applications of NP-based radiosensitization, the first priority concerns the NP selectivity for tumor tissue to avoid any radiosensitization of adjacent normal tissue. To circumvent this difficulty, intratumoral injection was sometimes preferred and used [56,59]. For systemic delivery, the engineering of NPs on the size, shape, physicochemical characteristics and targeting moieties is critical, given that these parameters strongly affect the circulation time of the NPs, their biodistribution and their availability for effective therapy [107]. As described by Dufort *et al.*, after intra-venous injection, accumulation of GNPs in the tumor tissue could be achieved passively by relying on the increased permeation and retention of the leaky vasculature of tumors (EPR effect) [104]. Nevertheless, the tumor-to-normal tissue NP ratios need to be improved in further preclinical trials. Notably, in preclinical *in vivo* studies, few experiments were conducted to optimize the time between NPs administration and irradiation, while this point appears to be critical. However, NPs have been suggested as theranostic agents for tumor imaging and irradiation dose amplifier for radiotherapy under the guidance of computed tomography imaging [101].

## 6 Future applications : e.g. photodynamic-therapy combined with high-Z radiosensitizers

PDT is based on the concept that certain PhotoSensitizers (PS) can be localized in neoplastic tissue, and can subsequently be activated with the appropriate wavelength of light to generate active molecular species such as free radicals and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) that are toxic to tumors. The limited penetration range of light makes this therapy most appropriate for small or superficial lesions. In order to treat deep lesions, it may be possible to use X-rays as excitation source instead of light. With this novel therapeutic approach, the light penetration problem can be overcome and activation of the photosensitizer within tumors would be performed using ionizing radiation. This new modality will allow treatment of deep tumors using lower radiation dose than conventional radiotherapy.

Chen W and Zhang J described for the first time the potential of NPs to enable simultaneous radiation and photodynamic treatment in 2006 [20] and in a review in 2008 [108]. They obtained an US patent in 2007 for luminescent NPs with attached PSs such as porphyrins used as a new type of agents for PDT. Upon exposure to ionizing radiation, light would be emitted from the NPs to activate the PS; as a consequence,  $^1\text{O}_2$  would be produced to increase the killing of cancer cells by ionizing radiation. No external light would be necessary to activate the PS within the tumor. Chen and Zhang described the synthesis of  $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ -meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine (MTCP) NP conjugated to folic acid and investigated the energy transfer as well as the formation of  $^1\text{O}_2$  following X-ray irradiation [109]. They proved that upon X-ray irradiation, the porphyrin alone is a radiosensitizer but the effect is enhanced when MTCP is coupled to  $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$  NPs targeted or not with folic acid. The average energy transfer rate in the MTCP conjugates is 56.7%. The same team realized also ZnO-MTAP (meso-(o-amino-phenyl porphine)conjugate in which the energy transfer is around 89% [109].

In 2009, Morgan *et al.* [110] tried to calculate the physical parameters required for nanoscintillators to deliver cytotoxic levels of  $^1\text{O}_2$  at therapeutic radiation doses drawing on the published literature from several disparate fields. It appears that the light yield of scintillators, the efficiency of energy transfer to the PS and the cellular uptake of the NPs all need to be fairly well optimized to observe a cytotoxic effect. To calculate the required light yield for the NPs to have a PDT effect (formation of  $5.6 \times 10^7$  of  $^1\text{O}_2$ ) at therapeutic radiation doses, they assumed a non-clinical single-fraction radiation dose of 60 Gy,  $\Phi_{\text{FRET}} = 0.75$ ,  $\Phi_{\Delta} = 0.89$  and that NPs occupy a 5% volume fraction in the tissue. They estimated that the efficacy of the combination therapy would likely be restricted to X-ray energies below 300 keV.

Scaffidi *et al.* in 2011 [111], described  $\text{Y}_2\text{O}_3$  nanoscintillator, a fragment of HIV-1 TAT peptide and psoralen. The authors used commercially available 12 nm diameter cubic-phase  $\text{Y}_2\text{O}_3$  nanoscintillators on which they coupled TAT or psoralen-TAT. PC-3 human prostate cancer cells were used and they could observe a modest *in vitro* reduction in cell number after X-ray excitation (2 Gy at 160 or 320 kV).

Our team published very recently a paper about X-ray-induced  $^1\text{O}_2$  activation with nanoscintillator-coupled porphyrins (Figure 7) [10].  $\text{Tb}_2\text{O}_3$  coated with a polysiloxane layer is a biocompatible nanoscintillator that exhibits an appropriate pattern of biodistribution *in vivo* after injection. The average size of the core-shell NPs grafted with porphyrin is 9.9 nm. Using time-resolved

laser spectroscopy and  $^1\text{O}_2$  chemical probes, we demonstrated that after X-ray irradiation of the nano-objects, we could observe the formation of  $^1\text{O}_2$  as well as a decrease of the luminescence of the core and the increase of the fluorescence of the porphyrin, proving the energy transfer between the core and the photosensitizer. By elaborating new NPs, we hope to increase the efficiency and prove the concept *in vitro* and *in vivo*.

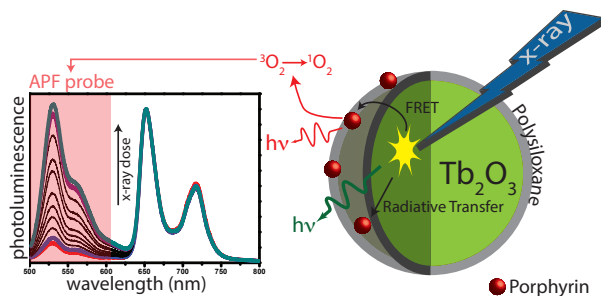


FIGURE 7 – Luminescence of APF probe after X-rays excitation of nanoparticles composed of a  $\text{Tb}_2\text{O}_3$  core, polysiloxane shell in which and porphyrins are covalently linked.

In 2015, inspired by the complementary advantages of PDT and radiotherapy, Zhang *et al.* described the integration of a scintillator and a semiconductor as an ionizing-radiation-induced PDT agent, achieving synchronous radiotherapy and depth-insensitive PDT with diminished molecular  $\text{O}_2$  dependence [112]. These very encouraging results are the basis of new NPs developments. Recent Monte Carlo simulations have also been used to numerically estimate the spatial energy distribution resulting from the interaction between the X-ray photon and the NP, leading to a photodynamic and radiosensitization efficiencies. These simulations demonstrated that a significant fraction of energy is deposited within the NPs despite a primary interaction occurring in the surrounding media [113].

## 7 Conclusion and future perspectives

We have reviewed parameters that influence the radiosensitizing power of NPs : the biological evaluation methodology, the X-rays energy, the irradiation setup, the X-rays-NPs interaction, the ROS generation and the biodistribution of the NPs. A numerical evaluation was performed to assess the impact of the X-rays energy spectrum on the cell survival in presence of NPs. After the analysis of 64 papers from the literature, we noted that a large number of prospective studies have been carried out on the NPs-enhanced radiation therapy. However, only a few papers were comparable because the experimental settings were different, thus leading to uncertainty as to whether some parameters were influent or not, indicating that more investigations and standardizations are needed to converge towards a conclusion. Nevertheless, the present review strengthens the approach of using NPs to improve radiation therapy. Another parameter that has just been evaluated by Jain *et al.* is the influence of the oxygen conditions [114]. They showed that the radiosensibilization power of GNP is lower in hypoxic conditions. The knowledge of these critical parameters could help investigators to design and evaluate new NPs in a more normalized approach which will be necessary for further translation to clinical applications.

Due attention needs to be paid to the recent emergence of very promising reports about the *in vitro/in vivo* synergetic therapy based on radiosensitization for instance, (i) an enhanced radiotherapy and photothermal ablation under the potential trimodal imaging guidance [36], or

a simultaneous dual-mode imaging and localized therapy *via* synergetic chemo-/radiotherapy [115] or a synergetic chemo-/radio-/PDT and simultaneous magnetic/upconversion luminescent bimodal imaging [116].

Last but not least, *in silico* tests could be suggested to screen different nanoparticle designs as a first step to identify the most promising nano-objects. Indeed, a numerical model-based design could allow for quick screening of a large number of architectural configurations and finally identify the most promising formulations to enhance the dose deposition.



## Deuxième partie

# Méthode de conception de nanomatériaux structurés assistée par ordinateur



# 1 Préambule

Suite à l'état de l'art de la littérature sur la radiothérapie augmentée par les NPs qui a fait l'objet de la première partie de cette thèse, nous avons souhaité approfondir le problème soulevé par Etheridge *et al.* [7] en développant un processus de criblage virtuel dédié aux NPs radiosensibilisantes.

En effet, un processus de criblage virtuel permettrait, au stade de la conception d'une NP, de tester un grand nombre de possibilités de designs afin de ne sélectionner que les plus intéressants. Ces tests, réalisés sur ordinateur, ont l'avantage d'être rapide tout en étant peu onéreux. Ils se doivent néanmoins d'être le plus fiable possible afin de permettre, sans prédire l'effet radiosensibilisant des NPs de manière absolue, d'établir un classement des objets testés de façon à pouvoir isoler les meilleures afin de les tester avec une méthode de référence.

Ce processus de criblage s'appuie sur 2 éléments principaux : (i) une plateforme capable de simuler les interactions entre des rayons X et des NPs couplée à (ii) une méthodologie de plans d'expériences numériques permettant de simplifier les criblages nécessitant un grand nombre de simulations. Nous avons choisi d'utiliser le simulateur Geant4-GATE [117–119] car ce dernier est aisé à prendre en main, propose une gestion efficace des structures, permet de récupérer une image de dose en 3D exploitable avec ImageJ [120] ainsi que des informations sur le nombre de particules secondaires créées durant l'irradiation et leur énergie sous forme d'histogrammes facilement interprétables avec ROOT [121]. Les plans d'expériences sont conçus avec le logiciel R [122, 123] qui est également utilisé pour réaliser l'analyse statistique des résultats eux-même obtenus grâce à ImageJ et ROOT. Il s'agit donc ici d'une coopération, voire d'une synergie, entre des compétences en automatique et en radiophysique.

Le savoir-faire associé à ce processus original a fait l'objet du dépôt d'une enveloppe Soleau auprès de l'Institut National de la Protection Industrielle (INPI) ; cette dernière, sans constituer une protection équivalente à un brevet, permet d'identifier clairement l'auteur et la date d'une création. Dans cette enveloppe, nous avons détaillé les différentes étapes et composantes du processus de criblage que nous avons élaboré :

1. Conception d'un plan d'expériences numériques sous l'environnement R ;
2. Conception générale d'une simulation avec GATE ;
3. Conception de l'environnement des NPs dans GATE ;
4. Conception d'une NP et implantation dans GATE ;
5. Conception du système à base de NPs dans GATE ;
6. Sélection des paramètres de simulation dans GATE ;
7. Réalisation des expériences numériques, archivage et prétraitement des résultats de simulation ;
8. Analyse statistique de criblage des paramètres et sélection des paramètres actifs ;
9. Détermination d'un modèle de type surface de réponse et valeurs des paramètres de conception permettant d'optimiser les réponses d'intérêt.

Ensuite, un exemple détaillé de l'utilisation du processus pour réaliser un criblage d'une NP pour laquelle nous avons fait varier 7 paramètres de composition ; chaque paramètre pouvant prendre 2 valeurs. Un plan d'expérience numérique optimisé de type Hadamard a été utilisé pour réduire à 8 le nombre de conditions de simulation à tester (plan factoriel complet :  $2^7 = 128$  conditions).

La rédaction de cette enveloppe Soleau, nous a permis d'établir une première base de notre processus de criblage virtuel et de lever les premiers verrous liés à l'utilisation de Geant4-GATE,



ImageJ et ROOT. A la suite de la rédaction de ce document nous avons souhaité réaliser une analyse de robustesse de notre simulateur afin d'identifier les paramètres intrinsèques de simulation pouvant avoir un impact sur les résultats. L'objectif étant d'éviter une mauvaise interprétation des résultats due à des confusions introduites implicitement par les effets de facteurs cachés.

Ainsi la deuxième partie de ce manuscrit est une transposition de cette enveloppe Soleau qui a été envoyée à l'INPI en juin 2014. A noter que ce savoir-faire nous a permis de remporter le prix de la "Technologie offrant les meilleures opportunités de développement économique en Lorraine" identifiée dans le cadre de la Bourse aux Technologies "Matériaux, Energies et Procédés" organisée le 6 juin 2014 à l'Ecole des Mines de Nancy par l'Institut Mines-Telecom.

## 2 Introduction

Le savoir-faire présenté dans ce document concerne une méthode de conception assistée par ordinateur de matériaux nano-structurés pour des applications médicales utilisant des rayonnements. Cette solution repose sur des modèles numériques pour réaliser un screening virtuel (*in silico*) et une optimisation de la formulation de matériaux nano-structurés. L'implantation de la méthode repose sur un ensemble de logiciels libres :

- GATE : modélisation des NPs, de leur environnement et simulation de leur interaction avec des rayonnements [117–119] ;
- ImageJ : traitement des images issues des simulations sur ordinateur [120] ;
- ROOT : traitement des histogrammes des espèces secondaires issus des simulations sur ordinateur [121] ;
- R : conception des plans d'expériences et analyses statistiques des résultats [122, 123].

Ce mode de conception assisté par des modèles numériques de simulation permet de sélectionner plus rapidement les meilleurs prototypes et ainsi d'accélérer les phases de développement préclinique en économisant en amont le nombre d'expériences *in vitro* et *in vivo*. La méthode en question intègre également :

- une bibliothèque de modèles des composants entrant dans la conception des NPs ;
- une bibliothèque de modèles de l'environnement dans lequel les NPs seront testées ;
- des méthodes de planifications d'expériences numériques ;
- des programmes de modélisation statistique et d'analyse des résultats de simulation.

## 3 Cahier des charges

### 3.1 Rédaction du cahier des charges et des exigences sur la NP à concevoir

Il s'agit en particulier de définir initialement les variables d'intérêt de la NP, c'est-à-dire les variables mesurant les performances que l'on souhaite tester ou optimiser. Dans ce but, il est d'abord indispensable d'identifier avec le fabricant de la NP le cas d'utilisation de son produit. Le système de conception assisté par ordinateur que nous avons développé considère deux cas génériques d'usage :

1. la conception de NPs pour la radiothérapie ;
2. la conception de NPs pour l'imagerie : radiologie ou imagerie scanner.

## 4 Méthodologie générale

### 4.1 Conception d'un plan d'expériences numériques sous l'environnement R

En fonction de l'application visée, il faut choisir un objectif parmi deux possibles : étude de facteurs ou optimisation de conception. L'étude de facteurs consiste à déterminer, parmi un ensemble préalablement choisi de facteurs d'étude, ceux qui sont statistiquement influents sur les réponses d'intérêt. Cette étude permet de quantifier leurs effets, leur signe, leurs interactions potentielles et de les comparer. Une fois les paramètres influents sélectionnés, une étude d'optimisation peut être conduite pour affiner les valeurs de ces facteurs et optimiser les réponses souhaitées. Cette optimisation peut être multicritère.

La conception des plans d'expériences numérique est décrite par l'algorithme suivant :

1. si « étude de facteurs » :
  - (a) définir les variables de réponse à analyser ;
  - (b) identifier les facteurs à tester (facteurs nano + facteurs environnement + facteurs rayonnement) ;
  - (c) choisir le nombre de modalités par facteur (2 par défaut) ;
  - (d) choisir les valeurs associées à chaque modalité ;
  - (e) choisir une structure de modèle parmi deux possibles :
    - i. modèle ANOVA sans interaction pour identifier des effets additifs ;
    - ii. modèle ANOVA avec interaction pour identifier des effets synergiques ;
  - (f) déterminer le nombre d'expériences numériques différentes à simuler en choisissant un plan d'expériences de type factoriel fractionnaire ou un plan de Plackett-Burman [124] ;
  - (g) choisir le nombre de reproductions de simulations par expérience ;
  - (h) préparer le plan d'expériences complet dans un tableur.
2. si « étude d'optimisation » :
  - (a) définir les variables de réponse à optimiser ;
  - (b) si plusieurs réponses, définir les fonctions de pondération intervenant dans le calcul de la fonction de désirabilité à optimiser ;
  - (c) identifier les facteurs numériques à tester (facteur nano + facteur environnement + facteurs rayonnement) ;
  - (d) choisir le nombre de modalités par facteur (3 au minimum) ;
  - (e) choisir les valeurs associées à chaque modalité ;
  - (f) choisir une structure de modèle de type « Surface de Réponse » ;
  - (g) choisir l'ordre de la structure : quadratique ou cubique ;
  - (h) choisir le nombre de reproductions de simulations par expérience ;
  - (i) préparer le plan d'expériences complet dans un tableur.

Chaque ligne du plan correspond à une architecture de NP dans un milieu donné et soumise à un protocole de rayonnement préalablement choisi. Chacune de ses lignes correspondra à une simulation sur ordinateur. Comme les simulations sont de nature stochastique (Monte-Carlo) elles doivent être reproduites plusieurs fois. Ce nombre est estimé dans une des étapes du plan d'expériences.

## 4.2 Conception générale d'une simulation avec GATE

Dans le cas général, une macro principale (appelée *0main*) fait appel à plusieurs macros annexes dans l'ordre suivant :

1. *1verbose* : définit le niveau de détail du compilateur GATE ;
2. *2visualisation* : définit les paramètres de la visualisation de géométrie OpenGL ;
3. *3environnement* : définit la géométrie et la nature de l'environnement dans lequel se situent les NPs ;
4. *4NPs* : définit la géométrie et la nature d'une NP puis de la structure complète ;
5. *5physique* : définit les effets physiques à simuler et les seuils d'énergie dans lesquels les particules sont suivies ;
6. *6detecteurs* : définit les caractéristiques des détecteurs (image, particules secondaires, statistiques, etc) ;
7. *7source* : définit les caractéristiques de la ou les source(s) de rayonnement ;
8. *8start* : définit la graine de l'algorithme pseudo-aléatoire, le nombre de particules primaires et lance la simulation.

Cette organisation est schématisée à la Figure 8. Les macros *1verbose* et *2visualisation* n'ont pas d'influence sur le résultat de la simulation. Les macros *2visualisation* et *4NPs* peuvent être vides. Les macros *3environnement* et *4NPs* peuvent être issues en partie ou en totalité de nos bibliothèques propriétaires. Pour une version de GATE 6.2, si des structures de taille inférieure à 2 nm doivent être visualisées, pour des besoins de conception par exemple, il est nécessaire d'augmenter artificiellement leur taille (d'un facteur 1000 par exemple) pour pouvoir les observer avec l'outil de visualisation OpenGL. Après visualisation, la simulation doit être effectuée avec des structures de taille normale. Il s'agit d'un bridage intrinsèque à Geant4 qui peut être corrigé par une modification de son code source puis sa recompilation. Nous avons choisi de ne pas modifier Geant4 et d'appliquer une modification d'échelle. Ce n'est plus valable pour GATE version 7 pour lequel les structures sont visibles jusqu'à  $< 0,1$  nm. Nous incrémentons à mesure que les simulations se multiplient une bibliothèque propriétaire de composants pour modéliser la NP et son environnement. L'ensemble des classes d'objets constituant le système de CAO Nano-ID est présenté à la Figure 8. On y retrouve notamment deux packages associés respectivement aux classes d'objets nécessaires à la modélisation de la NP elle-même (NP Components) et celles décrivant son environnement (Context Modeling).

## 4.3 Conception de l'environnement des NPs dans GATE

L'environnement de la NP est défini dans la macro *3environnement* et peut être soit :

- standard :
  - cube d'air de 11 cm x 11 cm ;
  - cube d'eau de 5 cm x 5 cm au centre du cube d'air ;
  - possibilité de segmenter le cube d'eau de 5 cm x 5 cm en de plus petits cubes dans lesquels les seuils de coupure (spatiaux et en énergie) du suivi des particules sont plus bas (ces seuils sont définis dans la macros *5physique*) ;
  - système de NPs dans le cube d'eau (position dépend de la source de rayonnement).
- personnalisé en fonction de la demande.

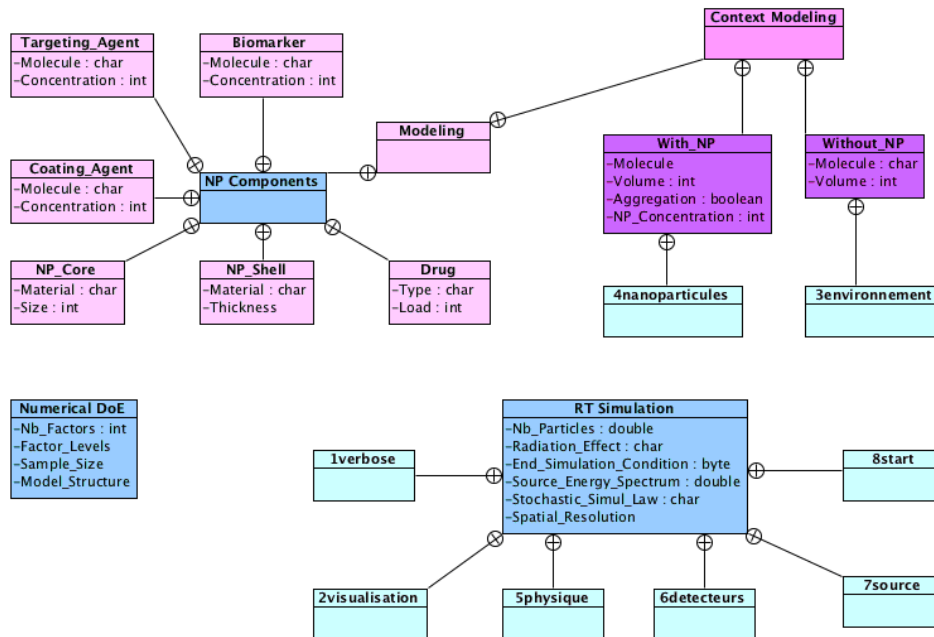


FIGURE 8 – Diagramme de classes des objets constituant le système de CAO Nano-iD

#### 4.4 Conception d'une NP et implantation dans GATE

Une NP est définie dans la macro  $4NPs$  selon le schéma suivant :

- un élément mère de même taille que la NP et rempli d'eau ;
- à l'intérieur de cet élément mère des constituants : simples ou complexes ;
- un constituant simple est :
  - d'une forme géométrique simple (sphère, cube, rectangle, cylindre, etc) ;
  - d'un seul matériau ;
- un constituant complexe est :
  - composé de plusieurs constituants simples ou complexes, ou de plusieurs matériaux ;
- un constituant peut être répliqué selon les limites de GATE (sous forme de ligne, rectangle, sphère ou cylindre) ;
- les constituants les plus simples sont des atomes, leur rayon est tiré d'une publication de Clementi et al. [125].
- pas de chevauchement spatial entre des composants simples

Cette organisation est schématisée à la Figure 9.

#### 4.5 Conception du système à base de NPs dans GATE

Un ensemble de NPs est défini dans la macro  $4NPs$  par réplcation de l'élément mère d'une nano-particule tel qu'il est décrit ci-avant. La réplcation se fait sous forme de ligne, rectangle, sphère ou cylindre.

#### 4.6 Sélection des paramètres de simulation dans GATE

Les effets à prendre en compte, l'algorithme de génération des nombres pseudo-aléatoires ainsi que les seuils de coupure sont définis dans la macro  $5physique$ . Les caractéristiques de la

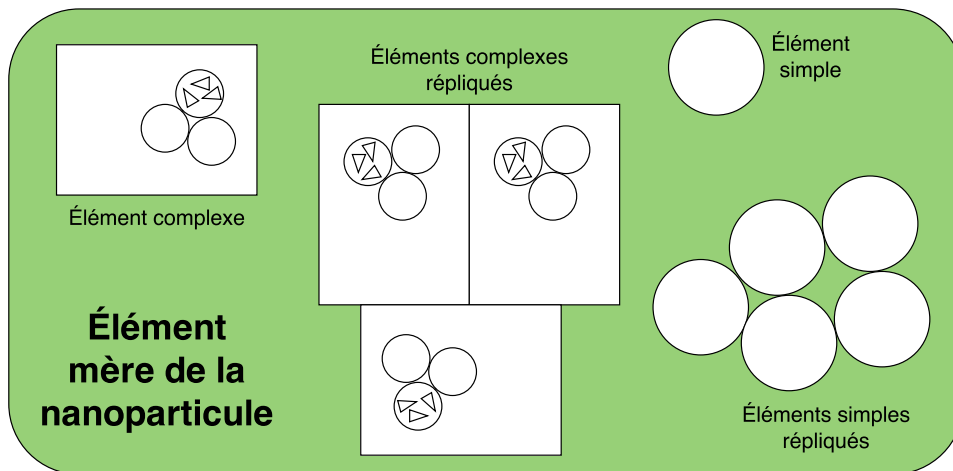


FIGURE 9 – Schéma de la constitution d'une NP dans GATE

source sont définies dans la macro *7source* et peuvent être :

- standard :
  - spectre poly-énergétique de 6 MV (rayons X) ;
  - spectre poly-énergétique de 10 MV (rayons X) ;
  - spectre poly-énergétique de 18 MV (rayons X) ;
- type : source radioactive ou faisceau de rayonnement ;
- type de particules : rayons X, électrons ou hadrons ;
- énergies : 250 eV à 1 GeV avec spectre mono- ou poly-énergétique.

Le nombre de particules et la graine de génération des nombres pseudo-aléatoires sont définis dans la macros *8start*.

#### 4.7 Réalisation des expériences numériques, archivage et prétraitement des résultats de simulation

En fonction du nombre de cas à étudier, le calcul sous Geant4 peut être parallélisé (jusqu'à 16 calculs en parallèle). Nous avons créé un code de découpage des macros en « runs » :

- copie de l'ensemble des macros ;
- changement de la graine de l'algorithme pseudo-aléatoire ;
- génère un fichier bash permettant de lancer tous les runs en même temps.

Les résultats obtenus sont de différentes natures et dépendent du contenu de la macro *6decteurs* :

- image de dose : 5 x 5 x 5  $\mu\text{m}$  en 5000 x 5000 x 1 px ;
- image de dose : 1 x 1 x 1  $\mu\text{m}$  en 500 x 500 x 500 px ;
- histogrammes de création des espèces secondaires dans un cube de côté 10  $\mu\text{m}$  centré sur le système à base de NPs (lu avec ROOT) ;
- personnalisé en fonction de la demande.

Nous avons créé un code de sommation des images de dose qui résulteraient d'un calcul parallélisé. Les images de dose « 2D » sont lues avec ImageJ pour lequel nous avons créé un jeu de régions d'intérêts dans lesquelles est calculée la dose moyenne absorbée. Ces valeurs sont directement copiées puis collées dans un tableur pour analyse. Les images de dose « 3D » peuvent être utilisées pour une analyse plus fine des dépôts locaux. Aucun post-traitement n'est appliqué à ces images.

Les valeurs des histogrammes lues avec ROOT (utilisation d'un TBrowser) sont annotées à la main dans un tableur pour analyse.

#### 4.8 Analyse statistique de criblage des paramètres et sélection des paramètres actifs

Dans cette partie, nous analysons l'ensemble des résultats produits par les simulations numériques.

Si le plan d'expériences numériques choisi est un plan d'étude de facteurs, le modèle mathématique associé est un modèle ANOVA sans interaction du type :

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^p \beta_i \cdot u_{i,k} + E_k \quad (4)$$

avec :

- $k$ , numéro de l'expérience numérique ;
- $Y_k$ , valeur de la réponse étudiée lors de la  $k^{\text{ème}}$  simulation, modélisée par une variable aléatoire ;
- $u_{i,k}$ , modalité du  $i^{\text{ème}}$  facteur lors de la  $k^{\text{ème}}$  simulation ;
- $E_k \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2)$ , partie aléatoire (inexpliquée) de la réponse, modélisée par une distribution Gaussienne centrée et de variance  $\sigma^2$  ;
- $\beta_0$ , valeur moyenne de toutes les réponses ;
- $(\beta_1, \dots, \beta_p)$ , valeurs des paramètres du modèle : inconnues à estimer à partir des résultats des simulations numériques.

Les facteurs d'entrée sont des variables qualitatives qui ne possèdent que deux modalités. Chacun des paramètres (coefficients  $\beta_i$ ) du modèle définit l'effet du facteur auquel il est associé. Ces paramètres sont déterminés par identification du modèle ANOVA précédent et à partir des mesures des réponses numériques simulées. Deux types de tests statistiques sont utilisés. Le premier est un test de Fisher dans le cadre d'une analyse de variance. Il permet d'identifier les facteurs significatifs. Ensuite un test de Student est mis en oeuvre pour tester la nullité des paramètres des modèles (4) et (5), et par conséquent évaluer leur pertinence avant interprétation. A l'issue de ces tests, nous pouvons donc déterminer les facteurs de conception critiques et interpréter leurs effets.

Dans le cas où l'utilisateur souhaiterait détecter de potentiels effets synergiques entre les facteurs, la structure du modèle ANOVA devrait être légèrement modifiée pour y inclure des interactions. A titre d'exemple, le modèle suivant intègre dans son équation uniquement des interactions doubles :

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^p \beta_i \cdot u_{i,k} + \sum_{j=1}^{p-1} \sum_{l=j+1}^p \beta_{jl} \cdot u_{j,k} \cdot u_{l,k} + E_k \quad (5)$$

Les paramètres (coefficients)  $\beta_{jl}$  « mesurent » la force de ces interactions entre facteurs.

#### 4.9 Détermination d'un modèle de type surface de réponse et valeurs des paramètres de conception permettant d'optimiser les réponses d'intérêt

Si le plan d'expériences numériques choisi est un plan d'optimisation, le modèle mathématique associé est un modèle « Surface de Réponse » du type :

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^p (\beta_i \cdot u_{i,k} + \beta_{ii} \cdot u_{i,k}^2) + \sum_{i,j,i \neq j} \beta_{i,j} \cdot u_{i,k} \cdot u_{j,k} + E_k \quad (6)$$

avec :

- $\beta_{ii}$ , effet quadratique du facteur  $i$  ;
- $\beta_{i,j}$ , effet d'interaction des facteurs  $i$  et  $j$ .

Dans ce cas, les facteurs d'entrée sont des variables quantitatives qui possèdent au moins trois valeurs différentes dans le plan d'expériences. La qualité du modèle à reproduire le comportement simulé est mesurée par la valeur du coefficient de détermination ajusté. Si cette valeur est satisfaisante ( $> 0,85$ ) alors le modèle peut être utilisé pour rechercher les valeurs des facteurs conduisant à l'optimisation de la réponse étudiée.

## 5 Exemple de criblage virtuel de NPs en radiothérapie

### 5.1 Planification d'expériences numériques (sous R)

On cherche à cribler des paramètres de conception et d'utilisation d'un projet de NP dédiée à la radiothérapie. Les questions soulevées dans cette étude sont les suivantes :

1. parmi les facteurs de conception de la NP étudiée, quels sont les plus influents sur le rehaussement de dose dans la zone d'intérêt (là où se situent les NPs) ?
2. quel est le niveau de diffusion spatiale du rehaussement de dose dans les zones géographiques périphériques de la zone principale d'intérêt (zones voisines sans NPs) ?
3. les effets de potentialisation de la radiothérapie sont-ils dépendants du phénomène d'agrégation des NPs ?
4. quels sont les effets des facteurs d'usage : concentration des NPs et dose de rayonnement / aux facteurs de conception ?
5. quelles sont les espèces secondaires générées de façon significative par les interactions rayonnement-NPs ?

Pour répondre à ces questions, nous mesurons pendant les simulations 5 variables différentes, notées Y1 à Y5 (Table 3). Pour l'étude de criblage, nous étudierons 7 facteurs, notés U1 à U7 dans le Table 4. Comme précisé dans cette étude de criblage, chaque facteur ne prend que 2 modalités. Pour étudier les effets de chacun de ces 7 facteurs un modèle d'étude de facteurs sans interaction a été choisi. Pour estimer les coefficients (paramètres) de ce modèle, un plan de Plackett-Burman [124] a été utilisé et répété 10 fois (voir Table 5).

Au total, compte tenu des répétitions, 8 configurations différentes de NPs sont à tester et 80 essais de simulation sont à réaliser sur GATE.

### 5.2 Modélisation (sous GATE)

Pour toutes les expériences, l'environnement est le même :

- cube d'air de 11 cm x 11 cm ;
- cube d'eau de 5 cm x 5 cm au centre du cube d'air.

Un faisceau d'irradiation constitué de photons d'énergie égale à 160 keV irradie le cube d'eau par le dessous. La source de rayonnement est située à 100 cm du centre du cube, le faisceau est conique et son diamètre au centre du cube est de 200 nm. Le cluster de NPs est situé à 2,4 cm du centre du cube en direction de la source de rayonnement ce qui permet d'être placé

TABLE 3 – Liste des variables de réponses générées par les simulations et analysées ensuite statistiquement

Symb	Réponse	Unité
Y1	Production de photons ( <i>i.e.</i> suite à effet Compton)	A.U.
Y2	Total des espèces secondaires produites (en grande majorité électrons)	A.U.
Y3	Rehaussement de dose Zone centrale (avec NP)	%
Y4	Rehaussement Dose Zone périphérique proche (sans NP)	%
Y5	Rehaussement Dose Zone périphérique éloignée (sans NP)	%

TABLE 4 – Liste des facteurs étudiés et leurs modalités. Les deux niveaux de chaque facteur sont ensuite codés respectivement par les valeurs -1 et +1 dans les algorithmes d'analyse.

Symb	Facteur	N	Niveaux
U1	Z_Material_Loading	2	12 24
U2	Z_Material_Composition	2	Gd Pt
U3	Core_Diameter	2	2 4
U4	Core_Chem_Composition	2	Au Si
U5	NP_Concentration	2	8000 64000
U6	Radiation_Dose	2	$25 \cdot 10^6$ photons $12,5 \cdot 10^6$ photons
U7	NP_Agregation	2	Non Oui

au maximum de dose du rendement en profondeur du faisceau incident et ainsi de diminuer le nombre d'événements nécessaires à l'obtention d'une statistique acceptable.

Pour chaque expérience, la NP a été créée selon le schéma suivant :

1. une sphère d'eau de taille égale au diamètre de la NP (4 ou 6 nm) ;
2. au centre de cette sphère, le cœur modélisé par une sphère de diamètre 2 ou 4 nm remplie d'or ou de silice ;
3. le « loading », des sphères qui entourent le cœur de la NP :
  - (a) création d'une sphère d'eau de rayon inférieur à 0,5 nm ;
  - (b) au centre de cette sphère, une sphère remplie de platine (rayon 0,177 nm) ou de gadolinium (rayon 0,233 nm) ;



TABLE 5 – Plan d'étude de facteurs (sans interaction) de Plackett-Burman

N°Exp	U1 Nb. atomes	U2 Gd/Pt	U3 nm	U4 Au/Si	U5 Nb. NP / volume	U6 Gy	U7
1	24	Pt	4	Au	N2	D1	Non
2	12	Pt	4	Si	N1	D2	Non
3	12	Gd	4	Si	N2	D1	Oui
4	24	Gd	2	Si	N2	D2	Non
5	12	Pt	2	Au	N2	D2	Oui
6	24	Gd	4	Au	N1	D2	Oui
7	24	Pt	2	Si	N1	D1	Oui
8	12	Gd	2	Au	N1	D1	Non

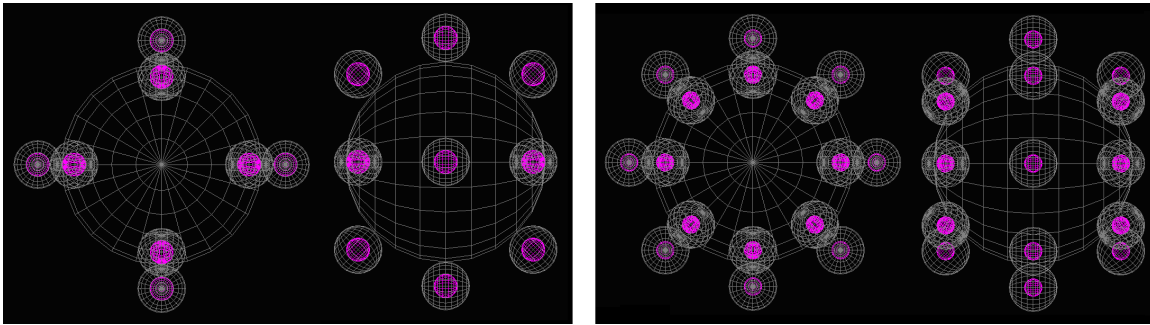


FIGURE 10 – Vues orthogonales (face et profil) de NPs conçues sur GATE; à gauche, une NP avec un « loading » de  $3 \times 4 = 12$  atomes; à droite une NP avec un « loading » de  $3 \times 8 = 24$  atomes.

(c) autour de cette sphère 6 atomes d'azote (rayon 0,056 nm) et 25 atomes de carbone (rayon 0,067 nm);

4. répliquation du « loading » de façon sphérique autour du cœur (12 ou 24 selon un schéma  $3 \times 4$  atomes ou  $3 \times 8$  atomes) visibles sur la Figure 10.

Ensuite, la NP est répliquée sous forme de cube (Figure 11) :

- $20 \times 20 \times 20$  NPs = 8000 NPs
- $40 \times 40 \times 40$  NPs = 64000 NPs

Si les NPs sont agrégées, l'espace entre 2 NPs du cube (ou cluster) est nul; la taille du cube est donc variable. Si les NPs ne sont pas agrégées, le côté du cluster est fixe et égal à 360 nm; c'est donc l'espacement entre les NPs qui est variable.

En plus des 8 cas issus du Table 3, nous avons créé 2 modèles témoins sans NPs.

### 5.3 Simulation (sous GATE)

Chaque exemple a été découpé en 10 runs de  $12,5 \cdot 10^6$  ou  $25 \cdot 10^6$  photons primaires chacun. Nous avons lancé 16 runs en même temps pour une durée de 24 heures. Le temps total de simulation aura donc été de 7 jours.

Les résultats obtenus étaient soient :

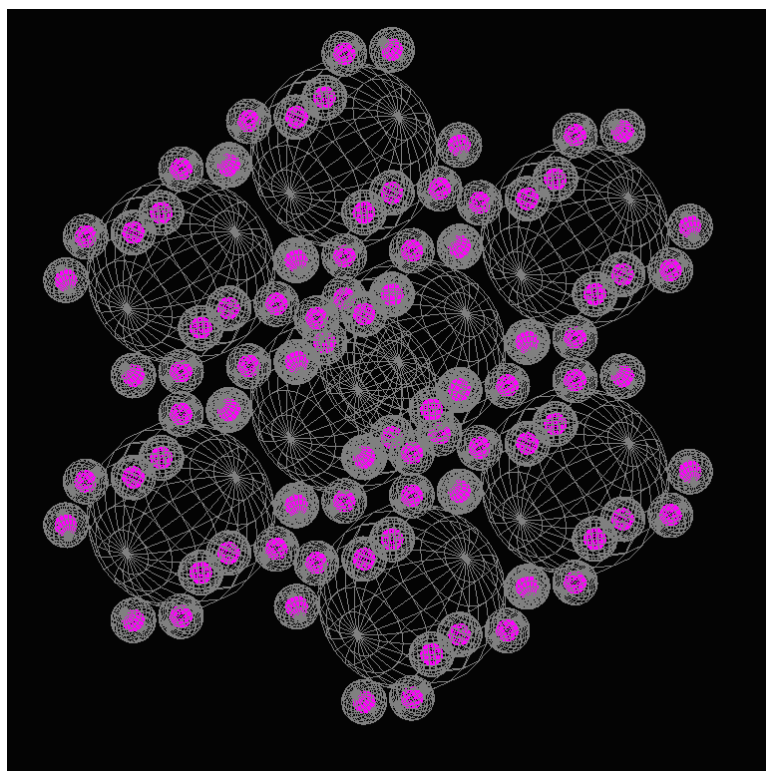


FIGURE 11 – Exemple d’un cluster de  $2*2*2$  NPs = 8 NPs agrégées.

- image de dose :  $5 \times 5 \times 5 \mu\text{m}$  en  $5000 \times 5000 \times 1 \text{ px}$  ;
- histogrammes de création des espèces secondaires dans un cube de côté  $10 \mu\text{m}$  centré sur le système à base de NPs (lu avec ROOT), exemple en Figure 12.

Pour chaque exemple nous obtenons 10 images et 10 histogrammes. Les images ont été sommées pour obtenir une unique image dite sommée représentant l’exemple. Les données des histogrammes ont été récupérées comme mentionné précédemment.

#### 5.4 Traitement des images (sous ImageJ)

Pour chaque exemple, nous avons analysé l’image sommée en la découpant en 13 régions d’intérêt (ROI) visibles sur la Figure 13.

Pour chaque zone d’intérêt, la dose a été récupérée dans un tableur. Ensuite, les valeurs issues des simulations avec présence de NPs ont été normalisées à la valeur lue pour les modèles témoins sans NP à nombre de photons primaires équivalents.

#### 5.5 Analyses statistiques (sous R)

Une fois les 5 variables de réponse de simulation mesurées, les paramètres du modèle (4) ont été estimés sous R pour chacune des réponses étudiées. La principale instruction utilisée sous R est la fonction  $lm()$ .

### Fragment production

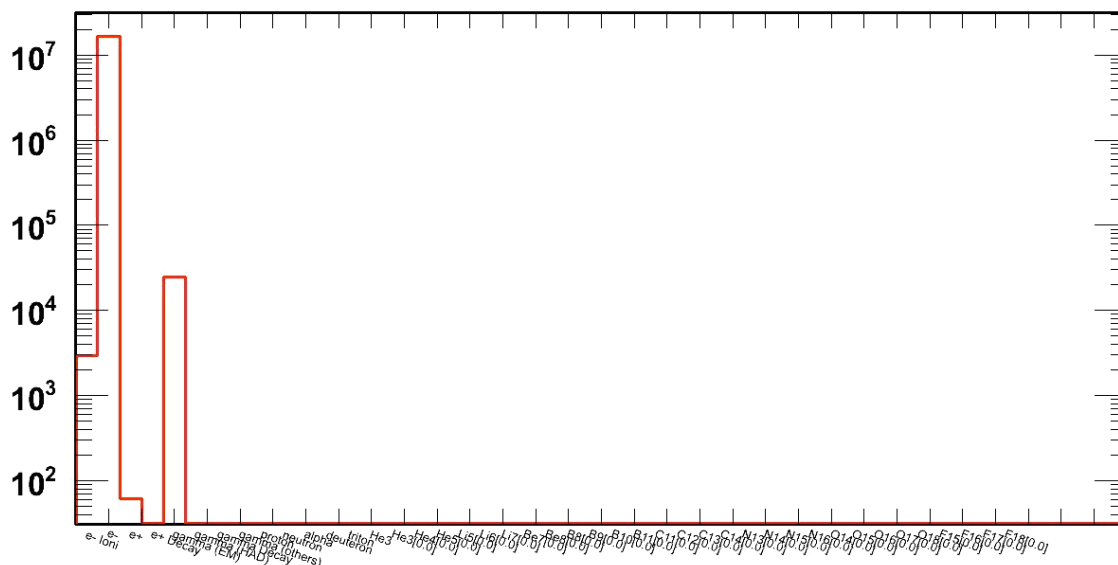


FIGURE 12 – Exemple d’un histogramme représentant le nombre de particules créées (ordonnées) en fonction de la nature des particules créées (abscisses).

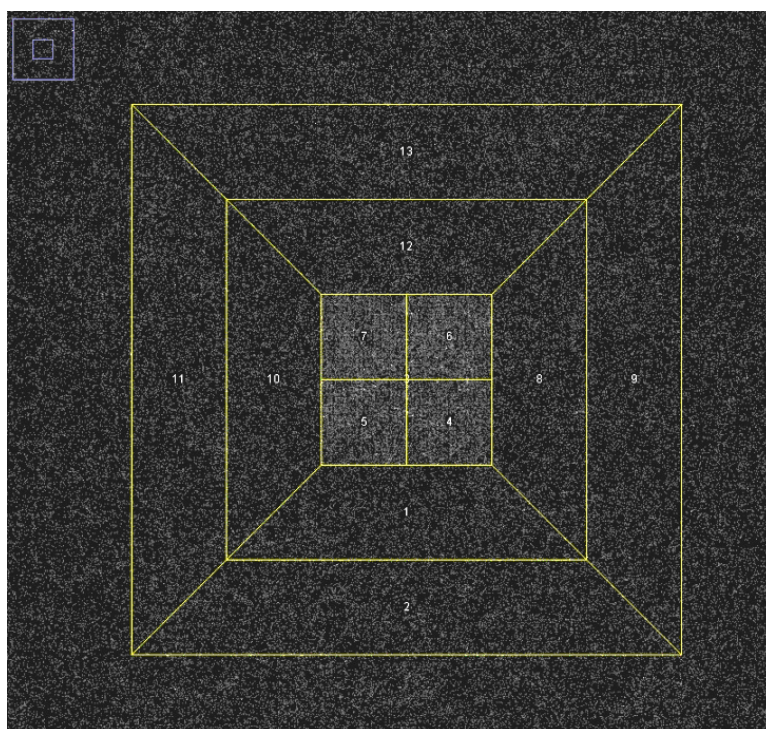


FIGURE 13 – Découpage de l’image sommée en régions d’intérêt.

### Réponse Y1

Le Table 6 et la Figure 14 présentent les résultats obtenus pour la réponse Y1 (Production de photons).

Résultat : aucun paramètre n'a d'effet significatif sur la réponse de Y1. Par conséquent, il n'y a aucune influence significative d'un des sept facteurs étudiés sur la production des photons secondaires.

### Réponse Y2

Le Table 6 et la Figure 14 présentent les résultats obtenus pour la réponse Y2 (Total des espèces secondaires produites).

Résultat : deux paramètres sont statistiquement significatifs : b3 et b6. Le premier indique une influence positive très probable de la taille du cœur de la NP étudiée. La production d'électrons est significativement augmentée avec celle du diamètre du cœur. b6 indique une influence probable de la dose de rayonnement. Compte tenu des modalités du facteur U6, il apparaît que la production d'électrons augmente avec celle de la dose de rayonnement incident (ce qui est bien sûr évident).

### Réponse Y3

Le Table 6 et la Figure 14 présentent les résultats obtenus pour la réponse Y3 (Rehaussement de dose Zone centrale (avec NP)).

Résultat : tous les paramètres sont statistiquement significatifs sur le rehaussement de dose dans la zone d'intérêt, c'est-à-dire celle avec les NPs. Pour faciliter l'interprétation des résultats, le Table 7 présente, pour l'ensemble des facteurs, les modalités permettant d'augmenter le rehaussement de dose. Ces modalités sont indiquées dans des cases rouges (une différence négative dans les Table 6 et Figure 14 signifie que c'est la première modalité qui prédomine ; un signe positif la deuxième). Il s'agit donc d'une NP à « gros » cœur en or et « fortement » chargée en platine. Selon les valeurs des paramètres b1 à b4, cette architecture permet d'augmenter à elle seule l'effet de dose d'environ 100% par rapport à la réponse moyenne. De plus, son usage avec une forte concentration, une dose importante de rayonnement et en l'absence d'agrégation entre NPs augmente encore ce rehaussement de 65% (b5+b6+b7). Au total, par rapport à l'eau environnante, le rehaussement obtenu dans cette configuration pourrait atteindre environ 300%, **c'est-à-dire un effet de dose trois plus important avec NPs que sans NPs**. La Figure 15 est un diagramme de Pareto qui permet de classer les facteurs significatifs du plus important au moins important. Dans cet exemple, la nature de composition du cœur est le facteur le plus important (18% d'influence environ) alors que le phénomène d'agrégation est le moins important (10% environ).

### Réponse Y4

Le Table 6 et la Figure 14 présentent les résultats obtenus pour la réponse Y4 (Rehaussement Dose Zone périphérique proche (sans NP)).

Résultat : deux paramètres sont statistiquement significatifs : b3 et b6. Comme pour l'étude de la réponse Y2 (production d'espèces secondaires : électrons) le premier indique une influence positive très probable de la taille du cœur de la NP étudiée. Le rehaussement de dose dans la première zone périphérique (sans NP) de la zone d'intérêt augmente légèrement avec celle du diamètre du cœur. Toutefois, en examinant la valeur du coefficient b3, on s'aperçoit que cette augmentation, bien que significative, atteint à peine 3%, ce qui est environ 10 fois plus faible que les valeurs obtenues pour Y3. Idem b6 indique une influence probable de la dose de rayonnement avec un rehaussement accru lorsque la dose de rayonnement incident augmente mais cette augmentation est encore plus faible (à peine 1%).

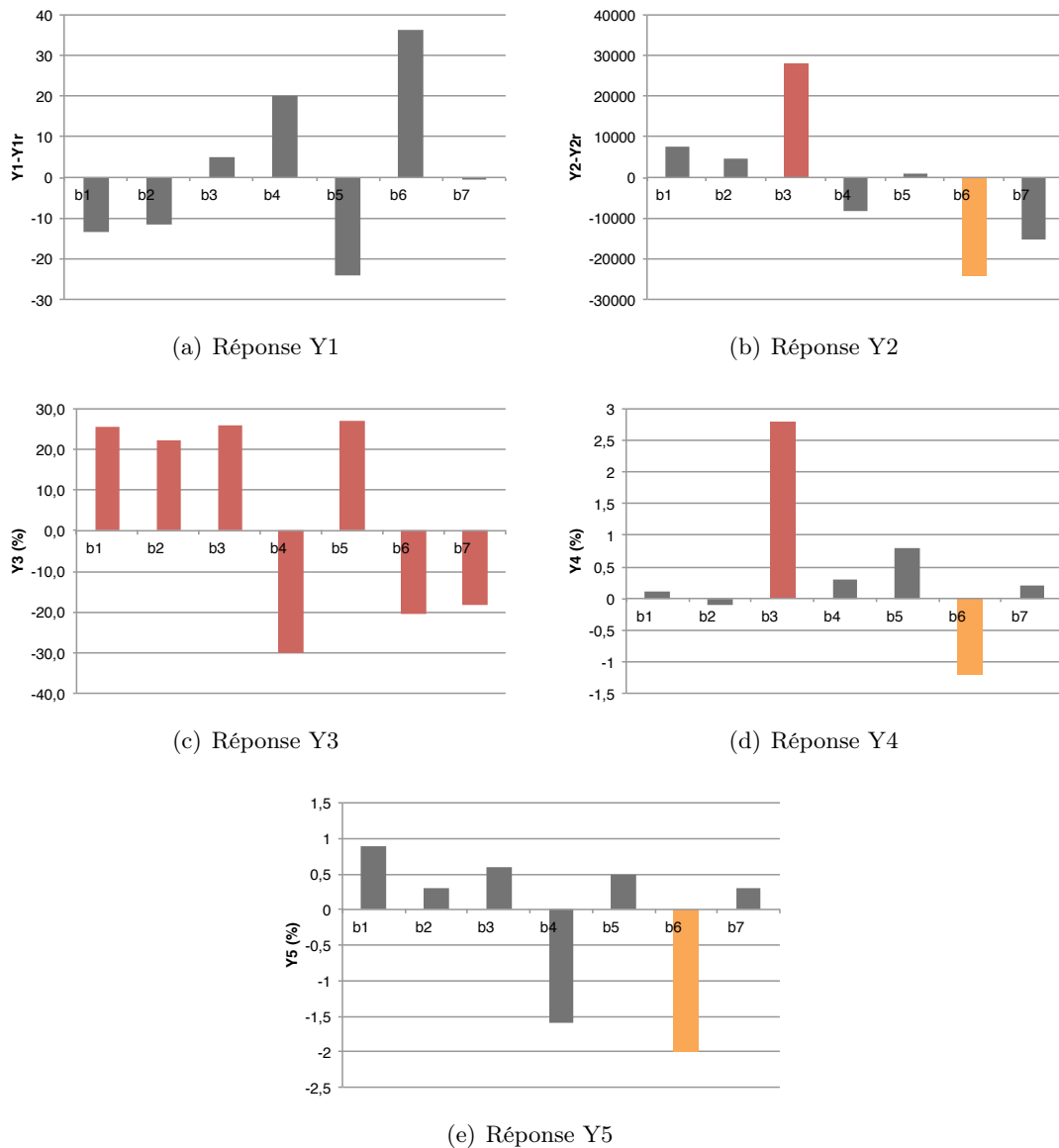


FIGURE 14 – Diagrammes en bâtons des paramètres du modèle de criblage des réponses Y1 à Y5 (gris : pas significatif, orange : probablement significatif, rouge : très probablement significatif).

## Réponse Y5

Le Table 6 et la Figure 14 présentent les résultats obtenus pour la réponse Y5 (Rehaussement Dose Zone périphérique éloignée (sans NP)).

Résultat : un seul paramètre est statistiquement significatif : b6. Il indique une influence probable de la dose de rayonnement avec un rehaussement accru dans la seconde zone périphérique sans NP, augmentation obtenue lorsque la dose de rayonnement incident augmente, mais cette augmentation reste faible (2% environ).

Les études comparatives de Y3, Y4 et Y5 montre clairement un **rehaussement de dose discriminant** car il ne concerne quasiment que la zone où se situent les NPs.

TABLE 6 – Liste des paramètres estimés du modèle de criblage des réponses Y1 à Y5 et leur significativité

(a) Réponse Y1

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp.	Signif. %
b0	-158,53125		34,018631	-4,66	< 0,01 ***
b1	-13,53125	1,00	34,018631	-0,40	69,4
b2	-11,53125	1,00	34,018631	-0,34	73,8
b3	4,84375	1,00	34,018631	0,14	88,8
b4	20,03125	1,00	34,018631	0,59	56,1
b5	-24,28125	1,00	34,018631	-0,71	48,2
b6	36,40625	1,00	34,018631	1,07	29,5
b7	-0,21875	1,00	34,018631	-0,01	99,5

(b) Réponse Y2

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp.	Signif. %
b0	29065,625		8983,5706	3,24	0,352 **
b1	7465,625	1,00	8983,5706	0,83	41,4
b2	4503,125	1,00	8983,5706	0,50	62,1
b3	27934,375	1,00	8983,5706	3,11	0,478 **
b4	-8346,875	1,00	8983,5706	-0,93	36,2
b5	984,375	1,00	8983,5706	0,11	91,4
b6	-24115,625	1,00	8983,5706	-2,68	1,30 *
b7	-15109,375	1,00	8983,5706	-1,68	10,6

(c) Réponse Y3

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp.	Signif. %
b0	139,3		2,1591165	64,51	< 0,01 ***
b1	25,7	1,00	2,1591165	11,91	< 0,01 ***
b2	22,3	1,00	2,1591165	10,35	< 0,01 ***
b3	25,8	1,00	2,1591165	11,94	< 0,01 ***
b4	-30,2	1,00	2,1591165	-14,00	< 0,01 ***
b5	27,0	1,00	2,1591165	12,52	< 0,01 ***
b6	-20,3	1,00	2,1591165	-9,39	< 0,01 ***
b7	-18,1	1,00	2,1591165	-8,38	< 0,01 ***

(d) Réponse Y4

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp.	Signif. %
b0	103,4		0,68012139	152,04	< 0,01 ***
b1	0,1	1,00	0,68012139	0,14	89,2
b2	-0,1	1,00	0,68012139	-0,14	89,2
b3	2,8	1,00	0,68012139	4,09	0,0420 ***
b4	0,3	1,00	0,68012139	0,41	68,3
b5	0,8	1,00	0,68012139	1,24	22,7
b6	-1,2	1,00	0,68012139	-1,79	8,6
b7	0,2	1,00	0,68012139	0,32	75,1

(e) Réponse Y5

Nom	Coefficient	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp.	Signif. %
b0	99,2		0,95929526	103,36	< 0,01 ***
b1	0,9	1,00	0,95929526	0,94	35,4
b2	0,3	1,00	0,95929526	0,36	72,3
b3	0,6	1,00	0,95929526	0,62	54,2
b4	-1,6	1,00	0,95929526	-1,66	11,0
b5	0,5	1,00	0,95929526	0,55	58,5
b6	-2	1,00	0,95929526	-2,05	5,1
b7	0,3	1,00	0,95929526	0,36	72,3

TABLE 7 – Table des modalités (en rouge) conduisant à augmenter significativement le rehaussement de dose (Y3)

Facteur	Nb. niveaux	Niveaux
Z_Material>Loading	2	12 24
Z_Material_Composition	2	Gd Pt
Core_Diameter	2	2 4
Core_Chem_Composition	2	Au Si
NP_Concentration	2	8000 64000
Radiation_Dose	2	$25 \cdot 10^6$ photons $12,5 \cdot 10^6$ photons
NP_Agregation	2	Non Oui

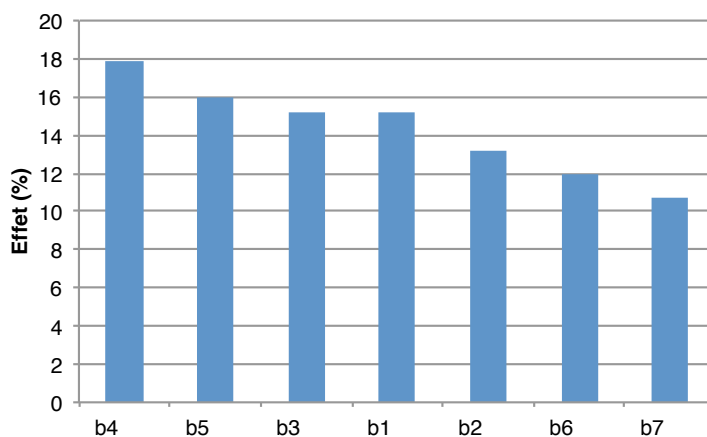


FIGURE 15 – Diagramme de Pareto des paramètres du modèle de criblage et par conséquent de l'influence des facteurs associés.

## 6 Conclusion

Les résultats statistiques obtenus dans les deux étapes précédentes permettent de définir les paramètres critiques de la NP ainsi que les valeurs optimales de leur conception. A l'issue de ce type d'étude nous connaissons donc les formulations les plus prometteuses à tester en priorité dans des expériences *in vitro* pour infirmer ou confirmer les résultats dans un véritable contexte biologique. Ce criblage virtuel de NP contribue à accélérer la phase de développement préclinique

de ce type de médicament et ainsi permettrait de réduire la durée des études et les coûts associés.





Troisième partie

Analyse de robustesse *in silico* / *in*  
*silico*



## 1 Préambule

### 1.1 Contexte, problème posé et positionnement

Suite à l'élaboration d'un premier processus de criblage virtuel des NPs à visée radiosensibilisante, nous avons souhaité réaliser une analyse de robustesse de notre simulateur Monte-Carlo Geant4-GATE. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné lors de l'étude bibliographique que nous avons réalisée, nous avons constaté que les valeurs des paramètres de simulation choisis dans les études *in silico* (Monte-Carlo en particulier) étaient très variables. Une des conséquences de cette variabilité est que des auteurs utilisant les mêmes codes de simulation ont trouvé des résultats significativement différents, notamment en ce qui concerne l'influence des électrons Auger ou la pénétration des espèces secondaires dans les tissus entourant leur lieu de production.

Afin d'avancer vers une plus grande standardisation des pratiques, il nous a paru indispensable de caractériser le simulateur que nous utilisons pour notre processus de criblage. Pour cela, nous avons établi une méthodologie d'analyse de robustesse des simulateurs dédiés aux nanoradiosensibilisateurs et l'avons utilisée sur Geant4-GATE.

### 1.2 Objectifs et originalité

Comment identifier efficacement les paramètres intrinsèques à un simulateur pouvant avoir un effet sur les résultats et comment quantifier leur influence ? Alors que de nombreuses équipes ont utilisé des simulateurs Monte-Carlo pour estimer l'efficacité de leurs NPs radiosensibilisantes, cette question n'a jamais été posée. Il est néanmoins important d'y répondre puisque bien souvent, lorsqu'il s'agit de volumes de l'ordre du nm et d'énergies très faibles, les plateformes de simulation sont utilisées dans leurs conditions extrêmes et il peut y avoir des effets de bord pouvant significativement modifier les résultats. Si des précautions n'ont pas été prises quant à ces effets de bords, l'opérateur peut imputer à tort un effet à une NP ou inversement, ne pas voir l'effet radiosensibilisant d'un nano-objet.

### 1.3 Méthode et outils

Pour réaliser notre analyse de robustesse, nous nous sommes placés dans le cadre d'une géométrie simple, utilisée par Delorme [1] dans sa thèse de science intitulée "Radiothérapie par Photoactivation de Nanoparticules : Modélisation à l'échelle Sub-Micrométrique et Comparaison Expérimentale". Ainsi, nous avons modélisé une NP de diamètre 100 nm placée au centre d'une sphère d'eau de diamètre 1  $\mu\text{m}$  irradiée par une source de photons mono-énergétique de 85 keV placée au contact de la NP dans notre simulateur GATE 7.0 utilisant la version 9.6.p03 de Geant4.

Nous avons tout d'abord créé un diagramme d'Ishikawa qui nous a permis de recenser tous les paramètres du simulateur pouvant avoir une influence sur les résultats (pouvoir radiosensibilisant de la NP). Ensuite, nous avons appliqué une méthode d'analyse des risques inspirée du « Failure Mode Effect Analysis » (FMEA) pour attribuer, à chacun des paramètres spécifiés dans le diagramme d'Ishikawa, un score de criticité fonction de son impact présumé sur les résultats. Ce score est fixé *a priori* par l'expert en radiophysique. Ensuite, l'analyse de robustesse n'est effectuée que sur les paramètres présentant un score supérieur à un seuil de tolérance.

Afin de réduire le nombre de simulations à réaliser, nous avons utilisé un plan d'expérience numérique de Plackett et Burman (matrice d'Hadamard).

L'effet de chaque facteur a été évalué sur une matrice de dose 3D déposée dans la sphère d'eau mentionnée ci-avant.

## 1.4 Résultats

Nous avons identifié 9 facteurs d'influence susceptibles d'impacter significativement le résultat des simulations. Chacun de ces facteurs prenant 2 niveaux, il aurait été nécessaire de réaliser  $2^9 = 512$  simulations différentes si nous avons choisi un plan factoriel complet ; l'utilisation d'un plan de Plackett et Burman nous a permis de réduire le nombre de simulations à 16.

Les principaux facteurs influents que nous avons identifiés sont :

- l'activation (ou non) des électrons Auger ;
- le seuil de coupure bas en énergie ;
- la densité du matériau dans lequel est réalisée la simulation (la sphère de  $1 \mu\text{m}$ ) ;
- la fluence de la source de photons.

Le paramètre "Fluence de la source de photons" était évidemment influent et nous a servi de test pour évaluer notre capacité à détecter un paramètre influent ou non.

## 1.5 Conclusions et perspectives

Nous avons proposé une méthodologie puis réalisé une analyse de robustesse de notre simulateur Monte-Carlo GATE. Notre méthodologie nous a permis d'évaluer l'influence des paramètres intrinsèques à notre simulateur et les paramètres les plus critiques seront gardés fixes durant l'utilisation du simulateur pour des finalités de criblage virtuel.

Cette partie a fait l'objet d'une soumission à publication dans le journal IEEE Transactions on Nanobioscience d'un article intitulé "Robustness Analysis of a Geant4-GATE Simulator for Nano-Radiosensitizers Characterization" qui est présenté ci-après [8].

## 2 Introduction

The use of nano-objects as radiosensitizers is rapidly increasing and has become a major subject of interest as a new strategy to fight cancer. This concept has already been proven *in vitro* and *in vivo* by a number of authors [14] but only few NPs are undergoing clinical trials (only 3 records concerning NBTXR3 [126] devices on [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)). Even though a lot of preclinical studies are conducted to investigate the effects of nano-objects combined with X-rays on cells/tissues/tumors, only few robust knowledge of the physical and chemical mechanisms involved have emerged.

A common way to investigate these mechanisms is to use Monte-Carlo simulation methods with particle transport codes such as BEAM [127], MCNP [128], PENELOPE [129] or Geant4 [117]. These simulations are time consuming, strongly code or model dependent and do not compare well between each other. It has already been noticed that the lack of standardization in preclinical studies of nano-radiosensitizers could partially explain the low number of translation to clinical applications [6]. This seems to become problematic in the field of NPs, since, in a recent review concerning targeted GNP, Kodiha *et al.* also wrote : "Since gold nanoparticles size, morphology, functionalization, concentration and the cell types analyzed vary significantly, it is difficult to compare results from different laboratories" [130].

Concerning Monte-Carlo simulations, for instance, opposite information about the dose deposited by Auger or photo-electrons in the vicinity of NPs have been published in the literature. McMahon *et al.* found that the contribution of Auger electrons was dominant [14] and Douglass *et al.* claimed that the Auger electrons contribution was insignificant [15] even though they were using the same simulation code (Geant4). As another example, several studies aimed at estimating the diffusion abilities of secondary species induced in case of interactions between X-rays

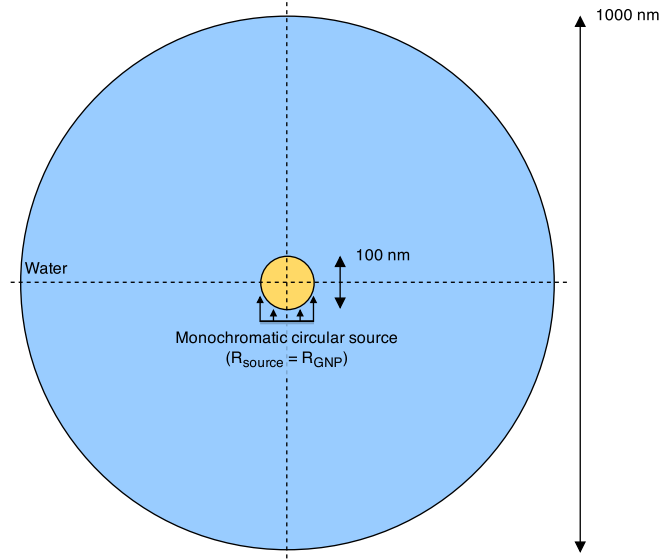


FIGURE 16 – Graphical 2D representation of the geometry proposed by Delorme [1]; the yellow sphere is a GNP.

and NPs. A number of authors have concluded to very different path of secondary electrons, ranging from a few tens of nanometers to a few micrometers. For example, Chattopadhyay *et al.* using a 100 kVp X-ray beam and GNPs, reported that 99% of the electrons were stopped before 100 nm, because of their low average energy and a very short penetration range [56, 87]. Meesungnoen *et al.*, for their part, have described a penetration range shorter than 20  $\mu\text{m}$  for photoelectrons with an average energy of about 43 keV [103].

According to these observations, we propose a first attempt towards more standardization and comparability between Monte-Carlo studies by computing a robustness and sensitivity analysis of a Geant4-GATE [131] simulator dedicated to the physical characterization of nano-radiosensitizers.

### 3 Numerical Modeling & Simulation

#### 3.1 Geometry of the simulation

We first had to choose a simple geometry that could be easily modeled on most simulators. In an interesting thesis work, Delorme proposed the following irradiation setup [1] : a spherical GNP of radius 50 nm is placed in the center of the space ; a circular irradiation source emitting mono-energetic 85 keV photons is placed directly at the touch of the GNP (radius of 50 nm) ; all primary photons follow the same direction towards the GNP ; the GNP is surrounded by a water sphere of radius 500 nm. See Figure 16 for a graphical representation of this design. For normalization purposes, each simulation was done twice : with and without a GNP.

#### 3.2 Monte-Carlo simulator

For the current study, we used GATE 7.0 with the Geant4 9.6.p03 and CLHEP 2.1.3.1 libraries. The pseudorandom number generator was the Mersenne Twister. We chose the Livermore physics list and activated Rayleigh scattering, photoelectric, Compton scattering, pair conver-

TABLE 8 – Fixed Physics List Parameters

Process	Model	Final range
Rayleigh scattering	Livermore	Default
Photoelectric effect	Livermore	0.1 nm
Compton scattering	Livermore	0.1 nm
Pair conversion	Livermore	Default
Electron ionization	Livermore	0.1 nm
Positron ionization	Penelope	0.1 nm
Bremsstrahlung e-	Livermore	Default
Bremsstrahlung e+	Livermore	Default
Multiple scattering e-	Urban95	Default
Multiple scattering e+	Urban95	Default

sion, electron ionization and Bremsstrahlung effects. For the multiple scattering, we chose the Urban95 model. More information about the fixed parameters of our physics list can be found in Table 8. As the Auger electrons and the spatial and energy cutoffs will be part of the robustness and sensitivity analysis we will introduce them in the following section. At the end of the simulation the following results are recorded : 3D dose images (cube with a size of 1  $\mu\text{m}$ ), secondary species production in the surrounding sphere (including the GNP) and a spectrum of the energy deposited in the surrounding sphere (including the GNP).

## 4 Prior Risk Analysis

In a first step, prior knowledge is used to distinct three groups of simulation factors. The first two sets are composed of factors estimated by an expert as either very active or unimportant. The last group contains simulation parameters for which we do not have sufficient information to evaluate their relevance.

### 4.1 Identification of Factors

To break down root causes that potentially contribute to a particular effect on the simulation results, we decided to build up an Ishikawa diagram presented in Figure 17. No human or management factor was identified. The 16 simulation parameters that could cause variations on the numerical results are due to the simulation method, the measurements, the modeling of the environment and the computational mode. It should be noticed that only simulator or analysis parameters that could influence the results were listed. The nano-radiosensitizers parameters such as the size or shape of the object were not evaluated. Indeed, these parameters influence should be assessed only once the simulator robustness has been characterized.

### 4.2 Risk Ranking

To *a priori* discriminate between those 16 simulation parameters, we have implemented a risk ranking method inspired by « Failure Mode Effect Analysis » (FMEA). The potential impact of

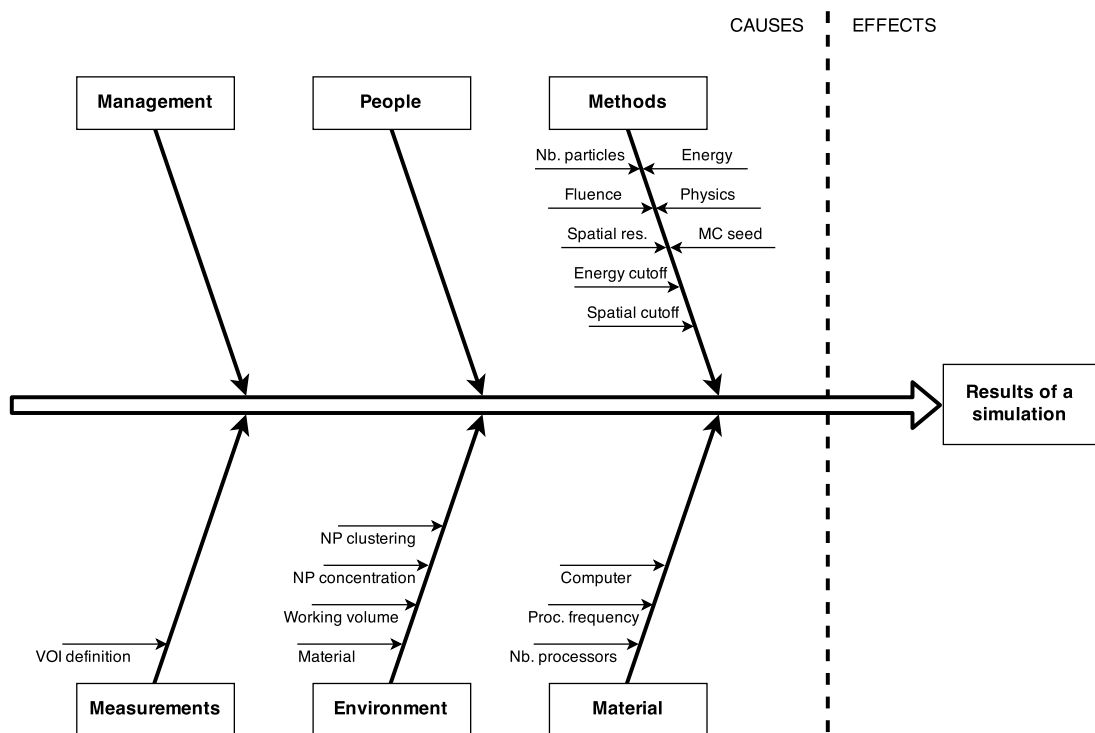


FIGURE 17 – Ishikawa diagram of factors that have a potential impact on the simulation results

TABLE 9 – Risk Ranking (Impact)

Impact (score)	Description of the impact on the simulation results
High (20)	Significant changes with major effects on the results
Moderate (12)	Moderate effects
Low (4)	Acceptable, few or no effects

TABLE 10 – Risk Ranking (Uncertainty)

Uncertainty (score)	Description
High (7)	No information
Moderate (3)	Some data published in external literature
Very Low (1)	Impact of specific variant established in external literature or in the simulator documentation

each simulation factor is quantified on a discrete scale ranging from 4 to 140, in which 4 means no risk to be critical and 140 a surely significant consequence. The score of criticality is computed



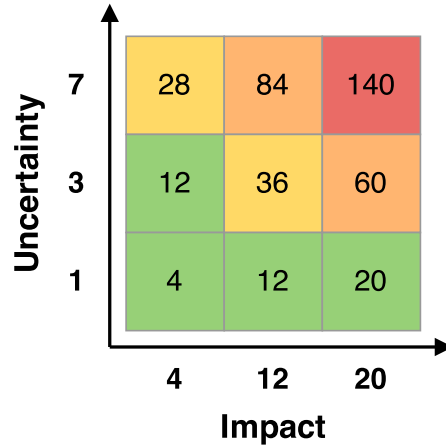


FIGURE 18 – Diagram of the criticality score. Scores were calculated using the formula (7) and the values of the impact and uncertainty listed in Table 9 and 10. Green scores were considered non-significant and were not further analyzed.

TABLE 11 – Criticality, Impact and Uncertainty Scores

Factor	Impact	Uncertainty	Criticality
Number of primaries	20	1	20
Initial energy spectrum	20	1	20
Photon fluence	4	7	<b>28</b>
Physics (Auger electrons)	20	3	<b>60</b>
Spatial resolution (dose image)	12	7	<b>84</b>
Monte-Carlo seeds	12	3	<b>36</b>
Energy cutoff	12	7	<b>84</b>
Spatial cutoff	12	7	<b>84</b>
Computer	4	7	<b>28</b>
Processors frequencies	4	3	12
Number of processors	4	1	4
NP clustering	20	3	60
NP concentration	20	3	60
Working volume dimensions	4	7	<b>28</b>
Medium material	12	3	<b>36</b>
Volume of interest definition	20	1	20

by multiplying two variables :

$$C = I \cdot U \quad (7)$$

where  $C$  is the criticality score while  $I$  and  $U$  are the impact and uncertainty attributes respectively (see Table 9 and 10). The latter are estimated by an expert in radiophysics for each of

TABLE 12 – Plackett-Burman Screening Design

#Experiment	Surrounding sphere radius	Surrounding sphere medium	Fluence (source radius)	Spatial resolution	Energy cutoff	Spatial cutoff	Auger activated?	Computer
1	500 $\mu\text{m}$	Silicon	250 nm	2 nm	250 eV	10 nm	No	#1
2	0.5 $\mu\text{m}$	Silicon	250 nm	10 nm	8 eV	0.1 nm	No	#1
3	0.5 $\mu\text{m}$	G4_WATER	250 nm	10 nm	250 eV	10 nm	Yes	#2
4	0.5 $\mu\text{m}$	G4_WATER	250 nm	10 nm	250 eV	0.1 nm	No	#2
5	500 $\mu\text{m}$	G4_WATER	50 nm	10 nm	250 eV	10 nm	Yes	#1
6	0.5 $\mu\text{m}$	Silicon	50 nm	2 nm	250 eV	10 nm	No	#2
7	0.5 $\mu\text{m}$	G4_WATER	50 nm	2 nm	8 eV	10 nm	No	#1
8	500 $\mu\text{m}$	G4_WATER	250 nm	2 nm	8 eV	10 nm	No	#2
9	500 $\mu\text{m}$	Silicon	50 nm	10 nm	8 eV	0.1 nm	No	#2
10	0.5 $\mu\text{m}$	Silicon	50 nm	2 nm	250 eV	0.1 nm	Yes	#2
11	500 $\mu\text{m}$	G4_WATER	250 nm	2 nm	8 eV	0.1 nm	Yes	#2
12	0.5 $\mu\text{m}$	Silicon	250 nm	10 nm	8 eV	10 nm	Yes	#1
13	500 $\mu\text{m}$	G4_WATER	50 nm	10 nm	250 eV	0.1 nm	No	#1
14	500 $\mu\text{m}$	Silicon	250 nm	2 nm	250 eV	0.1 nm	Yes	#1
15	500 $\mu\text{m}$	Silicon	50 nm	10 nm	8 eV	10 nm	Yes	#2
16	0.5 $\mu\text{m}$	G4_WATER	50 nm	2 nm	8 eV	0.1 nm	Yes	#1

the 16 examined computational factors.  $I$  is a probability measure for a given factor to cause severe simulation variations and  $U$  is based on the relevance of the information used to assign the impact ranking. The Figure 18 shows the criticality scores.

Table 11 shows the repartition of the 16 preselected simulation factors. Criticality scores were calculated using the formula (7) and the values of the impact and uncertainty listed in Table 9 and 10. Factors which had a low impact with a moderate uncertainty as well as factors which had a very low uncertainty were not analyzed (*i.e.*  $C \leq 20$ ).

According to the criticality score, we picked up 9 parameters (bold red in Table 11) that had to be analyzed : the activation of Auger electrons, the seed of the pseudorandom number generator, the fluence of photons, the energy cutoff, the spatial cutoff, the spatial resolution of the dose images, the computational mode (parallel processing or not), the radius of the medium, the material of the medium. We did not analyze the following parameters, assuming they had an obvious influence on the results (impact score of 20 and uncertainty score of 1) and that they were not intrinsic parameters of the simulator : the number of primary photons, the energy spectrum of the primary photons and the definition of the volumes of interest (VOI). Indeed, more primary photons will result in a higher dose deposition with a reduced error (which is on the order of  $N^{-1/2}$  with  $N$  being the number of primary particles) ; a different energy spectrum would trigger different kind of physical interactions resulting in a higher complexity in the analysis and interpretation of the results ; an inconsistent VOI definition would lead to incomparable results. The number of primary particles was set to  $10^8$  ; we chose a 85 keV mono-energetic source and the VOI definition will be described in the following section. Similarly, we were not able to assess the NP clustering and the NP concentration as the geometry we had chosen contains only 1 GNP.

## 5 Screening of Relevant Factors

### 5.1 Preliminary analysis

As a consequence of the Ishikawa diagram and the criticality score, a screening design of numerical experiments, based on a Plackett-Burman structure shown in Table 12 was used to identify the influent factors among the nine remaining simulation parameters. The underlying

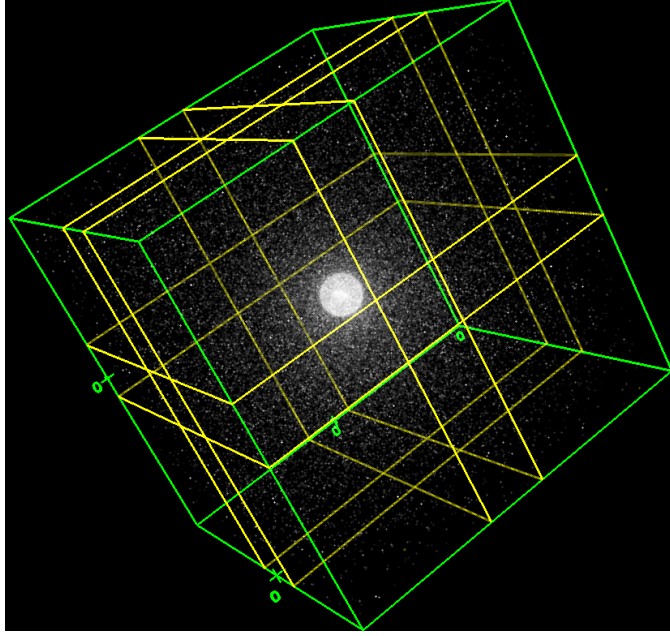


FIGURE 19 – 3D view of a dose image with a visible enhancement in the GNP (white sphere); calculation boundaries are in green ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ) and analysis volumes boundaries in yellow

model used to test the relevance of those factors is defined in (8).

$$Y_k^R = b_0 + b_1 u_{k,1} + b_2 u_{k,2} + \dots + b_8 u_{k,8} + E_k, E_k \equiv \mathcal{N}(0, \sigma^2) \quad (8)$$

With  $k$  being the index of the trial in the experiment design,  $R$  the spatial region of analysis,  $Y_k^R$  the  $k^{\text{th}}$  observation of the response,  $u_{k,i}$  the  $k^{\text{th}}$  value of the  $i^{\text{th}}$  factor,  $b_0$  the mean response at the domain center,  $b_i$  the linear or additive effect of the  $i^{\text{th}}$  factor and  $E_k$  the model response error.

Each parameter was given 2 levels (see Table 12). In GATE, the water medium was defined as "G4\_WATER". To assess the impact of the pseudonumber generator seed, we repeated each experiment 10 times with a different seed (seeds varied from 1 to 10).

We analyzed the 3D dose images (example in Figure 19) and evaluated the influence of the factors in terms of diffusion capability and dose deposited into the GNP.

## 5.2 Response variables

In order to estimate the effects of each simulation factor on the diffusion of secondary species and the enhancement of the deposited dose, we firstly cut the 3D dose image into 3 slices A, B and C (see Figure 20, left) and each slice was decomposed into 9 VOI (see Figure 20, right) in which the mean dose was recorded. Each VOI side was either 160 or 420 nm (see Figure 19)). For example, the dimensions of VOI that contains the GNP (region  $B_5$ ) are 160 nm x 160 nm x 160 nm.

7 different regions of interest have been selected to examine the spatial dependency of the study factors on the radiopotential. In the region  $R$ , the numerical response variable is defined

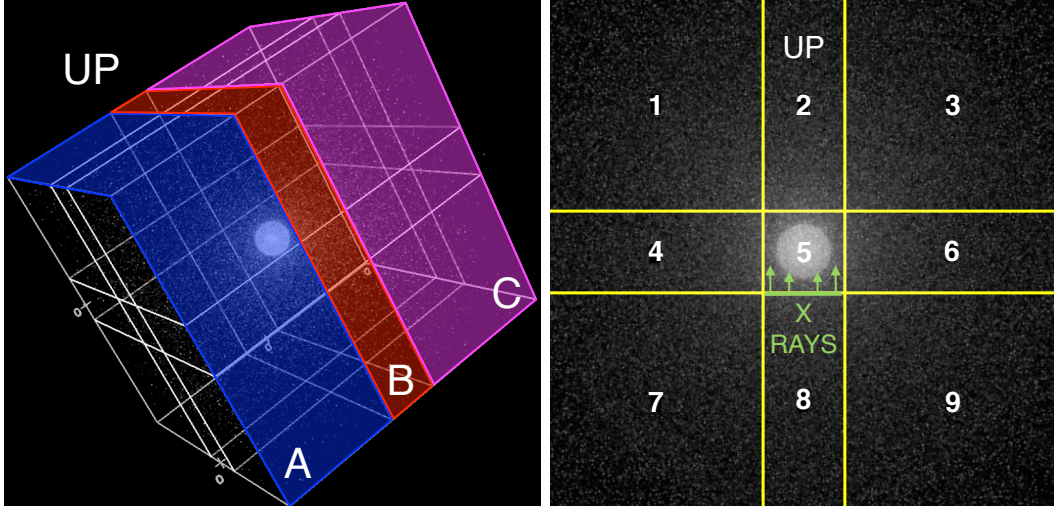


FIGURE 20 – On the left, 3D view of a dose image, the cube is cut into 3 slices A, B and C - on the right, 2D map of the dose enhancement, each slice is divided into 9 VOI (example is slice B).

TABLE 13 – Response Variables

Notation	Signification	Description of the zone
$Y^{B5}$	Relative dose enhancement in $B5$	Dose enhancement inside the GNP
$Y^{B8}$	Relative dose enhancement in $B8$	Backscattering enhancement
$Y^{B2}$	Relative dose enhancement in $B2$	Transmission through the GNP
$Y^{B4}$	Relative dose enhancement in $B4$	Side scattering (symmetric to $B6$ )
$Y^{B6}$	Relative dose enhancement in $B6$	Side scattering (symmetric to $B4$ )
$Y^{A1}$	Relative dose enhancement in $A1$	Distant scattering
$Y^{C9}$	Relative dose enhancement in $C9$	Distant scattering
$Y^T$	Mean computational time	

by the ratio :

$$Y^R = \frac{Z^R(NP)}{Z^R(\overline{NP})} \quad (9)$$

where  $Z^R(NP)$  is the average dose in the region  $R$  when the GNP is excited by X-ray and  $Z^R(\overline{NP})$  is the average dose in the same region with the same number of primary photons but without GNP. In other terms,  $Y^R$  is an estimate of the mean radiosensitization effect of the NP in the region  $R$ , with  $R \in \{B5, B2, B8, B4, B6, A1, C9\}$ . The computational duration has also been considered and all the response variables are shortly described in Table 13.

### 5.3 Method & Results

TABLE 14 – ANOVA Coefficients

(a) VOI B5				(b) VOI B8			
Coef.	Value	$t_{exp}$	Signif. %	Coef.	Value	$t_{exp}$	Signif. %
b0	2.698834	1079	< 0.01 ***	b0	2.548961	157.19	< 0.01 ***
b1	-0.015283	-6.11	< 0.01 ***	b1	0.057410	3.54	0.0531 ***
b2	0.215797	86.30	< 0.01 ***	b2	0.280547	17.30	< 0.01 ***
b3	-0.323250	-129.28	< 0.01 ***	b3	-0.690716	-42.60	< 0.01 ***
b4	0.011414	4.56	< 0.01 ***	b4	-0.000137	-0.01	99.3
b5	0.008558	3.42	0.0798 ***	b5	0.147244	9.08	< 0.01 ***
b6	-0.009656	-3.86	0.0166 ***	b6	0.018150	1.12	26.5
b7	-0.333407	-133.34	< 0.01 ***	b7	0.186402	11.50	< 0.01 ***
b8	-0.006978	-2.79	0.594 **	b8	-0.024133	-1.49	13.9
Surrounding sphere radius				Surrounding sphere radius			
Surrounding sphere medium				Surrounding sphere medium			
Fluence (source radius)				Fluence (source radius)			
Spatial resolution				Spatial resolution			
Energy cutoff				Energy cutoff			
Spatial cutoff				Spatial cutoff			
Auger activated ?				Auger activated ?			
Computer				Computer			

(c) VOI B2				(d) VOI B4			
Coef.	Value	$t_{exp}$	Signif. %	Coef.	Value	$t_{exp}$	Signif. %
b0	0.814788	368.77	< 0.01 ***	b0	1.805997	548.40	< 0.01 ***
b1	-0.003588	-1.62	10.7	b1	-0.005493	-1.67	9.7
b2	0.216354	97.92	< 0.01 ***	b2	0.254682	77.34	< 0.01 ***
b3	-0.305128	-138.10	< 0.01 ***	b3	-0.832114	-252.68	< 0.01 ***
b4	0.010059	4.55	< 0.01 ***	b4	0.011928	3.62	0.0399 ***
b5	0.085917	38.89	< 0.01 ***	b5	0.125685	38.16	< 0.01 ***
b6	-0.001905	-0.86	39.0	b6	0.012831	3.90	0.0146 ***
b7	0.083017	37.57	< 0.01 ***	b7	0.131077	39.80	< 0.01 ***
b8	-0.049859	-22.57	< 0.01 ***	b8	0.014246	4.33	< 0.01 ***
Surrounding sphere radius				Surrounding sphere radius			
Surrounding sphere medium				Surrounding sphere medium			
Fluence (source radius)				Fluence (source radius)			
Spatial resolution				Spatial resolution			
Energy cutoff				Energy cutoff			
Spatial cutoff				Spatial cutoff			
Auger activated ?				Auger activated ?			
Computer				Computer			

(e) VOI B6				(f) VOI A1			
Coef.	Value	$t_{exp}$	Signif. %	Coef.	Value	$t_{exp}$	Signif. %
b0	1.805759	443.32	< 0.01 ***	b0	0.908672	98.34	< 0.01 ***
b1	-0.034556	-8.48	< 0.01 ***	b1	0.002881	0.31	75.6
b2	0.222685	54.67	< 0.01 ***	b2	0.251707	27.24	< 0.01 ***
b3	-0.854692	-209.83	< 0.01 ***	b3	-0.600998	-65.04	< 0.01 ***
b4	0.012905	3.17	0.186 **	b4	0.033230	3.60	0.0437 ***
b5	0.113302	27.82	< 0.01 ***	b5	0.064451	6.98	< 0.01 ***
b6	-0.007995	-1.96	5.2	b6	-0.006374	-0.69	49.1
b7	0.128166	31.47	< 0.01 ***	b7	0.205174	22.21	< 0.01 ***
b8	0.021211	5.21	< 0.01 ***	b8	-0.101931	-11.03	< 0.01 ***
Surrounding sphere radius				Surrounding sphere radius			
Surrounding sphere medium				Surrounding sphere medium			
Fluence (source radius)				Fluence (source radius)			
Spatial resolution				Spatial resolution			
Energy cutoff				Energy cutoff			
Spatial cutoff				Spatial cutoff			
Auger activated ?				Auger activated ?			
Computer				Computer			

(g) VOI A9			
Coef.	Value	$t_{exp}$	Signif. %
b0	1.9148035	143.97	< 0.01 ***
b1	-0.017783169	-1.34	18.3
b2	0.60733191	45.66	< 0.01 ***
b3	-0.63896312	-48.04	< 0.01 ***
b4	-0.069061331	-5.19	< 0.01 ***
b5	0.0026604437	0.20	84.2
b6	-0.085497081	-6.43	< 0.01 ***
b7	0.52263046	39.30	< 0.01 ***
b8	-0.0144558919	-1.09	27.5
Surrounding sphere radius			
Surrounding sphere medium			
Fluence (source radius)			
Spatial resolution			
Energy cutoff			
Spatial cutoff			
Auger activated ?			
Computer			



FIGURE 21 – Pareto diagrams of the estimated model parameters :  $b_i$  for the dose enhancement in the seven studied volumes of interest and for the computational duration ;

The estimation of the effects relies on an ANOVA method implemented in the statistical software NemrodW<sup>®</sup> [122]. The ANOVA coefficients are shown in Table 14. To facilitate their interpretation, effects were then ranked using Pareto charts in Figure 21. Bar diagrams were also used to compare the influence of each factor level, as shown in Figure 22.

First, as expected, the photon fluence comes out to be a significantly influent parameter in all the regions we analyzed. In every regions,  $Y^R$  is lower when the size of the source is equal to 500 nm.

In the central region  $B5$ , according to the Pareto chart (Figure 21, (a)), 3 parameters appear to be significantly influent (from the most influent to the less one) : the Auger effect, the photon

fluence and the physical medium of the region. When the Auger electrons are activated, the ratio  $Y^R$  is greatly lower than when they are not. Similarly, when the GNP is placed in a silicon environment,  $Y^R$  is lower (than in water).

In external regions ( $R \in \{B2, B8, B4, B6, A1, C9\}$ ), the fluence, the physical medium, the Auger electrons or the energy cutoff are the most relevant parameters. Concerning the physical medium, the effect is the same as in  $B5$ . A higher energy cutoff is correlated with a higher  $Y^R$ . Interestingly, we observed that the Auger electrons activation is also linked with a higher dose ratio.

Regarding the simulation time, only one parameter is influent : the choice of the computer (#1 or #2).

## 6 Discussion

The photon fluence parameter was used as a test in order to evaluate the relevance of our analysis and as predicted it came out to be detected as a significant relevant parameter. We can explain that  $Y^R$  was lower when the size of the source was higher because less photons interact with the GNP and that is why less scattered particles could be found in external regions.

The Auger electrons activation has already been mentioned as a burning issue in the literature [14, 15]. We found that it could significantly modify the results of our simulation. Therefore depending on what question was investigated, the authors should take them into account or at least clarify if this mechanism was activated and why. We would like to put the stress on the fact that it can alter the final results of the runs but apparently can generate under- or overdose whether we look inside or outside the GNP region.

The cutoff energy undeniable effect is linked with the fact that secondary particles (scattered by the GNP) path should be shorter when the threshold is higher. Therefore increasing the dose deposited in regions which are near  $B5$ .

The variations in  $Y^R$  related to the physical medium are due to the fact that  $Z^R(\overline{NP})$  is higher in more dense materials.

The simulation time was significantly lower for the computer #2 as it was in a parallel calculation mode (#1 was set in a serial calculation mode) which did not modify the values of  $Y^R$ .

## 7 Conclusion

Since the 2000s, the multiplication of computational environments devoted to the simulation of NP-X-rays interactions has opened new perspectives in computer-aided-design of nanostructured materials for biomedical applications. Nevertheless, several published studies have clearly shown unexplained variability between inter-laboratory results and have therefore emphasized a crucial need of standardization of these numerical simulations. Considering this fact, a robustness multivariate analysis was performed in this paper. A GNP of 100 nm diameter was selected as a standard nano-system activated by a X-ray source placed just below the NP. Two response variables were examined : the dose enhancement in seven different spatial regions of interest around the NP and the duration of the experiments. Not less than 16 factors may impact the simulation results and 9 of them were pre-identified as potentially critical. A Plackett-Burman design of numerical experiments was applied to estimate and test the effects of each simulation factors on the examined responses. Four factors : the working volume, the spatial resolution, the spatial cutoff and the computational mode (parallelization) do not significantly affect the

results and none except the last one may reduce the computational duration. The energy cutoff may cause significant variations of the dose enhancement in some specific regions of interest : the higher the cutoff, the closer the secondary particles will stop from the GNP. By contrast, the Auger effect as well as the choice of the physical medium and the fluence level (which is obvious) clearly appear as critical simulation parameters. Consequently, these four factors may be compulsory examined before comparing and interpreting any simulation results coming from different simulation sessions.





FIGURE 22 – Bar diagrams of the estimated model coef. :  $b_i$  for the dose enhancement in the seven studied volumes of interest and for the computational time

## Quatrième partie

# Analyse de prédiction *in silico* / *in vitro*



## 1 Contexte

Suite à l'analyse de robustesse de notre simulateur GATE qui nous a permis de déterminer les paramètres du logiciel ayant une influence sur les résultats (pouvoir radiosensibilisant d'une NP), nous nous sommes interrogés sur la capacité de notre simulateur à prédire le dépôt de dose au niveau macroscopique suite à l'irradiation d'un volume contenant des NPs.

Durant notre étude bibliographique nous n'avons pu étudier qu'un seul article traitant de la mesure de la dose absorbée macroscopiquement dans un volume de matériaux équivalent à de l'eau. Cet article tiré d'une conférence, proposé par Alqathami *et al.* [77] en 2013 présente le développement d'un dosimètre radiochromique capable d'évaluer la dose dans les 3 dimensions de l'espace. L'auteur utilise ce dosimètre afin d'évaluer la dose absorbée autour de NPs d'oxyde de bismuth  $\text{Bi}_2\text{O}$  irradiées par une source basse énergie de 100 kV. Le centre du détecteur étant dopé avec 0,5 mM de  $\text{Bi}_2\text{O}$ -NP d'un diamètre de 50 nm. Cet article se termine sur la conclusion suivante : « *We believe further Monte Carlo, in vitro, and in vivo investigations involving bismuth-based nanoparticles are warranted to validate and fully understand dose enhancement achieved by Bismuth-based nanomaterials.* ».

Jusqu'à présent aucune étude ne compare des calculs Monte-Carlo et des mesures expérimentales de la dose absorbée autour de NPs au niveau macroscopique.

## 2 Problème posé, objectifs et originalité

### 2.1 Exactitude du simulateur

Dans cette partie, nous avons souhaité évaluer la capacité de notre simulateur à prédire avec justesse une augmentation de dose dans le cas où des NPs seules seraient placées dans l'eau et irradiées avec un faisceau de photons de 6 MV produit par un accélérateur linéaire de particules médical. Quelle serait alors la corrélation entre le dépôt de dose prédit grâce à notre simulateur et une mesure réalisée avec du matériel couramment utilisé en radiophysique (film radiochromique, diode, chambre d'ionisation, etc) ?

La corrélation entre des simulations Monte-Carlo et la dose générée par un faisceau de photons dans l'eau a été établie à de maintes reprises [132]. Pourquoi une telle corrélation n'a pas été testée en ce qui concerne la radiothérapie augmentée par les NPs ? La concentration de NPs nécessaire pour réaliser un dépôt de dose détectable est-elle trop élevée ? Les limites des simulateurs en termes de précision, temps de calcul et de modélisation sont-elles atteintes ?

### 2.2 Objectifs

Suite à l'analyse de robustesse réalisée dans la partie précédente, notre objectif principal a été d'évaluer les limites de notre simulateur dans la réalisation de prédictions *in silico* / *in vitro*. Ensuite, nous réaliserons la mesure de l'augmentation de la dose en présence de NPs en utilisant de la dosimétrie par film radiochromique de façon équivalente à ce qui a été proposé par Alqathami *et al.* [77].

### 2.3 Originalité

De nombreuses comparaisons entre résultats prédits par simulation Monte-Carlo au niveau microscopique ou nanométrique et mort cellulaire ont été publiées [1, 14, 133]. Par exemple, Delorme qui dans sa thèse observe qu'un indice d'efficacité biologique noté  $\text{SER}_{4\text{Gy}}$  (Senzitizer Enhancement Ratio) suit la même tendance que le Dose Enhancement Factor (DEF) calculé

par simulation Monte-Carlo pour différentes énergies en présence de Magnevist®. Le  $SER_{4Gy}$  correspond à un taux de radiosensibilité des cellules mesuré via des tests de clonogénicité ; si la survie mesurée lors du traitement de contrôle sans gadolinium est notée  $S_{contrle}$  et la survie en présence de gadolinium est notée  $S_{Gd}$  alors le  $SER_{4Gy} = S_{contrle}/S_{Gd}$ . Le DEF quant à lui correspond au rapport des doses absorbées en présence ou non de gadolinium, dans un cube de 1 cm de côté.

A noter qu'il s'agit toujours de méthodes permettant une évaluation indirecte de l'augmentation de la dose due à la présence de NPs.

L'originalité de cette partie réside dans la définition du cahier des charges suivant :

1. nous placer au niveau macroscopique (de l'ordre du mm) ;
2. évaluer la capacité de notre simulateur à donner un résultat de dépôt de dose en présence de NP fidèle à la réalité ;
3. mesurer directement le dépôt de dose en présence de NP avec des techniques maîtrisées en radiophysique.

## 3 Matériel, méthode et outils

### 3.1 Matériel

#### Nanoparticules

Afin de réaliser nos tests, nous avons sélectionné des NPs d'or d'un diamètre de 20 nm avec une surface en PVP (Poly(N-vinylpyrrolidone)) biocompatible. Ces NPs sont synthétisées par la société nanoComposix<sup>TM</sup> Inc. (San Diego, CA, USA) dans une formule NanoXact diluées dans de l'eau à une concentration de 0,05 mg/mL.

#### Simulateur

Nous avons utilisé la version 7.0 de GATE avec Geant4 9.6.p03 et la librairie CLHEP 2.1.3.1. Le générateur de nombres pseudo-aléatoires choisi est le Mersenne Twister. Nous avons sélectionné la configuration Livermore pour les effets physiques et avons activé la diffusion Rayleigh, l'effet photoélectrique, la diffusion Compton, les ionisations et le rayonnement de freinage. Pour la diffusion multiple des électrons, nous avons choisi le modèle Urban95. Les informations sur notre "physics list" sont résumées dans le Tableau 15. Les électrons Auger ont été désactivés afin de diminuer le temps de calcul et nous pensons que leur influence n'est pas significative au niveau macroscopique (libre parcours moyen trop faible), auquel nous nous intéressons. Le niveau de coupure spatial a été fixé à 0,1 nm et en énergie à 1 eV. Le niveau de création d'espèces secondaires est quant à lui codé directement dans GATE et fixé à 250 eV.

Le résultat que nous avons enregistré est une matrice de dose 3D de 30 cm  $\times$  20 cm  $\times$  30 cm avec 300 pixel  $\times$  400 pixel  $\times$  300 pixel soit un pixel de 0,1 cm dans le sens de la largeur et de la longueur et de 0,05 cm dans la hauteur.

Une source plane carrée de côté 20 cm non divergente a été placée de façon à ce que la distance source-peau (DSP) soit de 100 cm. Les valeurs d'énergie de la source sont issues du faisceau 6 MV Varian proposé par Ding en 2002 [134].

Nous avons choisi de découper notre simulation en 45 runs indépendants (avec une graine différente) simulant chacun  $10^7$  particules.

TABLE 15 – Paramètres de la liste de physique pour la prédiction *in vitro*

Processus	Modèle	Seuil de coupure
Diffusion Rayleigh	Livermore	Réglage par défaut
Effet photoélectrique	Livermore	0.1 nm
Diffusion Compton	Livermore	0.1 nm
Création de paire	Livermore	Réglage par défaut
Ionisation - e-	Livermore	0.1 nm
Ionisation - e+	Penelope	0.1 nm
Bremsstrahlung e-	Livermore	Réglage par défaut
Bremsstrahlung e+	Livermore	Réglage par défaut
Diffusion multiple e-	Urban95	Réglage par défaut
Diffusion multiple e+	Urban95	Réglage par défaut

### Géométrie

Suite aux recommandations faites dans notre publication parue dans la revue *Theranostics* [6], nous avons souhaité nous placer dans les conditions présentées dans la Figure 4. Pour ce faire nous avons modélisé une boîte de culture cellulaire d’une dimension totale  $12,74 \text{ cm} \times 0,88 \text{ cm} \times 8,5 \text{ cm}$  contenant 6 puits ayant chacun un diamètre de 3,8 cm et une hauteur de 0,25 cm. Cette boîte est positionnée entre deux jeux de plaques RW3 (PTW, Freiburg, Germany) équivalentes à de l’eau de dimensions  $30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$  et  $30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ . Cette géométrie a été saisie dans GATE et plusieurs visualisation sous différents angles sont disponibles en Figure 23.

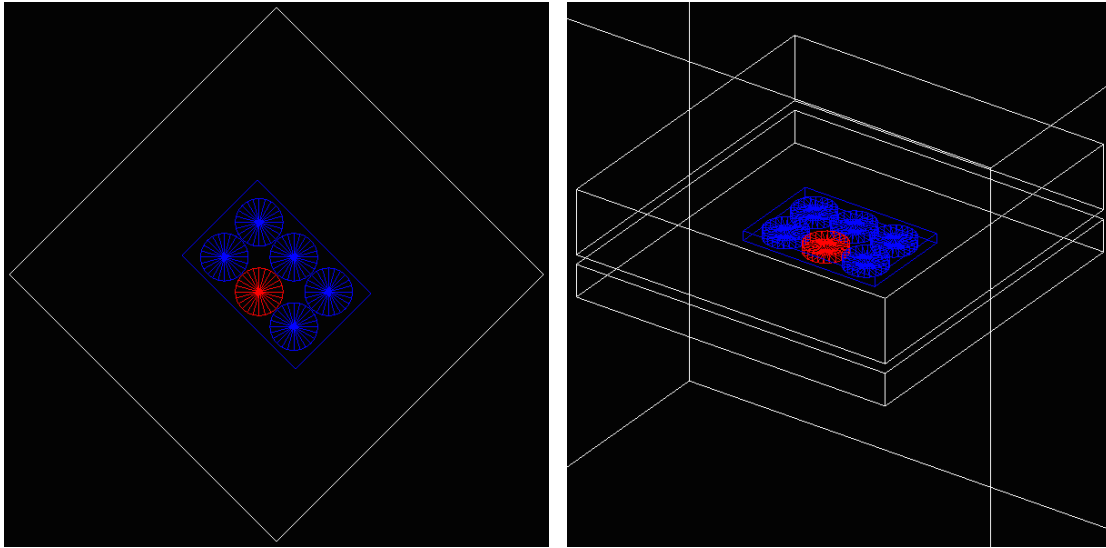
Un seul des 6 puits contenant des NPs (en rouge sur la Figure 23).

### Nombre et répartition aléatoire des NPs

La concentration maximale que nous pouvons utiliser en pratique est de 0,05 mg/mL ou 0,05 mg/cm<sup>3</sup>. Si l’on assimile chaque NP à une sphère, le volume d’une NP de 20 nm de diamètre est de 4188,8 nm<sup>3</sup> ce qui représente une masse de  $8,08 \cdot 10^{-14}$  mg d’or. Le volume d’un puits de diamètre 3,8 cm et de hauteur 0,25 cm est de 2,83 cm<sup>3</sup>. Donc, à la concentration de 0,05 mg/cm<sup>3</sup>, un puit contient 0,14 mg d’or soient  $1,75 \cdot 10^{12}$  NPs.

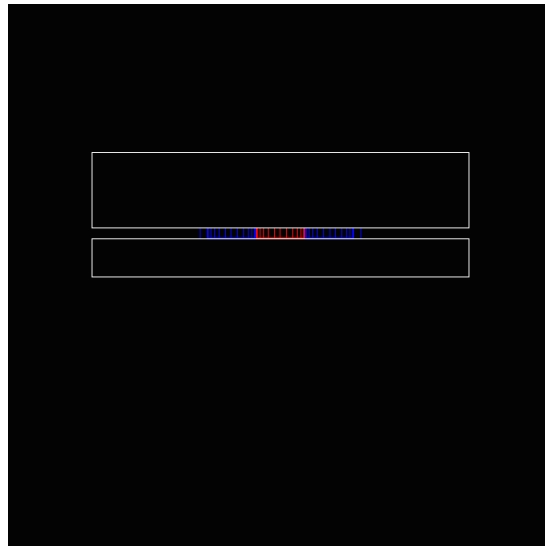
**Répartition aléatoire des NPs :** Ne sachant pas comment ces NPs se comportent en milieu aqueux, nous avons fait l’approximation qu’elles se répartissent de façon aléatoire dans l’espace. Pour cela, nous avons développé un programme en langage Java permettant la génération d’un empilement hexagonal compact puis d’une sélection, dans cet espace, de sphères qui appartiennent à un volume quelconque défini par une équation paramétrique. On peut ensuite choisir parmi ces sphères celles que l’on souhaite garder dans notre cluster de sphères. Pour cela, nous avons procédé en trois grandes étapes :

- génération d’un empilement hexagonal compact tridimensionnel ;
- sélection des bons éléments réalisés par union avec un volume donné ;
- suppression aléatoire de sphères jusqu’à obtenir le nombre désiré.



(a) Vue du dessus

(b) Vue 3D



(c) Vue de face

FIGURE 23 – Vue du dessus, 3D et de face de la géométrie modélisée dans GATE

**Empilement hexagonal compact suivant les trois directions de l'espace :** Pour générer cet empilement, nous commençons par placer une sphère de rayon  $r$  aux coordonnées  $(0,0,0)$ . Puis successivement, nous plaçons une sphère à droite et une à gauche de notre première sphère à une distance de  $2 \times r$  afin de parcourir les  $x$  positifs et les  $x$  négatifs (Figure 24).

Nous pouvons maintenant générer un "plan" de sphères suivant l'axe  $Y$  en empilant plusieurs rangées de sphères. Comme précédemment, nous générons une rangée pour les  $y$  positifs puis pour les  $y$  négatifs (Figure 25).

Nous pouvons maintenant créer notre empilement hexagonal compact tridimensionnel. Les sphères suivant l'axe  $Z$  se logent dans les interstices disponibles comme le montre la Figure 26 où ces dernières sont colorées en rouge. Les coordonnées indiquées sur la Figure 26 sont celles

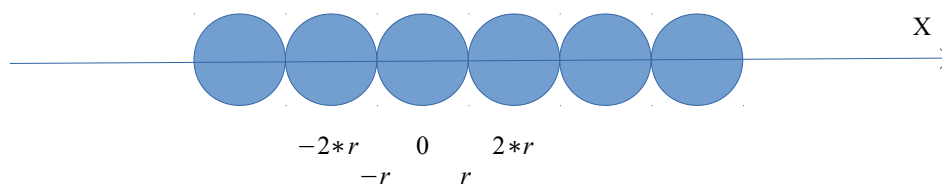


FIGURE 24 – Placement de sphères selon 1 dimension.

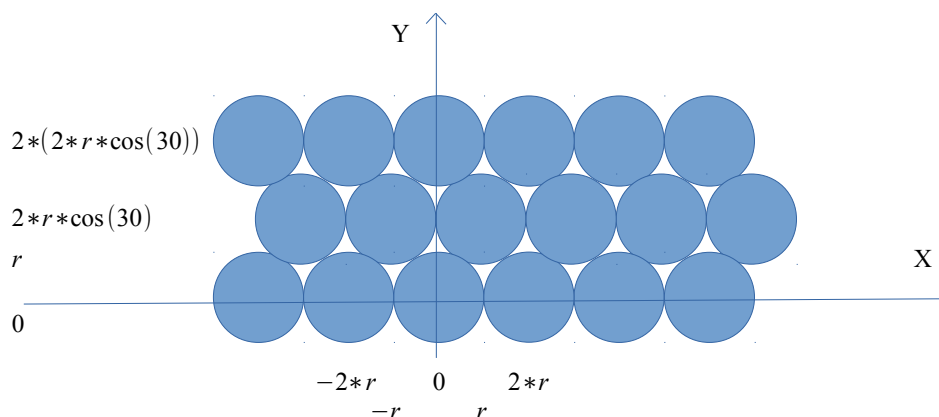


FIGURE 25 – Placement de sphères selon 2 dimensions.

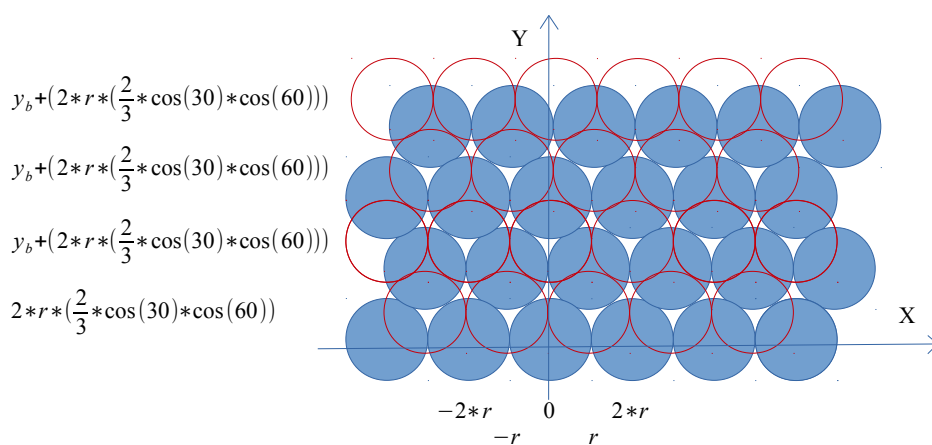


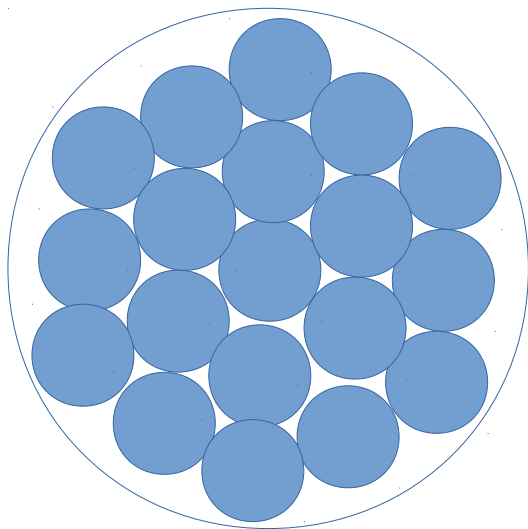
FIGURE 26 – Placement de sphères selon 2 dimensions.

des sphères de la couche Z supérieure pour lesquelles, chaque centre est le sommet d'un triangle équilatéral. D'où, pour obtenir la coordonnée d'un centre selon l'axe Z, il suffit de projeter le triangle équilatéral avec un angle de  $60^\circ$ .  $y_b$  représente la coordonnée suivant Y pour chaque sphère bleue.

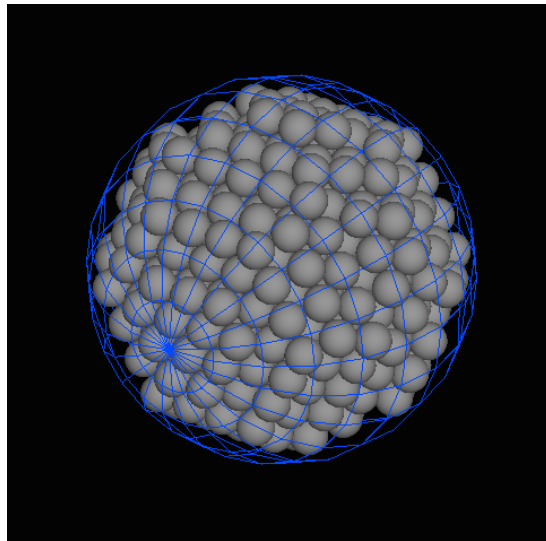
Les sphères formant des tétraèdres, les coordonnées suivant l'axe Z sont simplement des multiples de la hauteur qui est  $2 \cdot r \cdot \sqrt{6}$  où  $2 \cdot r$  représente la longueur d'une arête.

**Redimensionnement du cluster par un volume quelconque :** Une fois un cluster hexagonal de la taille souhaitée modélisé, nous le redimensionnons afin de supprimer toutes les sphères

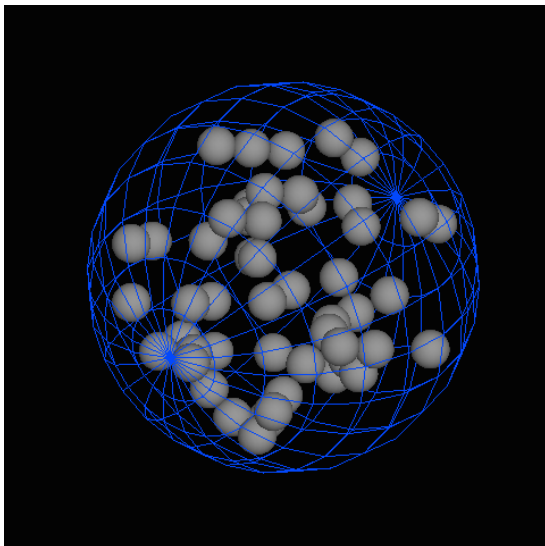




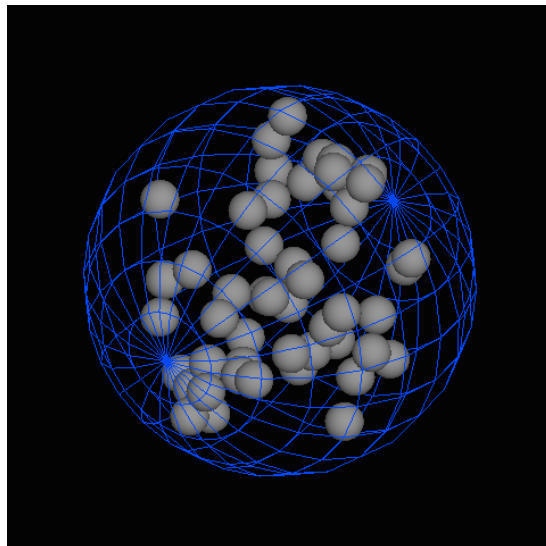
(a) 2D conceptuel



(b) 3D dans GATE



(c) 3D dans GATE, aléatoire 50 sphères #1



(d) 3D dans GATE, aléatoire 50 sphères #2

FIGURE 27 – En (a), une vue 2D conceptuel où seules les sphères bleues contenues dans un volume sphérique ont été conservées; en (b), une vue 3D de l'utilisation de notre algorithme dans le cas d'une sphère globale de rayon 100 nm (en bleu) contenant de plus petites sphères de rayon 10 nm (en gris), le premier empilement hexagonal contenait 2002 sphères et après réduction, nous n'avons conservé que 527 sphères à l'intérieur du volume bleu; en (c) et (d), 2 répartitions aléatoires des sphères grises où seuls 50 objets ont été conservés.

qui seraient en dehors du volume souhaité. Ce volume est défini par une équation paramétrique. Ceci permettant de créer simplement toute une variété de structures (rectangles, sphères, cylindre, losange, etc). Un exemple de répartition sous forme de sphère est visible en 2D dans la Figure 27 (a) et (b).

**Suppression aléatoire de sphères appartenant au cluster :** Pour obtenir le nombre désiré de sphères réparties de façon aléatoire, nous supprimons au hasard des sphères dans le cluster initial jusqu'à ce qu'il ne reste que le bon nombre d'objets. Un exemple est visible en Figure 27 (c) et (d) où 2 répartitions aléatoires de 50 sphères de rayon 10 nm dans une sphère globale de rayon 100 nm sont présentées.

**Répartition des NPs dans un puits :** Pour revenir à notre cas pratique, nous souhaitons répartir  $1,75 \cdot 10^{12}$  NPs dans un puits de diamètre 3,8 cm et de hauteur 0,25 cm. Le temps de calcul de notre algorithme de répartition aléatoire étant trop long pour générer autant d'objets dans un puits, nous avons segmenté la répartition en 3 étapes :

- nous répétons la NP de diamètre 20 nm 10000 fois dans une sphère de diamètre 1  $\mu\text{m}$  appelée *cluster\_micrometre* ;
- nous répétons le *cluster\_micrometre* 70000 fois dans une sphère de diamètre 1 mm appelée *cluster\_millimetre* ;
- nous répétons le *cluster\_millimetre* 2500 fois dans un cylindre de diamètre 3,8 cm et de hauteur 0,25 cm.

Chaque volume étant imbriqué dans l'autre, nous aurons généré au total  $1,75 \cdot 10^{12}$  NPs dans le volume cylindrique représentant le puits. Il faudra, à chaque fois que la simulation est lancée, plus de 3 jours de calculs à GATE ne serait-ce que pour créer cette géométrie.

### 3.2 Méthode d'évaluation des résultats

Nous avons décidé dans un premier temps de réaliser l'ensemble des étapes de simulation et que si les résultats n'étaient pas concluants (aucune augmentation de dose constatée), nous ne réaliserions pas les irradiations. Pour déterminer cela nous avons décidé de mesurer la dose moyenne absorbée dans chaque puits sur l'image 3D créée par GATE. Dans le plan frontal, pour chaque puits nous avons créé une région d'intérêt (ROI) dans laquelle la valeur moyenne de dose a été relevée et avons réalisé une mesure dans chacune des 5 coupes frontales où le puits était visible (épaisseur de coupe 0,05 cm dans le plan frontal). Nous avons ensuite évalué la normalité des données à l'aide d'un test d'Anderson-Darling (hypothèse nulle : les distributions suivent une loi normale de moyenne et écart-type égal à celui de l'échantillon, risque  $\alpha$  de 5%) puis avons réalisé une analyse de la variance à un facteur afin de comparer les moyennes des échantillons et de déterminer si la dose moyenne mesurée dans le puits contenant les NPs est statistiquement différente (risque  $\alpha$  de 5%).

Chaque ROI porte un numéro qui correspond à sa position dans le plan frontal (Figure 28 (d)) :

1. ROI Sud-Ouest (SO) ;
2. ROI Sud (S) contenant les NPs ;
3. ROI Sud-Est (SE) ;
4. ROI Nord-Est (NE) ;
5. ROI Nord (N) ;
6. ROI Nord-Ouest (NO).

Etant donné que la source est un carré de côté 20 cm émettant des photons de manière uniforme, le faisceau ne diverge pas en s'éloignant de la source. Par conséquent, la dose absorbée dans chaque ROI est théoriquement identique.

## 4 Résultats

Un exemple de répartition de dose normalisée à 100% au maximum du rendement en profondeur est présentée en Figure 28. Les doses mesurées dans les ROIs ont été représentées sous formes d'histogrammes et de nuages de points dans la Figure 29. Les points incohérents ont été colorés en rouge dans les nuages de point.

Les résultats visuels et numériques des tests de normalité sont disponibles en Figure 30. Etant donné les valeurs de p pour les régions sud et nord-est (0,016), il y aurait une assez forte présomption contre l'hypothèse nulle ce qui signifierait que la population liée à ces échantillons ne suivrait pas une loi normale. Néanmoins puisque les 4 autres régions présentent des résultats de normalité très acceptable, nous pensons qu'il en est de même pour les régions sud et nord-est (qui ne contiennent pas de NPs). Si seule la région sud avait présenté de tels résultats, nous aurions pu penser que ceci était dû à la présence de NPs. Cette faible valeur de p est probablement liée à la taille des échantillons.

Les tests de normalité étant concluant pour l'ensemble des puits, nous avons réalisé le calcul de l'analyse de la variance à un facteur dont les résultats sont visibles à la Figure 31. Nous avons choisi de montrer les doses moyennes dans les puits ainsi que les intervalles de confiance à 95% associés. Tous les intervalles étant croisés, aucun des puits ne présente une différence de dose significative par rapport aux autres.

Ainsi le puits sud qui contient les NPs ne présente pas de différence de dose significative avec les autres puits. Au moins 2 hypothèses peuvent alors être formulées :

1. il n'y a effectivement pas de différence significative mesurable macroscopiquement entre un puits contenant 0,14 mg de NPs d'or et un puits n'en contenant pas ;
2. la sensibilité du simulateur est trop faible pour générer une distribution de dose mettant en avant une différence entre un puits contenant les NPs.

La première hypothèse nous semble être la plus probable et pour la confirmer, nous nous proposons de réaliser un calcul simple. La masse d'un puits rempli d'eau est de 2,83 grammes. La masse d'un puits contenant des NPs est donc de 2,83014 grammes (en admettant que l'on ait ajouté les NPs sans retirer leur volume en eau, chose qui est faite durant les simulations). La différence de dose associée à ce changement de densité est effectivement trop faible pour être détectée au niveau macroscopique ; c'est un calcul que nous avons réalisé avant les simulations mais il nous a paru intéressant de vérifier cette prévision.

Etant donné ces deux résultats, nous avons décidé de ne pas réaliser les irradiations afin de ne pas utiliser un lot complet de NPs. Suite à ces conclusions, nous avons tenté d'augmenter artificiellement le nombre de NPs à simuler jusqu'à trouver un seuil au delà duquel, une différence significative aurait été mesurée. Néanmoins après avoir doublé la concentration en NPs sans obtenir de résultat probant, nous avons atteint les limites du simulateur en termes de nombres de volumes supportés. Il nous a donc été impossible de continuer l'expérience jusqu'à obtenir ledit seuil de détectabilité.

## 5 Conclusions et perspectives

Dans cette quatrième partie notre objectif était d'évaluer la capacité de prédiction *in silico* / *in vitro* au niveau macroscopique de notre simulateur. Pour ce faire, nous avons choisi de simuler l'irradiation d'une plaque 6 puits (dont un des puits contient des NPs) utilisée de façon courante en biologie par un faisceau de photons de 6 MV. Disposant de NPs d'or de diamètre 20 nm à 0,05 mg/mL au sein du laboratoire, nous avons choisi de répartir de façon aléatoire  $1,75 \cdot 10^{12}$  NPs au

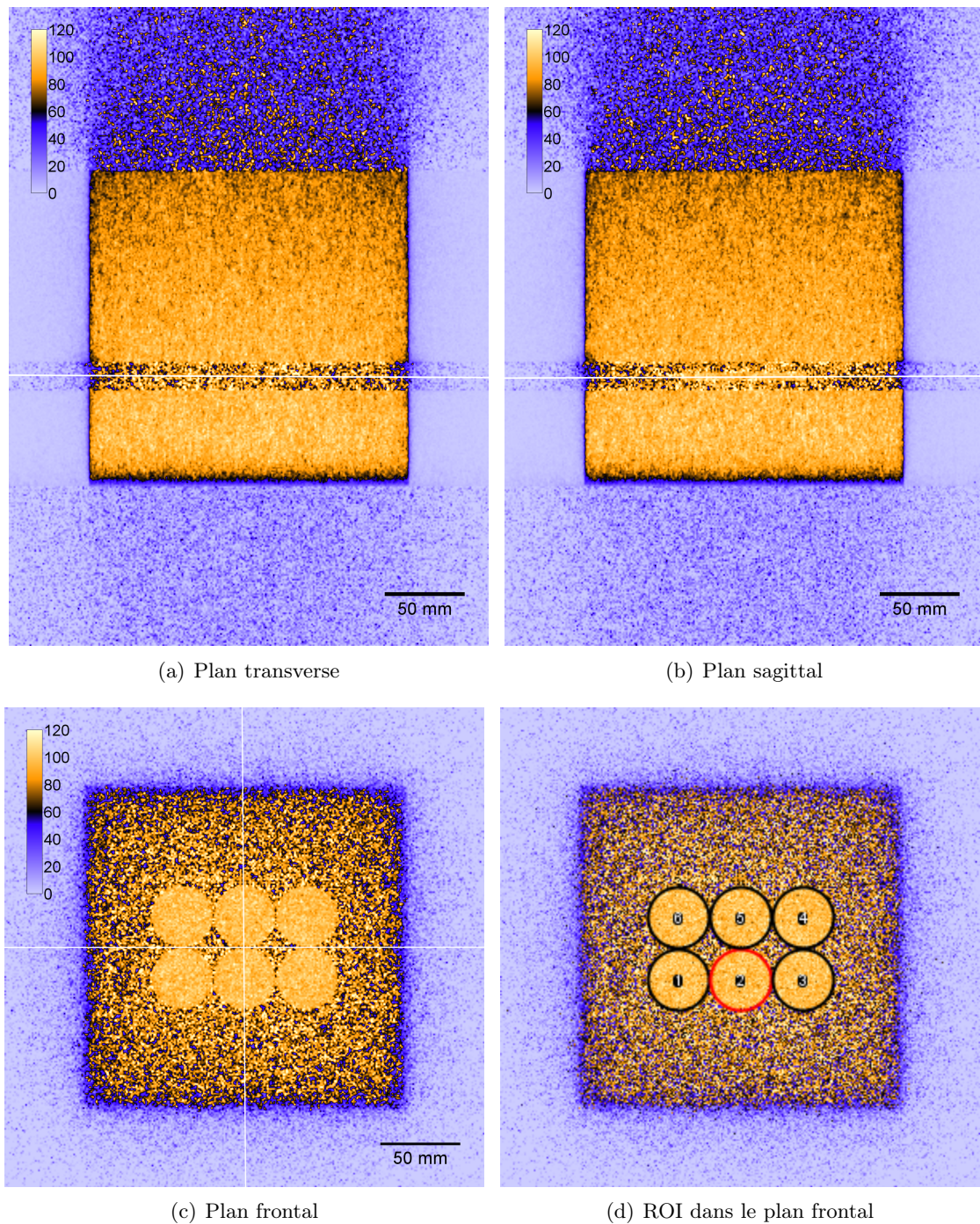


FIGURE 28 – Exemple de la répartition de dose dans notre système de 6 puits entourés de plaques RW3 dans les 3 plans transverse (a), sagittal (b) et frontal (c). La répartition de la dose a été normalisée à 100% au maximum du rendement en profondeur tracé le long de l'axe du faisceau. En (d), une vue des ROIs tracées dans le plan frontal avec en rouge la ROI du puits contenant les NPs.

sein d'un des puits. Pour ce faire, nous avons développé un algorithme permettant de répartir au



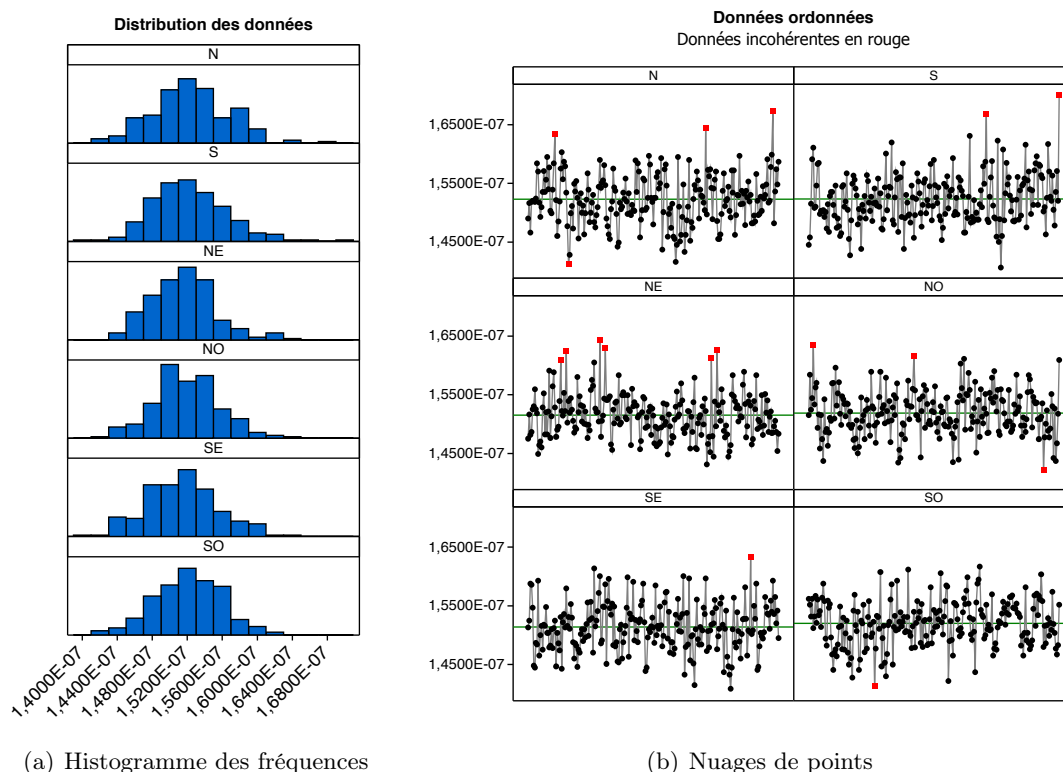


FIGURE 29 – Représentations visuelle des mesures de doses moyennes en [Gy] dans les ROI présentées en Figure 28 (d) sur les 5 coupes du plan frontal contenant les puits pour les 45 runs. Les points incohérents de (b) sont représentés en rouge.

hasard des NPs dans n'importe quel volume défini par une équation paramétrique. Nous avons configuré notre simulateur pour créer, de façon indépendante, chacune des NPs contenues dans le puits; le temps nécessaire pour créer cette géométrie, à chaque run était de 3 jours. Nous avons lancé 45 simulations ayant chacune une graine de l'algorithme de génération de nombres pseudo-aléatoire différente et avons mesuré la dose moyenne absorbée dans chacun des 6 puits de la plaque. Après avoir vérifié la normalité des données que nous avons mesuré sur l'image 3D de répartition de dose avec ImageJ, nous avons réalisé une analyse de variance à un facteur afin de comparer statistiquement les doses moyennes dans chaque puits avec un risque  $\alpha$  de 5%. L'analyse de variance n'a pas mis en évidence de différence significative entre la dose moyenne absorbée dans le puits contenant les NPs et les autres volumes ce qui nous a permis de prendre la décision de ne pas réaliser les irradiations des NPs.

Ainsi, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence le fait que notre simulateur soit capable de réaliser une prédiction *in silico* / *in vitro* fiable. Nous pensons que cette déconvenue est due à la concentration de nos échantillons de NPs qui était trop faible. Ayant souhaité poursuivre l'expérience en augmentant le nombre de NPs, nous avons rapidement atteint les limites du simulateur lorsque le nombre de particules simulées était doublé. Nous sommes néanmoins satisfaits de ces essais puisque notre algorithme de répartition aléatoire des NPs nous a permis d'élaborer notre processus de prédiction *in silico* / *in cellulo* qui fait l'objet de la partie suivante.

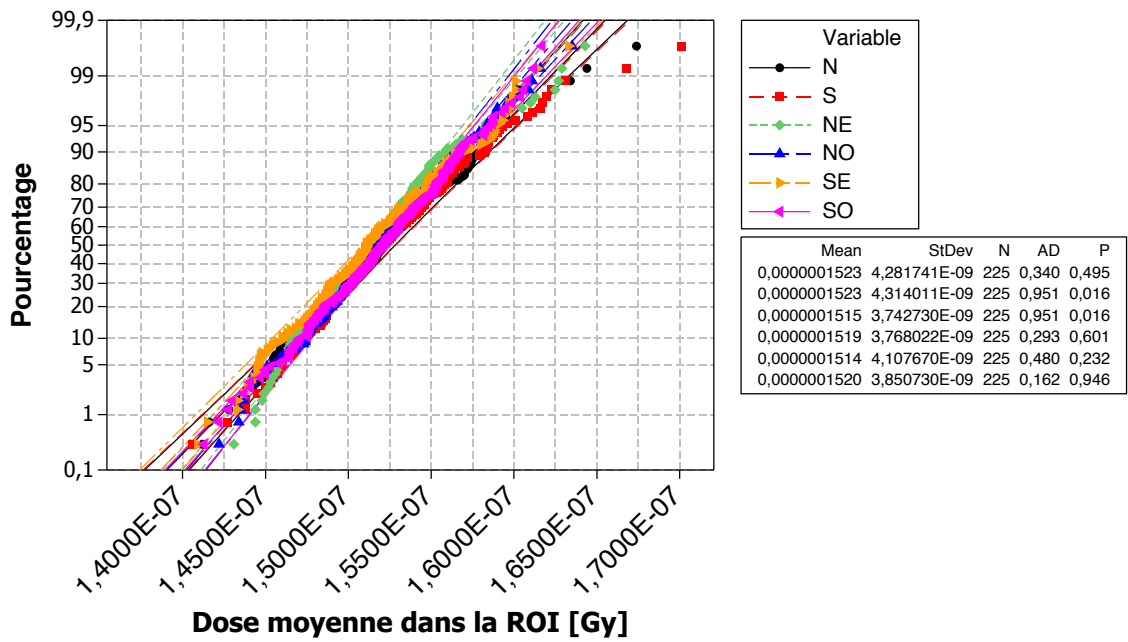


FIGURE 30 – Résultats du test de normalité d’Anderson-Darling.

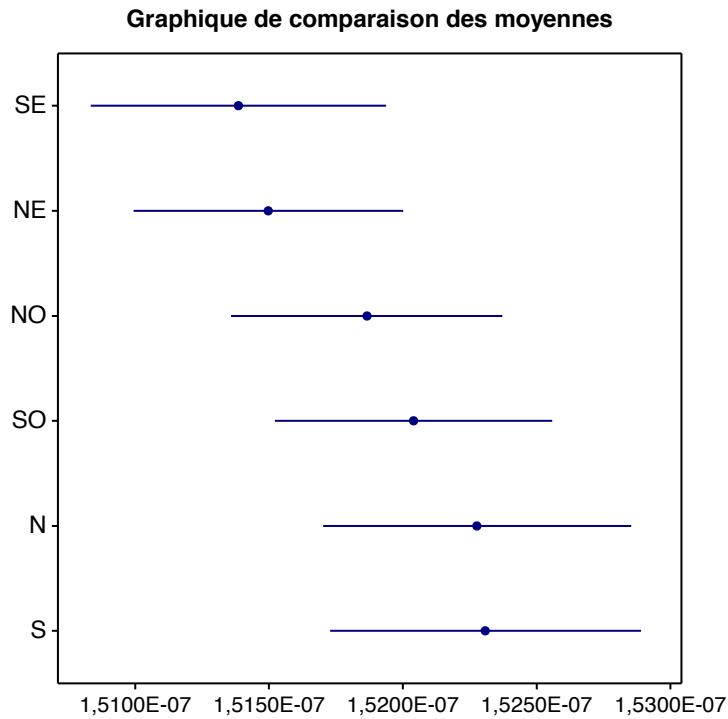


FIGURE 31 – Résultats de l’analyse de variance à un facteur. L’abscisse correspond aux doses moyennes dans les ROI des puits en Gy. Les barres horizontales indiquent l’intervalle de confiance à 95% pour chaque jeu de données.



## Cinquième partie

# Analyse de prédiction *in silico* / *in cellulo*





# 1 Préambule

## 1.1 Contexte, problème posé et positionnement

Lors de notre étude de la bibliographie sur la radiothérapie augmentée par les NPs, nous avons constaté que de nombreuses études Monte-Carlo avaient pour objectif de réaliser une prédiction de l'effet radiosensibilisant d'une NP en se basant uniquement sur les résultats de dose et éventuellement de création d'espèces chimiques. Par exemple, Lechtman *et al.* ont utilisé un modèle nommé ARP [133] où la cellule est divisée en 3 compartiments (cytoplasme, noyau et région extra-cellulaire) ; la dose absorbée dans la région "noyau" très sensible aux rayonnements est utilisée pour réaliser une estimation de la survie en couplant les résultats au modèle linéaire-quadratique qui n'a pourtant jamais été validé pour la radiothérapie augmentée par les NPs. McMahan *et al.* ont quant à eux choisi d'appliquer le LEM (Local Effect Model) [88] utilisé pour la hadronthérapie ; en effet, en faisant l'hypothèse que les nanoparticules forment des clusters et que la dose est donc augmentée très fortement localement (déposée de façon hétérogène dans la cellule), on se retrouve dans une configuration de dépôt de dose proche de ce qui est connu pour les irradiations par les hadrons.

Néanmoins, même si les méthodes proposées permettent de prédire des courbes de survie proches des mesures expérimentales, aucune n'a vraiment mis en évidence de résultat probants et sont toutes limitées à un type de cellule avec un type de NP. De plus, d'après Butterworth *et al.*, les effets biologiques ne peuvent pas être prédits de façon précise en ne se basant que sur la concentration (en NPs d'or) et l'énergie du faisceau de rayons X [135] ; il suggère que les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle majeur dans le mécanisme de radiosensibilisation. Ainsi, d'autres projets prévoient d'intégrer l'aspect indirect de la mort radio-induite en utilisant le module DNA de Geant4.

Dans tous les cas, McMahan a mis en évidence le fait que les prédictions théoriques, dans leur globalité, devraient être plus proches des aspects biologiques et cliniques [136].

Le problème que nous nous sommes posé est le suivant : comment appliquer ces recommandations à notre simulateur Monte-Carlo ? Notre positionnement a été de tenir effectivement compte des aspects biologiques de la mise en contact de NPs avec des cellules vivantes tout en nous posant des questions plus simples - au lieu de chercher à prédire la survie de cellules mises en contact avec des NPs, nous avons cherché à établir un classement des NPs. Ce classement permettant alors de sélectionner la ou les NPs les plus prometteuses avec une économie de temps et d'argent dans le processus de conception préclinique des NPs en question. Il s'agit de criblage virtuel, une technique déjà utilisée dans l'industrie pharmaceutique : l'expérimentation *in silico* couplée à des plans d'expériences (technologie Nano-iD, enveloppe Soleau) permettant de comparer très rapidement un grand nombre de NPs.

## 1.2 Objectifs et originalité

Comment introduire le facteur biologique dans des simulations Monte-Carlo d'interaction rayonnement-matière ? De notre point de vue, il est nécessaire de prendre en compte la biodistribution et la cartographie des NPs au niveau cellulaire. Cette dernière dépendant, *a priori*, du type de cellule, du type de NPs, du temps de contact et de la concentration extra-cellulaire en NPs son évaluation à l'échelle de la cellule nous permettrait de nous affranchir (de prendre en compte de façon intrinsèque) de certains autres facteurs tels que la méthode d'injection des NPs (intratumorale, intraveineuse, intracérébroventriculaire, ... par exemple si l'évaluation est réalisée *in vivo*). La biodistribution des NPs dans les cellules est, dans notre cas, divisée en 2 parties ; pour une cellule, il est important d'étudier : (*i*) la distribution spatiale des NPs, leur

agglomération sous forme de cluster (ou non), la taille des clusters, la localisation des NPs de façon proche ou non de certaines structures subcellulaires d'intérêt et (ii) la quantité totale de NPs contenues dans la cellule (masse en grammes par exemple). Il est également souhaitable que l'évaluation de ces 2 composantes de la biodistribution soit rapide et peu onéreuse afin de conserver l'intérêt des simulations *in silico*. Une fois la biodistribution des NPs dans les cellules évaluée, cette dernière doit être scrupuleusement respectée lors de la modélisation des NPs dans le simulateur (nombre et taille des clusters ainsi que quantité de NPs dans une cellule). Ceci n'a, d'après notre étude de la littérature sur le sujet, jamais été entrepris en l'état.

Des modèles avancés tels que le celui de Lechtman *et al.* tentent de tenir compte de la position des NPs en réalisant des compartiments plus ou moins radiosensibles (exemple le noyau qui contient l'ADN). Parmi toutes les NPs que nous avons pu étudier dans la littérature, celles qui ont été identifiées dans ou à proximité du noyau sont extrêmement rares. En effet, la plupart des NPs forment des clusters dans des vésicules qui sont elles-mêmes situées dans le cytoplasme comme cela a été montré de façon très claire pour la NP à base de gadolinium utilisée par Rima *et al.* [48]. Nous avons ainsi toutes les raisons de penser que l'augmentation de la radiosensibilité des cellules contenant des NPs n'est pas entièrement liée à des dommages directs causés à l'ADN. C'est pourquoi nous avons pris le parti de considérer que la dose moyenne absorbée dans une cellule, en présence d'un type de NP, pouvait être liée à son efficacité radiosensibilisante.

Ainsi, notre objectif dans cette partie est de mettre à profit ces 2 propositions afin de réaliser un classement *in silico*, avec notre simulateur, du comportement *in cellulo* de 3 NPs sur des cellules U87. Nous souhaitons donc faire la preuve du concept que :

1. il est crucial de tenir compte, strictement, de la biodistribution et la cartographie des NPs dans les études Monte-Carlo de radiosensibilisation ;
2. la dose moyenne absorbée dans la cellule peut être utilisée comme une condition nécessaire à la performance globale d'une NP ;
3. nous avons élaboré un processus qui, couplé à une méthodologie de plan d'expériences numériques, peut-être utilisée pour réaliser un criblage virtuel d'un grand nombre de NPs.

Notre méthode pourrait ainsi être utilisée pour identifier des NPs prometteuses lors de phases de conception précliniques et permettra une mise en route plus rapide de NPs en études clinique afin de remédier au problème soulevé par Etheridge *et al.* [7].

### 1.3 Méthode et outils

Pour prouver le concept proposé ci-avant, nous avons décidé d'utiliser 3 NPs de compositions différentes (matériau du coeur  $Z = 79$  or ou fer  $Z = 26$ ), taille différente (diamètre de 20 ou 50 nm) et de surface différente (PVP ou PEG). Le choix de ces deux recouvrements a été motivé par le fait que leur charge de surface est différente ce qui peut conditionner le comportement de la NP dans le milieu de culture, le processus d'incorporation et la formation de cluster en intracellulaire. Ceci nous permet donc de jouer à la fois sur la biodistribution des NPs (taille et surface) ainsi que sur l'effet radiosensibilisant présumé (section efficace de l'effet photoélectrique proportionnel à  $Z^4$  à  $5$ ). Nous avons donc choisi les 3 objets suivants :

- diamètre de 20 nm, coeur en fer, surface en PVP ;
- diamètre de 20 nm, coeur en or, surface en PVP ;
- diamètre de 50 nm, coeur en or, surface en PEG.

Une étude de référence *in cellulo* a été menée sur ces objets. Après avoir été incorporés dans des cellules de glioblastome U87, ces dernières ont été irradiées à différentes doses (0, 2, 4, 6 et

10 Gy) avec un accélérateur linéaire médical produisant un faisceau de 6 MV au CHR Metz-Thionville. Ensuite, la capacité clonogénique des cellules a été évaluée (courbes de survie) ce qui nous a permis de réaliser un classement *in cellulo* des NPs selon leur pouvoir radiosensibilisant.

Ensuite, nous avons réalisé une étude *in silico* appelée *Scénario A* dans laquelle nous n'avons pas tenu compte de la biodistribution des NPs. Nous avons considéré qu'il s'agissait alors d'une étude Monte-Carlo dite "classique" dans laquelle le même nombre de NPs de chaque type a été simulé. Ensuite un classement des NPs a été réalisé sur la base des doses moyennes dans une structure sphérique représentant une cellule et dans laquelle les NPs ont été réparties.

Enfin, nous avons réalisé une étude *in silico* appelée *Scénario B* qui correspond à notre processus de criblage virtuel et dans laquelle nous avons tenu compte de la biodistribution des NPs. Pour ce faire, nous avons réalisé une étude de la distribution spatiale des NPs par imagerie de microscopie électronique en transmission (MET) qui nous a permis de mesurer la taille moyenne des clusters contenant les NPs et d'estimer visuellement le nombre de NPs par cluster. La quantité totale de NPs par cellule a été évaluée par spectrométrie ICP-OES (spectroscopie par torche à plasma avec détection par spectrométrie d'émission optique). Tout comme pour le *Scénario A*, un classement des NPs a été établi.

Pour les simulations Monte-Carlo, nous avons réparti les NPs dans une seule structure sphérique représentant une cellule U87 (diamètre de 12  $\mu\text{m}$ ). Pour répartir les NPs et les clusters nous avons utilisé l'algorithme de placement aléatoire développé dans la partie précédente (analyse de prédiction *in silico* / *in vitro*). Nous avons irradié la sphère située dans de l'eau avec une source de 6 MV dont nous avons tronqué le spectre en supprimant les contributions  $> 1$  MeV afin de réduire très significativement les temps de calcul du simulateur. Pour chaque scénario et chaque NP, nous avons réalisé 21 simulations différentes et avons mesuré les doses moyennes absorbées dans la structure cellule de 2 façons différentes (image 3D de la dose et spectre de l'énergie absorbée dans la structure). Le classement final a été établi après analyse statistique des données.

## 1.4 Résultats

L'étude de référence *in cellulo* nous a permis d'établir le classement suivant, de la NP la plus à la moins radiosensibilisante :

1. diamètre de 20 nm, coeur en fer, surface en PVP ;
2. diamètre de 20 nm, coeur en or, surface en PVP ;
3. diamètre de 50 nm, coeur en or, surface en PEG.

Les résultats de l'étude Monte-Carlo dite "classique" (*Scénario A*) nous ont suggéré un classement strictement inverse où la NP d'or de 50 nm serait la plus efficace.

Finalement, le *Scénario B* qui correspond à notre processus de criblage virtuel avec prise en compte de la cartographie des NPs a prédit un classement scrupuleusement identique au classement de référence établi *in cellulo*. Il apparaît de plus dans ce classement que la seule NP avec laquelle la dose moyenne dans la cellule est statistiquement différente est la NP de fer ce qui est également le cas *in cellulo* (avec un risque  $\alpha$  de 5%). Résultat d'autant plus intéressant qu'en se basant uniquement sur le nombre de protons du fer ( $Z = 26$ ), cette NP n'aurait pas eu grand intérêt pour une démarche de radiosensibilisation.

## 1.5 Conclusions et perspectives

Nous avons donc pu mettre en évidence, dans un cas d'étude simple en comparant 3 NPs et un type de cellule, que grâce à notre processus de criblage virtuel, nous étions capable de prédire

*in silico* le classement *in cellulo* de l'effet radiosensibilisant des NPs étudiées.

Si ce processus était appliqué à une plus grande échelle, il permettrait de diminuer de façon significative le temps de développement préclinique des NPs à visée radiosensibilisante. La prochaine étape de validation du processus serait de réaliser une prédiction *in silico* du classement *in vivo* de l'effet radiosensibilisant de NPs.

Cette partie a fait l'objet d'une soumission à publication dans le journal *Nanoscale* d'un article intitulé "Monte Carlo simulations guided by imaging to predict the *in vitro* ranking of radiosensitizing nanoparticles" qui est présenté ci-après.

## 2 Introduction

Radiosensitizing nano-objects are becoming a major innovation in the field of radiation therapy with the promise of a breakthrough in anti-cancer therapies. [137,138]

Since the early '90s, the number of articles published on the subject has kept increasing. [139] Unfortunately, as it has been mentioned in 2013 by Etheridge *et al.*, "Many of the revolutionary nanomedicine technologies anticipated in the literature may be 20 or more years from clinical use". [7] Indeed, only few nanoparticles (NPs)-radiation therapy combinations are undergoing clinical trials (only 3 records concerning NBTXR3 devices on [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)). [126]

In order to speed up the preclinical development of radiation therapy enhancing NPs, numerous studies have tried to predict their *in vitro* or *in vivo* radiosensitizing effect. [15,84,87,133] The most common method, inherited from the practices of physics, is to use Monte Carlo simulators of particles transport in matter such as BEAM, MCNP, PENELOPE or Geant4. [117,127–129] First attempts did not show satisfactory results. According to Butterworth *et al.* biological effects cannot, indeed, be accurately predicted on the basis of the gold nanoparticles (GNP) concentration and beam energy and suggest an oxidative stress as a central mechanism in mediating response. [135] Yet, it should be nuanced as results are likely to depend on the simulation parameters. That is why in a recent comment, McMahon has highlighted the fact that theoretical prediction scenarios and values should be meaningful within a therapeutic context. [136]

Conversely to previous published studies, the goal herein is not to predict the X-rays dose enhancement effect of the studied NPs. Instead, as a step forward towards an efficient prediction of their radiosensitizing effects, we have preferred to develop a simple yet effective *in silico* method to predict an *in vitro* ranking of radiation enhancing NPs. In fact our computerized method could make it possible to select, from a high number of nano-objects, the one performing the most promising results thus speeding up the preclinical development of radiosensitizing NPs.

In this article we compare two Monte Carlo approaches : (i) a classical one, not taking the biodistribution of NP into account, we call it *scenario A* ; and (ii) our virtual screening which is called *scenario B*. Each method is used to establish an *in silico* ranking of 3 radiosensitizing NPs in U87 glioblastoma cells. Results of both scenarii are then compared to *in vitro* experiments (reference) which had been carried out prior the Monte Carlo simulations.

While the ranking predicted in the *scenario A* does not fit the reference at all, we show for the first time how our *in silico* virtual screening method (*scenario B*), based on few experiments, is able to provide results consistent with *in vitro* responses therefore illustrating the relevant remarks of McMahon *et al.* related to theoretical prediction scenarios. [136]

### 3 Overview of the ranking process

Before illustrating our concept using the aforementioned *scenarii A, B* and reference results we would like to give the reader an overview of our virtual screening process used in the *scenario B*.

Comparing or optimizing NP-designs usually requires a lot of experiments which are not only expensive but also time-consuming. [7] The fundamental objective of our work is to elaborate a virtual screening process designed to quickly draw a relevant ranking of a high number of radiosensitizing NPs with as few experiments as possible. The number of experiments would then be drastically reduced compared to a standard approach. Once the computerized ranking has been established, the user could select a sample of the best NPs on which he could perform the proper biological assays necessary to validate or refine the selection.

Before describing our ranking methodology, the reader should be aware that it is based on several assumptions.

- A1 First, the radiosensitizing power of NPs is likely to be not entirely linked to the DNA damages. [6, 48, 130, 140] Thus the integrated or average dose deposited in the cell is an interesting information that could be correlated to the overall performance of a NP.
- A2 Then, it is mandatory to account for the intracellular distribution of NPs in the Monte Carlo simulator. [141, 142] For instance, a Transmission Electron Microscopy (TEM) image can be used to assess the intracellular colocalization and the topology of each NPs in each cell line. An Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) quantification could be used as well to refine the results. [143] Each scenario should be modeled afterward and should reflect information shown by TEM images and the ICP quantification. This assumption is illustrated by the comparison of the two *scenarii A* and *B*.
- A3 Finally, the radiosensitizing power of NPs are accurately assessed *in vitro* by clonogenic assays whose results can be plotted as survival curves representing the fraction of surviving cells as a function of the dose. [29]

The methodology that we suggest is composed of four logical steps that should be done in order.

- S1 First, the different combinations of NP / cell and radiation types should be well established. If necessary, a design of numerical experiments strategy could be used in order to speed up the simulation process.
- S2 For each combination that will be modeled in the simulator, the number of NPs in 1 cell as well as the size and distribution of NP clusters should be experimentally assessed.
- S3 The biodistribution of each combination in one cell should be faithfully modeled. The irradiation source chosen in the simulator should be close to the real one.
- S4 After the simulation is done, the mean dose in the cell should be recorded for each combination then NPs should be ranked with respect to it.

As aforementioned, in order to strengthen our approach, we carried out a preliminary experimental validation using 3 types of NPs on U87 glioblastoma cells monolayer cultures irradiated using a 6 MV photon beam from a clinical accelerator.

## 4 Experiments

### 4.1 NPs and cells characteristics

#### Nanoparticles

Iron (20 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with a PVP (Poly(N-vinylpyrrolidone)-modified for biomedical applications) surface, NanoXact formulation) and gold (20 nm with a PVP surface and 50 nm with a PEG surface, BioPure formulation) nanoparticles, suspended in water, were purchased from nanoComposix<sup>TM</sup> Inc. (San Diego, CA, USA) at a concentration of 20 mg/ml or 1 mg/ml respectively. The stock suspension was diluted appropriately to the required concentration in culture medium immediately prior to use.

Nanoparticles size was determined using Nanoparticles Tracking Analysis NTA 2.3 software on NanoSight system (Malvern Instruments Ltd, UK) and TEM.

#### Cells

Human primary glioblastomas cell lines U87 MG (ATCC HTB-14<sup>TM</sup>, LGC Standard, France) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) complemented with 10% fetal bovine serum, 0.4% L-asparagine, 0.36% L-serine, 1% L-glutamine, 1% essential amino acids, 0.5% non-essential amino acids, 0.4% vitamins, 1.25% sodium pyruvate and 1% Penicillin Streptomycin. Cells were maintained in monolayers in a tissue culture incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> 95% air.

### 4.2 Distribution and quantification of NPs in cells

#### TEM imaging

First,  $0.8 \times 10^4$  cells were plated in 96 well plates for 3 days, and then exposed to 0.05 mg/ml of nanoparticles for 24h. Cells were washed twice with phosphate-buffered saline. TEM imaging was carried out at the Service Commun de Microscopies Electroniques et de Microanalyses (SCMEM) of Nancy

#### ICP-OES quantification

$1.5 \times 10^6$  cells were plated in 175 cm<sup>2</sup> culture dishes for 3 days, and then exposed to nanoparticles for 1 or 24h. After incubation time, 1 ml of culture supernatant was collected; cells were washed three times with phosphate-buffered saline, trypsinized, counted and centrifuged 10 min at 300 g to obtained dry pellet.

Au or Fe content in supernatant and cells samples were determined using ICP-OES. The samples were dispersed in 5mL of aqua regia (67% HNO<sub>3</sub>/37% hydrochloric acid (w/w)) for 4h at 80°C. Subsequently, the samples were diluted with a HNO<sub>3</sub> 5% (w/w) matrix to adjust the volume to 10 mL; the samples were then filtered (0.22 μm) and analyzed by ICP-OES to determine the elemental content with a precision of 5%. For calibration of the ICP-OES, single-element standard solutions were prepared by successive dilution in a HNO<sub>3</sub> 5% (w/w) matrix from a 1000-ppm Au or Fe standard acquired from SCP Science (Quebec, Canada). [144]

### 4.3 Irradiation setup

A total of  $2.5 \times 10^5$  cells were plated in 25 cm<sup>2</sup> culture dishes containing culture medium for 48h. The medium was removed, and cells were exposed to fresh medium containing nanoparticles

for 24h. Cells were irradiated using a 6 MV photon beam from a Clinac<sup>®</sup> iX (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA) medical accelerator with respect to the scheme presented in Fig. 32. The skin-source distance was set to 100 cm, well plates were placed between 3 cm and 6 cm PTW RW3 water-equivalent slabs in order to take the build-up and the backscatter (respectively) into account. The field size was set to 30 cm x 30 cm so that a maximum of 4 well plates could be irradiated simultaneously. Monitor units were calculated so that a dose of 2, 4, 6 or 10 Gy ( $\pm 5\%$ ) was deposited into the well plates. 12h after the irradiation, cells were washed with phosphate-buffered saline, trypsinized, diluted four-fold to allow sufficient plating volume, homogenized by aspiration/reflux with a 21 G needle mounted on a syringe to achieve a single cell suspension, counted, and replated for survival analysis.

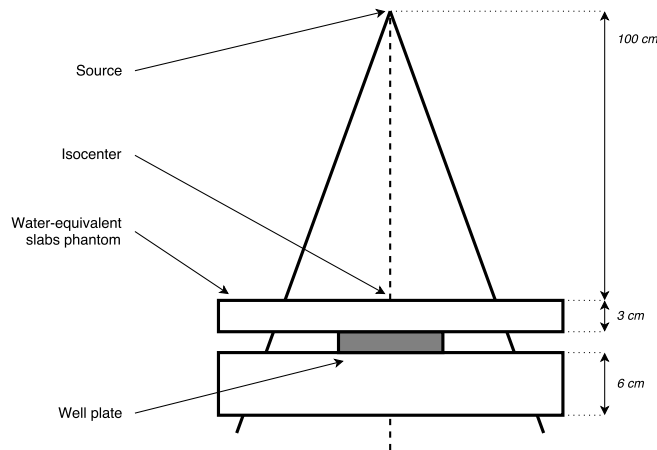


FIGURE 32 – Scheme of the irradiation setup that was used to deliver 2 to 10 Gy in the center of the well plates using a 6 MV beam with a field size of 30 cm x 30 cm

#### 4.4 *In vitro* reference results

The cell survival was assessed using clonogenic assays. A total of  $10^4$  cells were plated in 6 well plates and incubated for 12 days at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Surviving colonies were stained with 1 ml of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] solution (1 mg/ml) and counted using GelCount<sup>™</sup> (Oxford Optronix, Abingdon, UK). Results of the clonogenic assays were plotted as survival curves showing the fraction of surviving cells as a function of the dose deposited in the well plates.

## 5 Numerical modeling & simulation

### 5.1 General information on our simulations

#### Monte Carlo simulator

For the current study, we used GATE 7.0 with the Geant4 9.6.p03 and CLHEP 2.1.3.1 libraries. The pseudorandom number generator was the Mersenne Twister. We chose the Livermore physics list and activated Rayleigh scattering, photoelectric, Compton scattering, pair conversion, electron ionization and Bremsstrahlung effects. For the multiple scattering, we chose the Urban95 model. More information about the parameters of our physics list can be found in



TABLE 16 – Physics list parameters and values

Process	Model	Final range
Rayleigh scattering	Livermore	Default
Photoelectric effect	Livermore	0.1 nm
Compton scattering	Livermore	0.1 nm
Pair conversion	Livermore	Default
Electron ionization	Livermore	0.1 nm
Positron annihilation	Penelope	0.1 nm
Bremsstrahlung e-	Livermore	Default
Bremsstrahlung e+	Livermore	Default
Auger electrons	Atomic deexcitation	Default
Multiple scattering e-	Urban95	Default
Multiple scattering e+	Urban95	Default

Table 16. Auger electrons emission was activated through the atomic deexcitation functions. The energy and spatial cutoffs were set to 250 eV and 10 nm respectively.

### Geometry of the simulation

The geometry entered in the simulator was highly simple (Figure 33) : a water cube (edge size of 1 mm) containing a spherical structure standing for a U87 cell (radius of 6  $\mu\text{m}$ ). Then depending on the NP being evaluated, a random distribution taking both the size and the number of clusters into account was generated inside the spherical cell structure. Each cluster contained a fixed number of NPs (spherical structures). Each volume material was set to G4\_WATER except the NPs that were either gold or iron structures.

### Source specification

A cylindrical source (radius of 6  $\mu\text{m}$ , height of 1 nm) was placed 1 cm away from the cell structure. The primary photon beam spectrum (see Figure 34) was based on a 6 MV, 10 cm x 10 cm beam calculated by Ding in 2002 for which the contributions  $\geq 1$  MeV were not used in order to significantly accelerate the calculation time. [134]

### Runs & results

Each scenario was cut into 21 runs launched on a parallel calculation platform. Each run had a different engine seed. For each run, a total number of  $10^{10}$  primaries were tracked.

At the end of the simulations the following results were recorded : 3D dose images (cube with an edge size of 12  $\mu\text{m}$ ), secondary species production in the cell structure and a spectrum of the energy deposited in the cell structure. The analysis of the results was done using ROOT 5.34/32, ImageJ 1.49d, R and locally developed macros. [121, 145, 146] Mean doses in the cell were assessed using 2 methods : a measurement on the 3D dose images and the integration of the energy deposited in the cell spectra.

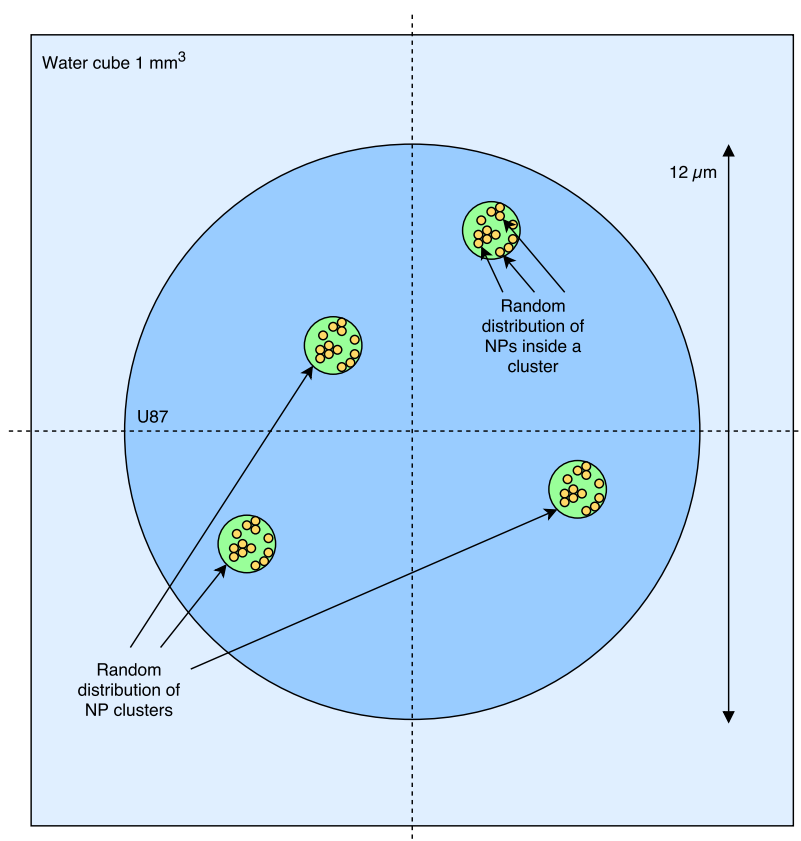


FIGURE 33 – Scheme of the geometry that was modeled in the simulator ; each volume material was set to G4\_WATER except for the NPs that were either gold or iron structures

## 5.2 Scenario A : classical Monte Carlo simulations

In order to prove that Monte Carlo simulations should preferentially take the biodistribution of the NPs into account, we have chosen to establish a ranking of our 3 NPs on the basis of classical Monte Carlo simulations. By "classical Monte Carlo simulation" we mean that they are not based on a preliminar evaluation of intracellular distribution of NPs. These simulations have been extensively detailed in the literature. [87, 94, 112] In this counterexample, we have decided to fix the number of clusters (= 10), the number of NPs per cluster (= 100) and radius of each cluster (= 250 nm) which are the same for our 3 NPs.

## 5.3 Scenario B : our virtual screening process

Concerning our virtual screening process, number of clusters, clusters sizes and number of NPs per cluster were determined experimentally *via* ICP-OES and TEM imaging. Values of these parameters are summarized in Table 17.

Examples of TEM images of U87 cells with and without NPs are shown in the Figure 35. Numerous measurements of the clusters sizes for each type of NP lead us to the choice of the parameters summarized in the Table 17.

2. 50 nm gold NPs do not form proper clusters, they stay isolated as it can be seen on the Figure 35. Therefore the parameter "Number of NPs / cluster" was set to 1.

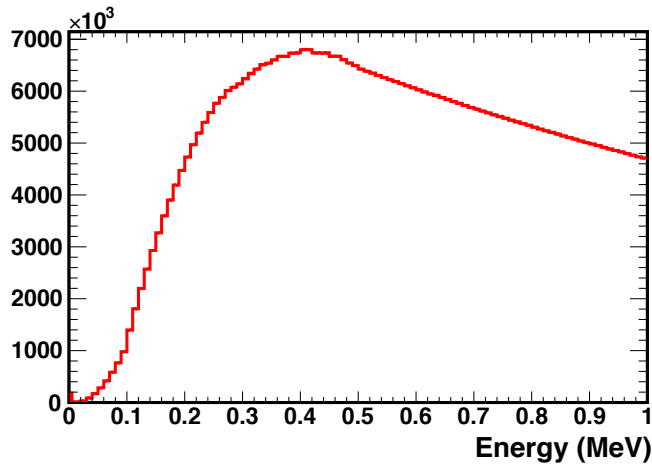


FIGURE 34 – Energy spectrum of the particules entering into the U87 spherical structure

TABLE 17 – Clusters characteristics depending on the NP type

	20 nm iron	20 nm gold	50 nm gold
Number of clusters	34	10	9
Number of NPs / cluster	5000	100	1 <sup>2</sup>
Cluster radius	250 nm	250 nm	25 nm

## 6 Results

### 6.1 Monte Carlo ranking results

For each simulation, the mean dose was measured on the 3D dose images using ImageJ. Values were normalized so that the mean dose in water over the 21 runs is equal to 100.00%. We also measured the mean dose deposited into the cell on the spectrum of the energy using ROOT and found that both measurement gave the same results (example of an energy deposition histogram of a 20 nm iron NP, run #1, Figure 36).

#### *Scenario A*

Concerning the *scenario A*, the mean value of the 21 runs  $\pm$  95% confidence interval (CI) are shown in the Figure 37 and the Table 18. The following ranking has been established using this classical simulation process (from worse to best) : 20 nm iron NP, 20 nm gold NP, 50 nm gold NP. Since its 95% CI are not overlapping with others, only the dose enhancement result of the 50 nm gold NP are statistically different from the remaining ones.

#### *Scenario B*

Regarding the *scenario B*, results for each run and each type of NP are shown in the Figure 38 ; the mean value of the 21 runs  $\pm$  95% CI are shown in the Figure 39 and the Table 19. The following ranking has been established using our virtual screening process (from worse to best) : 50 nm gold NP, 20 nm gold NP, 20 nm iron NP. Since its 95% CI are not overlapping with

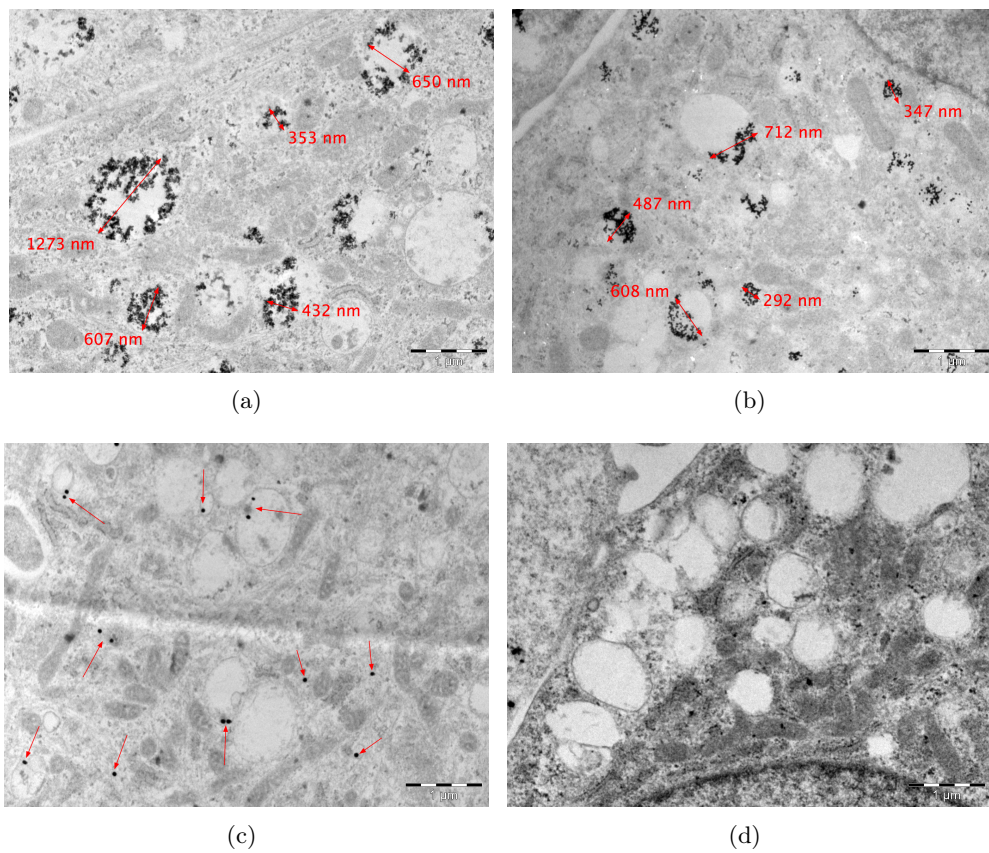


FIGURE 35 – TEM images of U87 cells in which we can see 20 nm iron NPs clusters (a) ; 20 nm gold NPs clusters (b) ; 50 nm gold NPs (c) and a control image without NP (d).

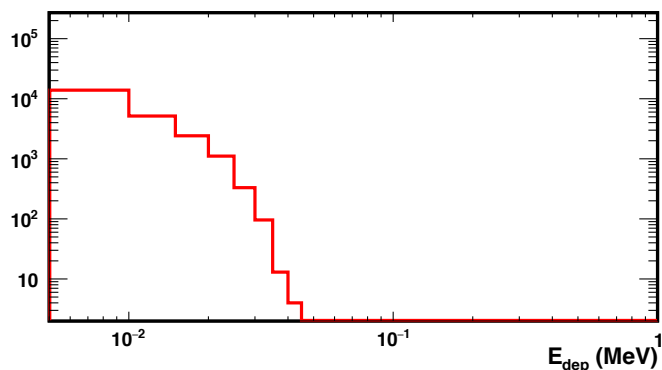


FIGURE 36 – Spectrum of the energy deposited into the cell structure in the presence of 20 nm iron NP clusters

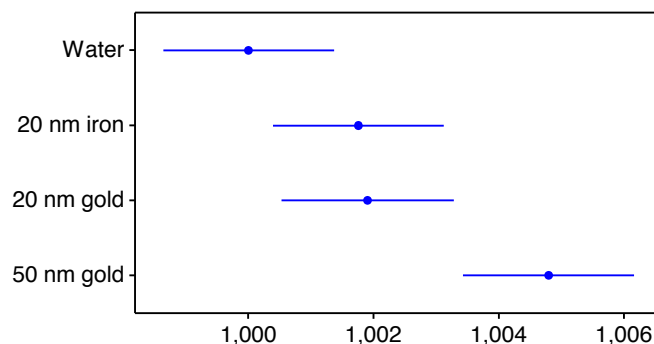


FIGURE 37 – *Scenario A*. Mean  $\pm$  95% CI of the mean dose deposited into the cell structure for each type of NP ; values of the mean dose deposited into the cell structure are normalized so that the mean dose in water is equal to 1.000 ; results for the 50 nm gold NP are statistically different

others, only the dose enhancement result of the 20 nm iron NP are statistically different from the remaining ones.

## 6.2 *In vitro* analysis

### Assessment of radiosensitizing effects of the nanoparticles by clonogenic assays

As this technique is considered as the gold standard in radiation biology, the radiosensitizing potential of the three previously described NPs was determined by clonogenic assays. U87 glioblastoma cells were exposed to gold or iron NPs at  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h prior to irradiation with 6 MV X-rays. Figure 40 shows the radiation dose response curves for U87 cells exposed or not to NPs. Surviving fractions were normalized to that of non irradiated control cells in each of the experiments to correct for the direct cytotoxic effect of organometallic NPs. Dose response curves of the form  $SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$  were fitted to the data using least squares minimization, weighted using the standard error of each measurement.<sup>3</sup> Statistical errors on fit values were calculated with 95% CI. The radiobiological parameters for each NP are summarized in Table

3. With  $SF$  being the Survival Fraction,  $D$  the dose of radiations in Gy and  $\alpha, \beta$  radiobiological curve fitting factors.

TABLE 18 – Statistics summary of the results of the *Scenario A* (in ascending order)

Sample	Mean [%]	Standard deviation [%]	Individual 95% CI [%]
Water	100.00	0.326	[99.85 ; 100.15]
20 nm iron	100.18	0.326	[100.03 ; 100.32]
20 nm gold	100.20	0.331	[100.05 ; 100.35]
50 nm gold	100.48	0.327	[100.33 ; 100.63]

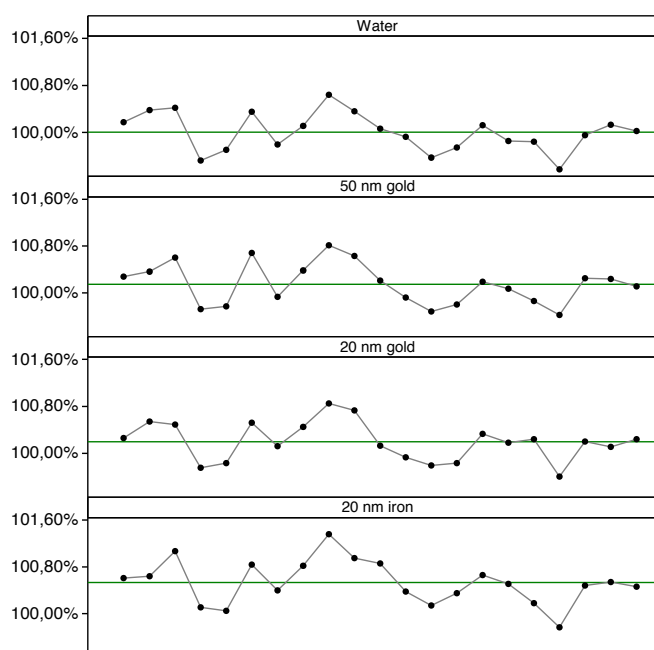


FIGURE 38 – *Scenario B*. In ordinate, for each type of NP : values of the mean dose deposited into the cell structure normalized so that the mean of the values (green line) in water is equal to 100% ; values are horizontally distributed from the run #1 to #21

20. Results showed improvement in the response of U87 cells to radiation in the presence of 20 nm NPs, as compared to control cells without NPs. The most significant response was obtained with 20 nm iron NPs compared to radiation only controls (e.g. at 2 Gy,  $p = 0.005$ , therefore there are strong presumptions to reject the null hypothesis which means that the mean values are statistically different). Dose enhancement factors were calculated as the ratio of doses required to give the same surviving fractions as that of the radiation only control cells at a dose of 2 Gy (SF2). Dose Modifying Factors (DMF) were about 1.064, 0.948 and 0.783 for 50 nm gold, 20 nm gold and 20 nm iron NPs, respectively. [6]

### TEM observations of NP cellular uptake

After particles incubation with cells, samples were prepared for TEM analysis.

Whatever the NPs studied, they are trapped in vacuoles with a size comprised between 250 and 1250 nm, and clearly delineated by a membrane. While 50 nm gold NPs were found as single

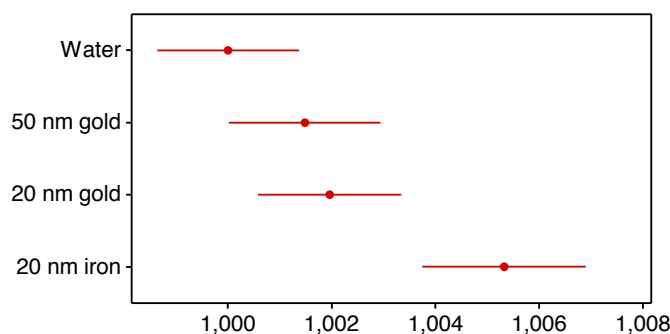


FIGURE 39 – *Scenario B*. Mean  $\pm$  95% CI of the mean dose deposited into the cell structure for each type of NP ; values of the mean dose deposited into the cell structure are normalized so that the mean dose in water is equal to 1.000 ; results for the 20 nm iron NP are statistically different

TABLE 19 – Statistics summary of the results of the *Scenario B* (in ascending order)

Sample	Mean [%]	Standard deviation [%]	Individual 95% CI [%]
Water	100.00	0.326	[99.85 ; 100.15]
50 nm gold	100.15	0.349	[99.99 ; 100.31]
20 nm gold	100.20	0.331	[100.05 ; 100.35]
20 nm iron	100.53	0.375	[100.36 ; 100.70]

objects in vesicles (1 to 2 NPs per vesicle), we have principally observed agglomerates for 20 nm gold and 20 nm iron NPs. The images show a higher number of clusters for 20 nm iron than 20 nm gold NPs.

ICP-OES analyses confirmed that NPs uptake in U87 cells was more important for 20 nm iron than for 20 or 50 nm gold NPs.

## 7 Discussion & conclusions

Firstly, the dose enhancement results shown in the tables 18 and 19 seem surprisingly low comparing to some values published in the literature. [95, 112] It is likely a consequence of the fact that the dose was averaged over the whole cell structure which volume is way bigger than the clusters' one (*e.g.* the cell structure's volume is  $904.8 \mu\text{m}^3$  while the sum of the iron NP clusters' volume is  $2.2 \mu\text{m}^3$ ). A visual analysis of the 3D dose images highlights that the deposited dose is locally enhanced in the vicinity of NP clusters. An example of a 3D dose image (from the *scenario B*) in the presence of iron NPs is shown in the Figure 41.

Then, as it can be seen when comparing figures 37 and 39 as well as tables 18 and 19, the *scenario A* ranking is completely different than the *scenario B* one. Indeed, in the classical Monte Carlo ranking, the NP showing the highest radiosensitizing potential is the 50 nm gold NP whereas the worse NP seems to be the 20 nm iron NP. However, referring to the reference *in vitro* results shown in the Figure 40, it is unambiguous that the correct ranking was established in the *scenario B* which corresponds to our virtual screening process. We thus believe that both the distribution and the quantity of NPs in the cell should be experimentally evaluated before

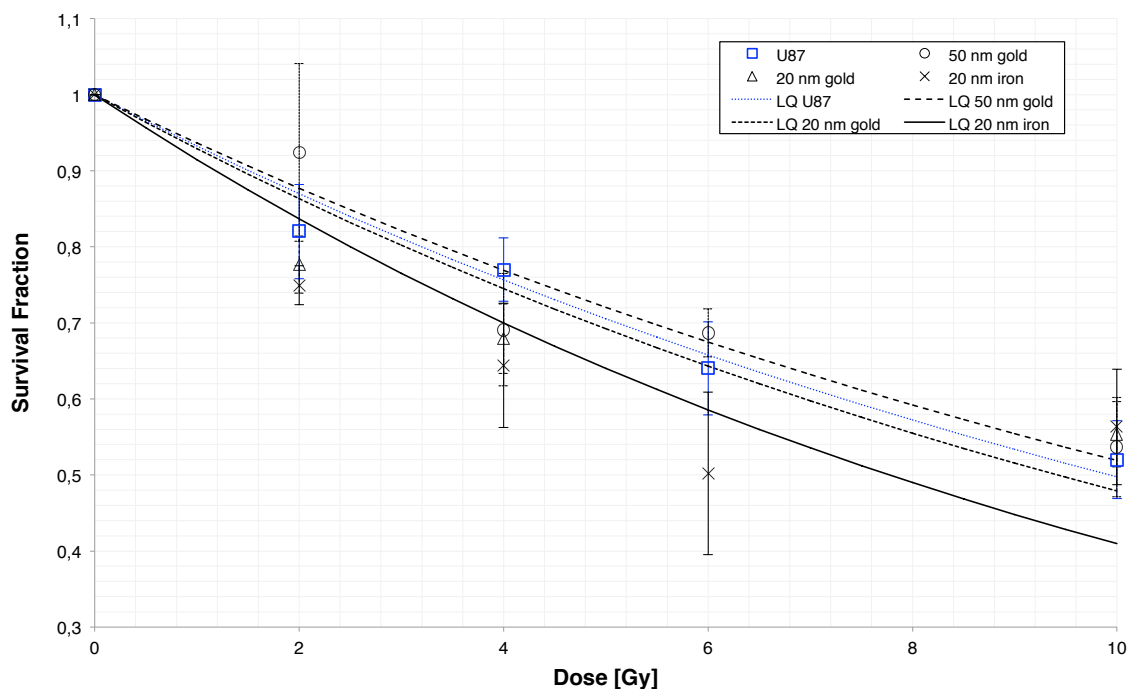


FIGURE 40 – Radiation dose response curves for U87 cells exposed or not to NPs. Surviving fractions were normalized to that of non irradiated control cells in each of the experiments to correct for the direct cytotoxic effect of organometallic nanoparticles. Error bars are 95% CI.

TABLE 20 – Radiobiological curve fitting parameters for each NP

NP	$\alpha$	$\beta$
U87 without NP	0.0698	0
50 nm gold	0.0656	0
20 nm gold	0.0736	0
20 nm iron	0.0892	0

taking them into account to run Monte Carlo ranking computations which is the originality of our approach.

Figure 42 compares two alternative approaches to rank the radiosensitizing effects of NPs : an *in vitro* and classical method versus our *in silico* and innovative technique. As it is shown in this Figure, our accelerated *in silico* process could save up to 56 days of experiment compared to a simple study requiring 5 consecutive clonogenic assays. Moreover, it should be noticed that for more complex combinations comparing more NPs, cells, sources, the accelerated process would not last much longer whereas the usual process duration would be drastically extended.

This article addresses the *in silico-in vitro* prediction issue of nanoparticle-based radiosensitization enhancement. Conversely to previous studies, the goal is neither to predict the X-ray dose effect nor the surviving fraction of irradiated cell but to carry out computational experiments to quickly identify non-efficient nano-structures and then to preferentially select the most promising ones for the subsequent *in vitro* and *in vivo* studies. To this aim, this article presents a computational ranking method and tests it on 3 different NPs by comparison with a standard



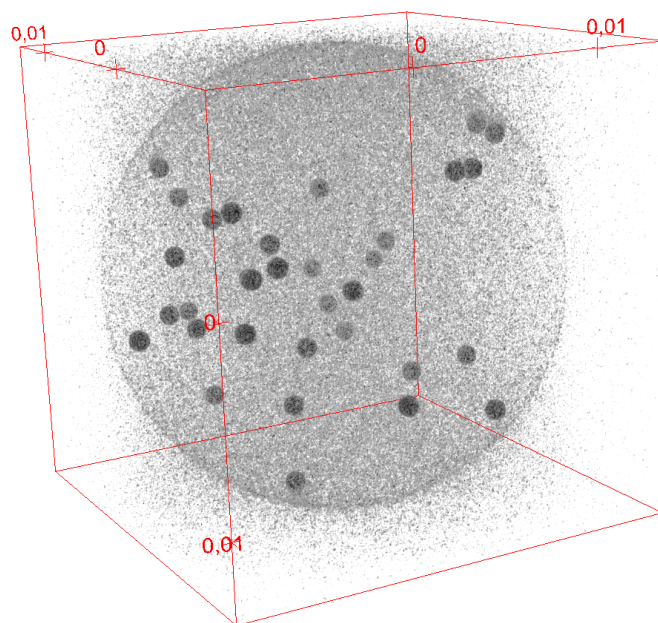


FIGURE 41 – 3D view of a dose image from the *scenario B* with a visible enhancement in the vicinity of the iron NP clusters (black spheres) which are located inside the U87 cell ; the image boundaries are in red ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ )

Monte Carlo simulation not taking the biodistribution of NPs into account (*scenario A*) and the reference *in vitro* responses. The latter established the following ranking (from the best radiosensitizing NPs to the worse) : 20 nm iron PVP, 20 nm gold PVP and 50 nm gold PEG. As the classical Monte Carlo method led us to the opposite ranking, the accelerated *in silico* method that we proposed accurately predicted the reference results. That corroborates the relevance of such a prior ranking method able to speed up the preclinical development of nanoparticles in radiation therapy.

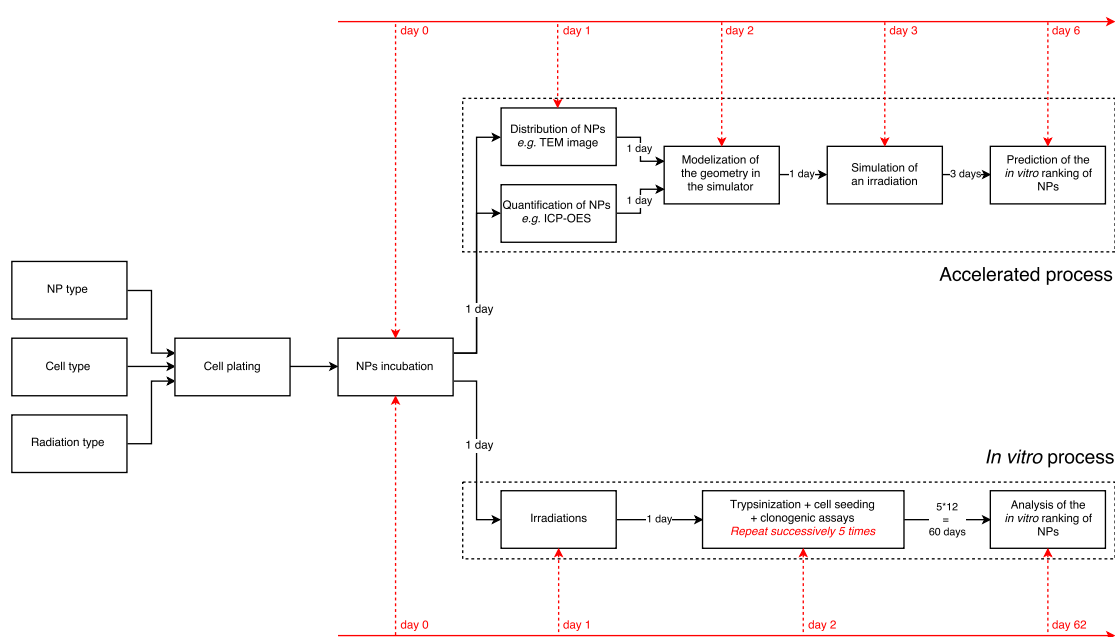


FIGURE 42 – Timeline comparison of our accelerated process versus a classical *in vitro* process. The *in silico* virtual screening process could save up to 56 days compared to the usual approach.



# Conclusions générales et perspectives

Les travaux détaillés dans ce manuscrit sont le fruit d'une collaboration entre la biologie, l'automatique et la physique et dont l'objectif était de répondre à la problématique suivante : comment réduire significativement le temps de développement préclinique des NPs à visée radiosensibilisante ? Nous avons choisi de diviser cette thèse en trois grandes thématiques : tout d'abord une étude bibliographique sur l'utilisation des NPs en radiothérapie (partie 1), puis l'élaboration et la caractérisation d'un processus de simulation numérique dont l'objectif serait d'établir un classement *in silico* de NPs radiosensibilisantes (parties 2 et 3) et enfin l'utilisation de ce processus dans le cadre de prédictions *in silico* / *in vitro* et *in silico* / *in cellulo*.

L'étude approfondie de la littérature sur la radiothérapie augmentée par les NPs nous a permis de mieux comprendre ses enjeux dans le domaine de la cancérologie et les difficultés inhérentes à l'évaluation des NPs en recherche préclinique. Cela nous a donné l'opportunité de rédiger une revue scientifique pluridisciplinaire permettant d'ajouter le regard du physicien médical aux connaissances acquises par les biologistes et les chimistes [6]. Nous y avons récapitulé l'ensemble des paramètres clés liés à la radiosensibilisation par les NPs et cela nous a permis de constater un manque de standardisation qui nous est apparu comme un frein au développement clinique des NPs ainsi qu'à la compréhension même des mécanismes en jeu. L'étude de Etheridge *et al.* intitulée "The big picture on nanomedicine : the state of investigational and approved nanomedicine products" [7] nous a paru particulièrement pertinente et nous a permis de clarifier notre problématique puis d'établir un plan d'action pour la suite de la thèse.

Nous avons ainsi pris le parti de développer une méthodologie de criblage virtuel composée d'un module d'une plateforme informatique de simulation Monte-Carlo des interactions NPs – rayons X (Geant4-GATE) utilisée en synergie avec des plans d'expériences numériques. L'objectif étant d'accélérer le développement préclinique des NPs en réalisant un classement *in silico* rapide des NPs radiosensibilisantes permettant d'identifier celles qui présentent les propriétés les plus prometteuses. C'est dans ce cadre que nous avons déposé le savoir-faire associé à cette méthodologie à l'INPI sous la forme d'une enveloppe Soleau. Ensuite, nous avons proposé une méthode standardisée de caractérisation des simulateurs Monte-Carlo utilisés pour l'étude des NPs radiosensibilisantes sous la forme d'une analyse de robustesse. Cette analyse nous a permis d'identifier certains paramètres critiques de notre simulateur tels que les seuils de coupures en énergie ou l'activation des électrons Auger ce qui a fait l'objet d'une soumission à publication dans le journal IEEE Transactions on Nanobioscience [8].

Finalement, dans les parties 4 et 5 de ce manuscrit, nous avons utilisé notre simulateur pour réaliser des analyses de prédiction *in vitro* et *in cellulo*. Nous n'avons malheureusement pas été en mesure d'obtenir de corrélation entre les prédictions *in silico* et *in vitro* pour 2 raisons. La première étant que nous ne disposons pas d'une concentration en NPs suffisante pour mettre

cette corrélation en évidence. La deuxième étant que dans tous les cas, nous aurions atteint les limites du simulateur en terme de nombre de structures pouvant être pris en charge. En effet, nous avons fait le choix innovant de modéliser chaque NP de façon individuelle ce qui nous a poussé à développer un algorithme de répartition spatiale aléatoire des structures dans le simulateur. Algorithme que nous avons tout de même pu mettre à profit dans la dernière partie de cette thèse qui traite des prédictions *in silico* / *in cellulo*. Pour ces prédictions, nous avons souhaité innover en tenant compte de la biodistribution des NPs dans la modélisation géométrique des NPs durant les simulations numériques. Nous avons pu prouver que ce choix était pertinent en comparant un classement de référence établi *in cellulo* avec 3 types de NPs versus 2 classements *in silico* qui intégraient (ou pas) la biodistribution des NPs. Seul le classement incluant la biodistribution des NPs a pu reproduire fidèlement les résultats de référence obtenus *in cellulo*. Ce processus de criblage *in silico* / *in cellulo* a fait l'objet d'une soumission à publication dans le journal Nanoscale. Nous pensons que ce processus pourra permettre d'accélérer significativement le temps de développement préclinique des NPs à visée radiosensibilisantes.

La perspective principale de cette thèse serait de valider notre processus de criblage *in vivo* ce qui a fait l'objet d'une candidature au Prix de la Recherche Clinique du CHR Metz-Thionville afin d'obtenir les financements nécessaires à la poursuite des travaux. Il nous paraît également intéressant de lever le verrou que nous avons identifié dans la quatrième partie (nombre de structures maximale pour notre simulateur) et d'automatiser au maximum les différentes fonctionnalités de simulation.

En conclusion de ce manuscrit et à titre tout à fait personnel, je pense que le caractère interdisciplinaire de ces travaux est le reflet du nouveau visage de la recherche en cancérologie. Il me paraît évident qu'une collaboration très étroite entre les différents professionnels et chercheurs (biologistes, chimistes, automaticiens, physiciens et médecins) est une nécessité absolue si nous voulons faire progresser la recherche contre le cancer. Les acteurs de cette recherche doivent se comprendre et échanger pour que des thérapies innovantes puissent émerger. Cette thèse a été un enrichissement personnel très important dans le cadre de mon métier de physicien médical et me permet à présent de voir le cancer sous un autre angle. Elle a renforcé ma détermination et ma motivation à poursuivre dans la recherche en cancérologie afin de faire reculer cette maladie si redoutable.

# Bibliographie

- [1] R. Delorme, “Photo-activation radiotherapy with nanoparticles : Modeling at a sub-micrometer level and experimental comparison,” Ph.D. dissertation, University of Paris-Sud 11, 2013.
- [2] I. O. for Standardization, *ISO/TS 27687 :2008 Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*, International Organization for Standardization Std., 2008. [Online]. Available : [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=44278](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=44278)
- [3] —, *ISO/TS 80004-6 :2013 Nanotechnologies – Vocabulary – Part 6 : Nano-object characterization*, International Organization for Standardization Std., 2013. [Online]. Available : [http://www.iso.org/iso/fr/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=52333](http://www.iso.org/iso/fr/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=52333)
- [4] —, *ISO/TS 80004-7 :2011 Nanotechnologies – Vocabulary – Part 7 : Diagnostics and therapeutics for healthcare*, International Organization for Standardization Std., 2011. [Online]. Available : [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=51962](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=51962)
- [5] R. P. Feynman, “There’s plenty of room at the bottom,” in *Annual Meeting of the American Physical Society*, 1959.
- [6] P. Retif, S. Pinel, M. Toussaint, C. Frochot, R. Chouikrat, T. Bastogne, and M. Barberi-Heyob, “Nanoparticles for radiation therapy enhancement : the key parameters,” *Theranostics*, vol. 5, no. 9, pp. 1030–1044, 2015.
- [7] M. L. Etheridge, S. A. Campbell, A. G. Erdman, C. L. Haynes, S. M. Wolf, and J. McCullough, “The big picture on nanomedicine : the state of investigational and approved nanomedicine products,” *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 9, no. 1, pp. 1 – 14, 2013. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963412002882>
- [8] P. Retif, T. Bastogne, and M. Barberi-Heyob, “Robustness analysis of a geant4-gate simulator for nano-radiosensitizers characterization,” *IEEE Transactions on NanoBioscience*, vol. PP, no. 99, pp. 1–1, 2016.
- [9] M. Toussaint, M. Barberi-Heyob, S. Pinel, and C. Frochot, “How nanoparticles can solve resistance and limitation in pdt efficiency,” in *Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer*. Springer, 2015, pp. 197–211.
- [10] A.-L. Bulin, C. Truillet, R. Chouikrat, F. o. Lux, C. l. Frochot, D. Amans, G. Ledoux, O. Tillement, P. Perriat, M. Barberi-Heyob *et al.*, “X-ray-induced singlet oxygen activation with nanoscintillator-coupled porphyrins,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 117, no. 41, pp. 21 583–21 589, 2013.

- [11] D. Bechet, S. R. Mordon, F. Guillemain, and M. A. Barberi-Heyob, "Photodynamic therapy of malignant brain tumours : A complementary approach to conventional therapies," *Cancer treatment reviews*, vol. 40, no. 2, pp. 229–241, 2014.
- [12] D. Bechet, F. Auger, P. Couleaud, E. Marty, L. Ravasi, N. Durieux, C. Bonnet, F. Plénat, C. Frochot, S. Mordon *et al.*, "Multifunctional ultrasmall nanoplatfoms for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of brain tumors guided by real-time mri," *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 11, no. 3, pp. 657–670, 2015.
- [13] I. Rosenberg, "Radiation oncology physics : A handbook for teachers and students," *British journal of cancer*, vol. 98, no. 5, p. 1020, 2008.
- [14] S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, G. Schettino, G. R. Dickson, A. R. Hounsell, and J. M. O'Sullivan, "Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles," *Scientific reports*, vol. 1, 2011.
- [15] M. Douglass, E. Bezak, and S. Penfold, "Monte carlo investigation of the increased radiation deposition due to gold nanoparticles using kilovoltage and megavoltage photons in a 3d randomized cell model," *Medical physics*, vol. 40, no. 7, p. 071710, 2013.
- [16] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, and A. Zweck, "The emerging nanomedicine landscape," *Nature biotechnology*, vol. 24, no. 10, pp. 1211–1217, 2006.
- [17] B. Thiesen and A. Jordan, "Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 24, no. 6, pp. 467–474, 2008.
- [18] A. Jordan, R. Scholz, K. Maier-Hauff, F. K. van Landeghem, N. Waldoefner, U. Teichgraber, J. Pinkernelle, H. Bruhn, F. Neumann, B. Thiesen *et al.*, "The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma," *Journal of neuro-oncology*, vol. 78, no. 1, pp. 7–14, 2006.
- [19] Z. B. Starkewolf, L. Miyachi, J. Wong, and T. Guo, "X-ray triggered release of doxorubicin from nanoparticle drug carriers for cancer therapy," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 25, pp. 2545–2547, 2013.
- [20] W. Chen and J. Zhang, "Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 6, no. 4, pp. 1159–1166, 2006.
- [21] J. F. Hainfeld, F. A. Dilmanian, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz, "Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 60, no. 8, pp. 977–985, 2008.
- [22] H. E. Townley, J. Kim, and P. J. Dobson, "In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 4, no. 16, pp. 5043–5050, 2012.
- [23] C. Mirjolet, A. Papa, G. Créhange, O. Raguin, C. Seignez, C. Paul, G. Truc, P. Maingon, and N. Millot, "The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma : A proof-of-concept," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 108, no. 1, pp. 136–142, 2013.
- [24] J. Takahashi and M. Misawa, "Analysis of potential radiosensitizing materials for x-ray-induced photodynamic therapy," *NanoBiotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 116–126, 2007.
- [25] W. Yang, P. W. Read, J. Mi, J. M. Baisden, K. A. Reardon, J. M. Larner, B. P. Helmke, and K. Sheng, "Semiconductor nanoparticles as energy mediators for photosensitizer-enhanced

- 
- radiotherapy,” *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, vol. 72, no. 3, pp. 633–635, 2008.
- [26] G. r. Le Duc, I. Miladi, C. Alric, P. Mowat, E. Brauer-Krisch, A. Bouchet, E. Khalil, C. Billotey, M. Janier, F. Lux *et al.*, “Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles,” *ACS nano*, vol. 5, no. 12, pp. 9566–9574, 2011.
- [27] P. Liu, Z. Huang, Z. Chen, R. Xu, H. Wu, F. Zang, C. Wang, and N. Gu, “Silver nanoparticles : a novel radiation sensitizer for glioma?” *Nanoscale*, vol. 5, no. 23, pp. 11 829–11 836, 2013.
- [28] J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, L. E. Taggart, G. R. Dickson, S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, C. Trainor, A. R. Hounsell *et al.*, “Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles,” *International journal of nanomedicine*, vol. 7, p. 2673, 2012.
- [29] N. A. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. Van Bree, “Clonogenic assay of cells in vitro,” *Nature protocols*, vol. 1, no. 5, pp. 2315–2319, 2006.
- [30] J. P. Kirkpatrick, J. J. Meyer, and L. B. Marks, “The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery,” in *Seminars in radiation oncology*, vol. 18, no. 4. Elsevier, 2008, pp. 240–243.
- [31] I. A. E. A. (IAEA), “Relative biological effectiveness in ion beam therapy,” Tech. Rep., 2008.
- [32] I. C. on Radiological Protection (ICRP), “Relative biological effectiveness (rbe), quality factor (q), and radiation weighting factor (wr),” Tech. Rep., 2003.
- [33] I. C. on Radiation Units and M. (ICRU), “Quantitative concepts and dosimetry in radiobiology,” Tech. Rep. 30, 1979.
- [34] S. Jain, J. A. Coulter, A. R. Hounsell, K. T. Butterworth, S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, G. R. Dickson, K. M. Prise, F. J. Currell *et al.*, “Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies,” *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, vol. 79, no. 2, pp. 531–539, 2011.
- [35] L. Sim, A. Fielding, M. English, E. Waclawik, A. Rockstroh, C. Soekmadji, R. Vasireddy, P. Russell, and C. Nelson, *Enhancement of biological effectiveness of radiotherapy treatments of prostate cancer cells in vitro using gold nanoparticles*, Coogee Beach, Sydney, N.S.W, 2011. [Online]. Available : <http://eprints.qut.edu.au/50074/>
- [36] Q. Xiao, X. Zheng, W. Bu, W. Ge, S. Zhang, F. Chen, H. Xing, Q. Ren, W. Fan, K. Zhao *et al.*, “A core/satellite multifunctional nanotheranostic for in vivo imaging and tumor eradication by radiation/photothermal synergistic therapy,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, no. 35, pp. 13 041–13 048, 2013.
- [37] S. Klein, A. Sommer, L. V. Distel, W. Neuhuber, and C. Kryschi, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation,” *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 425, no. 2, pp. 393–397, 2012.
- [38] M. Misawa and J. Takahashi, “Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and uv irradiations,” *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 7, no. 5, pp. 604–614, 2011.
- [39] P. M. D. Gara, N. I. Garabano, M. J. L. Portoles, M. S. Moreno, D. Dodat, O. R. Casas, M. C. Gonzalez, and M. L. Kotler, “Ros enhancement by silicon nanoparticles in x-ray irradiated aqueous suspensions and in glioma c6 cells,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14, no. 3, pp. 1–13, 2012.



- [40] H. E. Townley, E. Rapa, G. Wakefield, and P. J. Dobson, "Nanoparticle augmented radiation treatment decreases cancer cell proliferation," *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 8, no. 4, pp. 526–536, 2012.
- [41] L. Wang, W. Yang, P. Read, J. Larner, and K. Sheng, "Tumor cell apoptosis induced by nanoparticle conjugate in combination with radiation therapy," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 47, p. 475103, 2010.
- [42] F. Geng, K. Song, J. Z. Xing, C. Yuan, S. Yan, Q. Yang, J. Chen, and B. Kong, "Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 28, p. 285101, 2011.
- [43] F.-b. Cui, R.-T. Li, Q. Liu, P.-y. Wu, W.-j. Hu, G.-f. Yue, H. Ding, L.-X. Yu, X.-P. Qian, and B.-R. Liu, "Enhancement of radiotherapy efficacy by docetaxel-loaded gelatinase-stimuli peg-pep-pcl nanoparticles in gastric cancer," *Cancer letters*, vol. 346, no. 1, pp. 53–62, 2014.
- [44] M.-Y. Chang, A.-L. Shiau, Y.-H. Chen, C.-J. Chang, H. H.-W. Chen, and C.-L. Wu, "Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice," *Cancer science*, vol. 99, no. 7, pp. 1479–1484, 2008.
- [45] W. Roa, X. Zhang, L. Guo, A. Shaw, X. Hu, Y. Xiong, S. Gulavita, S. Patel, X. Sun, J. Chen *et al.*, "Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 37, p. 375101, 2009.
- [46] C.-J. Liu, C.-H. Wang, S.-T. Chen, H.-H. Chen, W.-H. Leng, C.-C. Chien, C.-L. Wang, I. M. Kempson, Y. Hwu, T.-C. Lai *et al.*, "Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles," *Physics in medicine and biology*, vol. 55, no. 4, p. 931, 2010.
- [47] K. T. Butterworth, S. J. McMahon, F. J. Currell, and K. M. Prise, "Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization," *Nanoscale*, vol. 4, no. 16, pp. 4830–4838, 2012.
- [48] W. Rima, L. Sancey, M.-T. Aloy, E. Armandy, G. B. Alcantara, T. Epicier, A. Malchere, L. Joly-Pottuz, P. Mowat, F. Lux *et al.*, "Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 34, no. 1, pp. 181–195, 2013.
- [49] T. Kong, J. Zeng, X. Wang, X. Yang, J. Yang, S. McQuarrie, A. McEwan, W. Roa, J. Chen, and J. Z. Xing, "Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles," *small*, vol. 4, no. 9, pp. 1537–1543, 2008.
- [50] K. Khoshgard, B. Hashemi, A. Arbabi, M. J. Rasaei, and M. Soleimani, "Radiosensitization effect of folate-conjugated gold nanoparticles on hela cancer cells under orthovoltage superficial radiotherapy techniques," *Physics in medicine and biology*, vol. 59, no. 9, p. 2249, 2014.
- [51] P. Mowat, A. Mignot, W. Rima, F. Lux, O. Tillement, C. Roulin, M. Dutreix, D. Bechet, S. Huger, L. Humbert *et al.*, "In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells," *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 11, no. 9, pp. 7833–7839, 2011.
- [52] X.-D. Zhang, D. Wu, X. Shen, J. Chen, Y.-M. Sun, P.-X. Liu, and X.-J. Liang, "Size-dependent radiosensitization of peg-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy," *Biomaterials*, vol. 33, no. 27, pp. 6408–6419, 2012.

- 
- [53] K. Butterworth, J. Wyer, M. Brennan-Fournet, C. Latimer, M. Shah, F. Currell, and D. Hirst, "Variation of strand break yield for plasmid dna irradiated with high-z metal nanoparticles," *Radiation research*, vol. 170, no. 3, pp. 381–387, 2008.
- [54] E. Brun, L. Sanche, and C. Sicard-Roselli, "Parameters governing gold nanoparticle x-ray radiosensitization of dna in solution," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 72, no. 1, pp. 128–134, 2009.
- [55] M. Hossain, Y. Luo, Z. Sun, C. Wang, M. Zhang, H. Fu, Y. Qiao, and M. Su, "X-ray enabled detection and eradication of circulating tumor cells with nanoparticles," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 38, no. 1, pp. 348–354, 2012.
- [56] N. Chattopadhyay, Z. Cai, Y. L. Kwon, E. Lechtman, J.-P. Pignol, and R. M. Reilly, "Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to x-radiation," *Breast cancer research and treatment*, vol. 137, no. 1, pp. 81–91, 2013.
- [57] W. Ngwa, H. Korideck, A. I. Kassis, R. Kumar, S. Sridhar, G. M. Makrigiorgos, and R. A. Cormack, "In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with i-125 brachytherapy seeds," *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 9, no. 1, pp. 25–27, 2013.
- [58] N. Chattopadhyay, H. Fonge, Z. Cai, D. Scollard, E. Lechtman, S. J. Done, J.-P. Pignol, and R. M. Reilly, "Role of antibody-mediated tumor targeting and route of administration in nanoparticle tumor accumulation in vivo," *Molecular pharmaceuticals*, vol. 9, no. 8, pp. 2168–2179, 2012.
- [59] L. Maggiorella, G. Barouch, C. Devaux, A. Pottier, E. Deutsch, J. Bourhis, E. Borghi, and L. Levy, "Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles," *Future Oncology*, vol. 8, no. 9, pp. 1167–1181, 2012.
- [60] J. F. Hainfeld, H. M. Smilowitz, M. J. O'Connor, F. A. Dilmanian, and D. N. Slatkin, "Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 10, pp. 1601–1609, 2013.
- [61] S.-Y. Jeong, S.-J. Park, S. M. Yoon, J. Jung, H. N. Woo, S. L. Yi, S. Y. Song, H. J. Park, C. Kim, J. S. Lee *et al.*, "Systemic delivery and preclinical evaluation of au nanoparticle containing  $\beta$ -lapachone for radiosensitization," *Journal of Controlled Release*, vol. 139, no. 3, pp. 239–245, 2009.
- [62] N. C. on Radiation Protection & Measurements (NCRP), "Biological effectiveness of low linear-energy transfer radiation as a function of energy," Tech. Rep., Not released.
- [63] F. Xiao, Y. Zheng, P. Cloutier, Y. He, D. Hunting, and L. Sanche, "On the role of low-energy electrons in the radiosensitization of dna by gold nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 46, p. 465101, 2011. [Online]. Available : <http://stacks.iop.org/0957-4484/22/i=46/a=465101>
- [64] J. Z. Xing, X. Yang, J. Chen, B. Huang, and W. Roa, "Electronic dynamic cellular sensor used to measure gold nanoparticles enhanced radiotherapy," pp. 20–23, 2011.
- [65] K. Butterworth, J. Coulter, S. Jain, J. Forker, S. McMahan, G. Schettino, K. Prise, F. Currell, and D. Hirst, "Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles : potential application for cancer therapy," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 29, p. 295101, 2010.
- [66] J. Hainfeld, F. Dilmanian, Z. Zhong, D. Slatkin, J. Kalef-Ezra, and H. Smilowitz, "Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma," *Physics in medicine and biology*, vol. 55, no. 11, p. 3045, 2010.

- [67] E. Porcel, S. Liehn, H. Remita, N. Usami, K. Kobayashi, Y. Furusawa, C. Le Sech, and S. Lacombe, "Platinum nanoparticles : a promising material for future cancer therapy?" *Nanotechnology*, vol. 21, no. 8, p. 085103, 2010.
- [68] W. N. Rahman, C. J. Wong, N. Yagi, R. Davidson, and M. Geso, "Dosimetry and its enhancement using gold nanoparticles in synchrotron based microbeam and stereotactic radiosurgery," vol. 1266, p. 107, 2010.
- [69] E. Brun, P. Duchambon, Y. Blouquit, G. Keller, L. Sanche, and C. Sicard-Roselli, "Gold nanoparticles enhance the x-ray-induced degradation of human centrin 2 protein," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 78, no. 3, pp. 177–183, 2009.
- [70] W. N. Rahman, N. Bishara, T. Ackerly, C. F. He, P. Jackson, C. Wong, R. Davidson, and M. Geso, "Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy," *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 136–142, 2009.
- [71] N. Withers, J. Plumley, N. Trino, K. Sankar, B. Akins, A. Rivera, G. Smolyakov, G. Timmins, and M. Osinski, "Scintillating-nanoparticle-induced enhancement of absorbed radiation dose," in *SPIE BiOS : Biomedical Optics*. International Society for Optics and Photonics, 2009, pp. 718 917–718 917.
- [72] C. Liu, C. Wang, C. Chien, T. Yang, S. Chen, W. Leng, C. Lee, K. Lee, Y. Hwu, Y. Lee *et al.*, "Enhanced x-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 29, p. 295104, 2008.
- [73] H. Kaur, G. Pujari, M. K. Semwal, A. Sarma, and D. K. Avasthi, "In vitro studies on radiosensitization effect of glucose capped gold nanoparticles in photon and ion irradiation of hela cells," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, no. 0, pp. –, 2013. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X13002450>
- [74] D. B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, M. van Prooijen, C. Allen, R. G. Bristow, R. P. Hill, and D. A. Jaffray, "Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy," *Radiation research*, vol. 173, no. 6, pp. 719–728, 2010.
- [75] C. Wang, X. Li, Y. Wang, Z. Liu, L. Fu, and L. Hu, "Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 15, no. 5, pp. 1–12, 2013.
- [76] L. Bobyk, M. Edouard, P. Deman, M. Vautrin, K. Pernet-Gallay, J. Delaroche, J.-F. Adam, F. Estève, J.-L. Ravanat, and H. Elleaume, "Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment," *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, no. 0, pp. –, 2013. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963413001792>
- [77] M. Alqathami, A. Blencowe, U. J. Yeo, R. Franich, S. Doran, G. Qiao, and M. Geso, "Enhancement of radiation effects by bismuth oxide nanoparticles for kilovoltage x-ray beams : A dosimetric study using a novel multi-compartment 3d radiochromic dosimeter," *Journal of Physics : Conference Series*, vol. 444, no. 1, p. 012025, 2013. [Online]. Available : <http://stacks.iop.org/1742-6596/444/i=1/a=012025>
- [78] D. Y. Joh, L. Sun, M. Stangl, A. Al Zaki, S. Murty, P. P. Santoiemma, J. J. Davis, B. C. Baumann, M. Alonso-Basanta, D. Bhang *et al.*, "Selective targeting of brain tumors with gold nanoparticle-induced radiosensitization," *PloS one*, vol. 8, no. 4, p. e62425, 2013.

- 
- [79] A. Briggs, S. Corde, S. Oktaria, R. Brown, A. Rosenfeld, M. Lerch, K. Konstantinov, and M. Tehei, "Cerium oxide nanoparticles : Influence of the high-z component revealed on radioresistant 9l cell survival under x-ray irradiation," *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, no. 0, pp. –, 2013. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963413000749>
- [80] W. N. Rahman, S. Corde, N. Yagi, S. A. A. Aziz, N. Annabell, and M. Geso, "Optimal energy for cell radiosensitivity enhancement by gold nanoparticles using synchrotron-based monoenergetic photon beams," *International journal of nanomedicine*, vol. 9, p. 2459, 2014.
- [81] S. Klein, M. L. Dell'Arciprete, M. Wegmann, L. V. Distel, W. Neuhuber, M. C. Gonzalez, and C. Krysch, "Oxidized silicon nanoparticles for radiosensitization of cancer and tissue cells," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 434, no. 2, pp. 217–222, 2013.
- [82] S. J. McMahon, M. H. Mendenhall, S. Jain, and F. Currell, "Radiotherapy in the presence of contrast agents : a general figure of merit and its application to gold nanoparticles," *Physics in medicine and biology*, vol. 53, no. 20, p. 5635, 2008.
- [83] S. H. Cho, B. L. Jones, and S. Krishnan, "The dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (gnrt) via brachytherapy using low-energy gamma-/x-ray sources," *Physics in medicine and biology*, vol. 54, no. 16, p. 4889, 2009.
- [84] B. L. Jones, S. Krishnan, and S. H. Cho, "Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by monte carlo calculations," *Medical physics*, vol. 37, no. 7, pp. 3809–3816, 2010.
- [85] R. I. Berbeco, W. Ngwa, and G. M. Makrigiorgos, "Localized dose enhancement to tumor blood vessel endothelial cells via megavoltage x-rays and targeted gold nanoparticles : new potential for external beam radiotherapy," *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, vol. 81, no. 1, pp. 270–276, 2011.
- [86] H. Garnica-Garza, "Treatment planning considerations in contrast-enhanced radiotherapy : energy and beam aperture optimization," *Physics in medicine and biology*, vol. 56, no. 2, p. 341, 2011.
- [87] E. Lechtman, N. Chattopadhyay, Z. Cai, S. Mashouf, R. Reilly, and J. Pignol, "Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location," *Physics in medicine and biology*, vol. 56, no. 15, p. 4631, 2011.
- [88] S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, G. Schettino, G. R. Dickson, A. R. Hounsell, and J. M. O'Sullivan, "Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 100, no. 3, pp. 412–416, 2011.
- [89] C. Perez-Lopez and H. Garnica-Garza, "Monte carlo modeling and optimization of contrast-enhanced radiotherapy of brain tumors," *Physics in medicine and biology*, vol. 56, no. 13, p. 4059, 2011.
- [90] J. C. Chow, M. K. Leung, and D. A. Jaffray, "Monte carlo simulation on a gold nanoparticle irradiated by electron beams," *Physics in medicine and biology*, vol. 57, no. 11, p. 3323, 2012.
- [91] W. Ngwa, G. M. Makrigiorgos, and R. I. Berbeco, "Gold nanoparticle enhancement of stereotactic radiosurgery for neovascular age-related macular degeneration," *Physics in medicine and biology*, vol. 57, no. 20, p. 6371, 2012.

- [92] A. Detappe, P. Tsiamas, W. Ngwa, P. Zygmanski, M. Makrigiorgos, and R. Berbeco, "The effect of flattening filter free delivery on endothelial dose enhancement with gold nanoparticles," *Medical physics*, vol. 40, no. 3, p. 031706, 2013.
- [93] H. Garnica-Garza, "Monte carlo modeling of converging small-field contrast-enhanced radiotherapy of prostate," *Physica Medica*, vol. 29, no. 5, pp. 493–499, 2013.
- [94] A. Mesbahi, F. Jamali *et al.*, "Effect of photon beam energy, gold nanoparticle size and concentration on the dose enhancement in radiation therapy," *BioImpacts : BI*, vol. 3, no. 1, p. 29, 2013.
- [95] P. Tsiamas, B. Liu, F. Cifter, W. F. Ngwa, R. I. Berbeco, C. Kappas, K. Theodorou, K. Marcus, M. G. Makrigiorgos, E. Sajo *et al.*, "Impact of beam quality on megavoltage radiotherapy treatment techniques utilizing gold nanoparticles for dose enhancement," *Physics in medicine and biology*, vol. 58, no. 3, p. 451, 2013.
- [96] S.-J. Tu, P.-Y. Yang, J.-H. Hong, and C.-J. Lo, "Quantitative dosimetric assessment for effect of gold nanoparticles as contrast media on radiotherapy planning," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 88, pp. 14–20, 2013.
- [97] P. J. Mohr, B. N. Taylor, and D. B. Newell, "Codata recommended values of the fundamental physical constants : 2010a)," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 41, no. 4, p. 043109, 2012.
- [98] Y. Fukumori and H. Ichikawa, "Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis," *Advanced powder technology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–28, 2006.
- [99] J. E. Martin, *Physics for radiation protection*. John Wiley & Sons, 2013.
- [100] L. C. Feldman and J. W. Mayer, "Fundamentals of surface and thin film analysis," *North Holland, Elsevier Science Publishers, P. O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands, 1986.*, 1986.
- [101] H. Xing, X. Zheng, Q. Ren, W. Bu, W. Ge, Q. Xiao, S. Zhang, C. Wei, H. Qu, Z. Wang *et al.*, "Computed tomography imaging-guided radiotherapy by targeting upconversion nanocubes with significant imaging and radiosensitization enhancements," *Scientific reports*, vol. 3, 2013.
- [102] S. B. Scarboro, D. S. Followill, R. M. Howell, and S. F. Kry, "Variations in photon energy spectra of a 6 mv beam and their impact on tld response," *Medical physics*, vol. 38, no. 5, pp. 2619–2628, 2011.
- [103] J. Meesungnoen, J.-P. Jay-Gerin, A. Filali-Mouhim, and S. Mankhetkorn, "Low-energy electron penetration range in liquid water," 2009.
- [104] S. Dufort, L. Sancey, and J.-L. Coll, "Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, no. 2, pp. 179–189, 2012.
- [105] W. Fan, B. Shen, W. Bu, X. Zheng, Q. He, Z. Cui, K. Zhao, S. Zhang, and J. Shi, "Design of an intelligent sub-50 nm nuclear-targeting nanotheranostic system for imaging guided intranuclear radiosensitization," *Chemical Science*, 2015.
- [106] N. Chattopadhyay, Z. Cai, J.-P. Pignol, B. Keller, E. Lechtman, R. Bendayan, and R. M. Reilly, "Design and characterization of her-2-targeted gold nanoparticles for enhanced x-radiation treatment of locally advanced breast cancer," *Molecular pharmaceuticals*, vol. 7, no. 6, pp. 2194–2206, 2010.
- [107] J. Conde, G. Doria, and P. Baptista, "Noble metal nanoparticles applications in cancer," *Journal of drug delivery*, vol. 2012, 2011.

- 
- [108] W. Chen, "Nanoparticle self-lighting photodynamic therapy for cancer treatment," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 4, no. 4, pp. 369–376, 2008.
- [109] Y. Liu, W. Chen, S. Wang, and A. G. Joly, "Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation," *Applied Physics Letters*, vol. 92, no. 4, p. 043901, 2008.
- [110] N. Y. Morgan, G. Kramer-Marek, P. D. Smith, K. Camphausen, and J. Capala, "Nanoscintillator conjugates as photodynamic therapy-based radiosensitizers : calculation of required physical parameters," *Radiation research*, vol. 171, no. 2, pp. 236–244, 2009.
- [111] J. P. Scaffidi, M. K. Gregas, B. Lauly, Y. Zhang, and T. Vo-Dinh, "Activity of psoralen-functionalized nanoscintillators against cancer cells upon x-ray excitation," *ACS nano*, vol. 5, no. 6, pp. 4679–4687, 2011.
- [112] C. Zhang, K. Zhao, W. Bu, D. Ni, Y. Liu, J. Feng, and J. Shi, "Marriage of scintillator and semiconductor for synchronous radiotherapy and deep photodynamic therapy with diminished oxygen dependence," *Angewandte Chemie*, 2014.
- [113] A.-L. Bulin, A. Vasil'Ev, A. Belsky, D. Amans, G. Ledoux, and C. Dujardin, "Modelling energy deposition in nanoscintillators to predict the efficiency of the x-ray-induced photodynamic effect," *Nanoscale*, vol. 7, no. 13, pp. 5744–5751, 2015.
- [114] S. Jain, J. A. Coulter, K. T. Butterworth, A. R. Hounsell, S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, G. R. Dickson, K. M. Prise, F. J. Currell, D. G. Hirst, and J. M. O'Sullivan, "Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 110, no. 2, pp. 342 – 347, 2014. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167814013006592>
- [115] W. Fan, B. Shen, W. Bu, F. Chen, K. Zhao, S. Zhang, L. Zhou, W. Peng, Q. Xiao, H. Xing, J. Liu, D. Ni, Q. He, and J. Shi, "Rattle-structured multifunctional nanotheranostics for synergetic chemo-/radiotherapy and simultaneous magnetic/luminescent dual-mode imaging," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, no. 17, pp. 6494–6503, 2013, pMID : 23574400. [Online]. Available : <http://dx.doi.org/10.1021/ja312225b>
- [116] W. Fan, B. Shen, W. Bu, F. Chen, Q. He, K. Zhao, S. Zhang, L. Zhou, W. Peng, Q. Xiao *et al.*, "A smart upconversion-based mesoporous silica nanotheranostic system for synergetic chemo-/radio-/photodynamic therapy and simultaneous mr/ucl imaging," *Biomaterials*, vol. 35, no. 32, pp. 8992–9002, 2014.
- [117] S. Agostinelli, J. Allison, K. a. Amako, J. Apostolakis, H. Araujo, P. Arce, M. Asai, D. Axen, S. Banerjee, G. Barrand *et al.*, "Geant4 : a simulation toolkit," *Nucl. Instrum. Meth. A.*, vol. 506, no. 3, pp. 250–303, 2003.
- [118] S. Jan, G. Santin, D. Strul, S. Staelens, K. Assie, D. Autret, S. Avner, R. Barbier, M. Bardies, P. M. Bloomfield, D. Brasse, V. Breton, P. Bruyndonckx, I. Buvat, A. F. Chatziioannou, Y. Choi, Y. H. Chung, C. Comtat, D. Donnarieix, L. Ferrer, S. J. Glick, C. J. Groiselle, D. Guez, P. F. Honore, S. Kerhoas-Cavata, A. S. Kirov, V. Kohli, M. Koole, M. Krieguer, D. J. van der Laan, F. Lamare, G. LARGERON, C. Lartizien, D. Lazaro, M. C. Maas, L. Maigne, F. Mayet, F. Melot, C. Merheb, E. Pennacchio, J. Perez, U. Pietrzyk, F. R. Rannou, M. Rey, D. R. Schaart, C. R. Schmittlein, L. Simon, T. Y. Song, J. M. Vieira, D. Visvikis, R. Van de Walle, E. Wieers, and C. Morel, "Gate : a simulation toolkit for pet and spect," *Phys Med Biol*, vol. 49, no. 19, pp. 4543–61, 2004, jan, S Santin, G Strul, D Staelens, S Assie, K Autret, D Avner, S Barbier, R Bardies, M Bloomfield, P M Brasse, D Breton, V Bruyndonckx, P Buvat, I Chatziioannou, A

- F Choi, Y Chung, Y H Comtat, C Donnarieix, D Ferrer, L Glick, S J Groiselle, C J Guez, D Honore, P F Kerhoas-Cavata, S Kirov, A S Kohli, V Koole, M Krieguer, M van der Laan, D J Lamare, F Largeron, G Lartizien, C Lazaro, D Maas, M C Maigne, L Mayet, F Melot, F Merheb, C Pennacchio, E Perez, J Pietrzyk, U Rannou, F R Rey, M Schaart, D R Schmittlein, C R Simon, L Song, T Y Vieira, J M Visvikis, D Van de Walle, R Wieers, E Morel, C eng CA-78573/CA/NCI NIH HHS/ CA059017-12/CA/NCI NIH HHS/ R01 EB001458-01A1/EB/NIBIB NIH HHS/ R01 EB001458-02/EB/NIBIB NIH HHS/ R01 EB001458-03/EB/NIBIB NIH HHS/ R01 EB001458-04/EB/NIBIB NIH HHS/ Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. England 2004/11/24 09 :00 Phys Med Biol. 2004 Oct 7;49(19) :4543-61. [Online]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15552416>
- [119] J. Allison, K. Amako, J. Apostolakis, H. Araujo, P. A. Dubois, M. Asai, G. Barrand, R. Capra, S. Chauvie, R. Chytraccek, G. A. P. Cirrone, G. Cooperman, G. Cosmo, G. Cuttone, G. G. Daquino, M. Donszelmann, M. Dressel, G. Folger, F. Foppiano, J. Generowicz, V. Grichine, S. Guatelli, P. Gumplinger, A. Heikkinen, I. Hrivnacova, A. Howard, S. Incerti, V. Ivanchenko, T. Johnson, F. Jones, T. Koi, R. Kokoulin, M. Kossov, H. Kurashige, V. Lara, S. Larsson, F. Lei, O. Link, F. Longo, M. Maire, A. Mantero, B. Mascialino, I. McLaren, P. M. Lorenzo, K. Minamimoto, K. Murakami, P. Nieminen, L. Pandola, S. Parlati, L. Peralta, J. Perl, A. Pfeiffer, M. G. Pia, A. Ribon, P. Rodrigues, G. Russo, S. Sadilov, G. Santin, T. Sasaki, D. Smith, N. Starkov, S. Tanaka, E. Tcherniaev, B. Tome, A. Trindade, P. Truscott, L. Urban, M. Verderi, A. Walkden, J. P. Wellisch, D. C. Williams, D. Wright, and H. Yoshida, "Geant4 developments and applications," *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, vol. 53, no. 1, pp. 270–278, 2006. [Online]. Available : <http://ieeexplore.ieee.org/xpl/articleDetails.jsp?arnumber=1610988>
- [120] M. D. Abramoff, "Image processing with imagej," *Biophotonics Int*, vol. 11, pp. 36–42, 2004. [Online]. Available : <http://ci.nii.ac.jp/naid/10021087487/en/>
- [121] R. Brun and F. Rademakers, "Root : An object oriented data analysis framework," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, vol. 389, no. 1-2, pp. 81–86, 1997. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016890029700048X>
- [122] G. A. Lewis, D. Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, 2005.
- [123] B. D. Ripley, "The r project in statistical computing," *MSOR Connections*, vol. 1, no. 1, pp. 23–25, 2001. [Online]. Available : <http://dx.doi.org/10.11120/msor.2001.01010023>
- [124] R. L. Plackett and J. P. Burman, "The design of optimum multifactorial experiments," *Biometrika*, pp. 305–325, 1946.
- [125] E. t. Clementi and D.-L. Raimondi, "Atomic screening constants from scf functions," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 38, no. 11, pp. 2686–2689, 1963.
- [126] J. Marill, N. M. Anesary, P. Zhang, S. Vivet, E. Borghi, L. Levy, and A. Pottier, "Hafnium oxide nanoparticles : toward an in vitro predictive biological effect ?" *Radiat. Oncol.*, vol. 9, no. 1, p. 150, 2014.
- [127] D. Rogers, B. Faddegon, G. Ding, C.-M. Ma, J. We, and T. Mackie, "Beam : A monte carlo code to simulate radiotherapy treatment units," *Med. Phys.*, vol. 22, no. 5, pp. 503–524, 1995.
- [128] R. Forster and T. Godfrey, *MCNP-a general Monte Carlo code for neutron and photon transport*. Springer, 1985.

- 
- [129] J. Baro, J. Sempau, J. Fernández-Varea, and F. Salvat, “Penelope : an algorithm for monte carlo simulation of the penetration and energy loss of electrons and positrons in matter,” *Nucl. Instrum. Meth. B.*, vol. 100, no. 1, pp. 31–46, 1995.
- [130] M. Kodiha, Y. M. Wang, E. Hutter, D. Maysinger, and U. Stochaj, “Off to the organelles-killing cancer cells with targeted gold nanoparticles,” *Theranostics*, vol. 5, no. 4, pp. 357–70, Jan 2015.
- [131] D. Strulab, G. Santin, D. Lazaro, V. Breton, and C. Morel, “Gate (geant4 application for tomographic emission) : a pet/spect general-purpose simulation platform,” *Nucl. Phys. B-Proc. Sup.*, vol. 125, pp. 75–79, 2003.
- [132] F. Verhaegen and J. Seuntjens, “Monte carlo modelling of external radiotherapy photon beams,” *Physics in medicine and biology*, vol. 48, no. 21, p. R107, 2003.
- [133] E. Lechtman, S. Mashouf, N. Chattopadhyay, B. Keller, P. Lai, Z. Cai, R. Reilly, and J. Pignol, “A monte carlo-based model of gold nanoparticle radiosensitization accounting for increased radiobiological effectiveness,” *Physics in medicine and biology*, vol. 58, no. 10, p. 3075, 2013.
- [134] G. X. Ding, “Energy spectra, angular spread, fluence profiles and dose distributions of 6 and 18 mv photon beams : results of monte carlo simulations for a varian 2100ex accelerator,” *Phys Med Biol*, vol. 47, no. 7, pp. 1025–46, 2002. [Online]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11996053>
- [135] K. T. Butterworth, S. J. McMahon, L. E. Taggart, and K. M. Prise, “Radiosensitization by gold nanoparticles : effective at megavoltage energies and potential role of oxidative stress,” *Translational Cancer Research*, vol. 2, no. 4, pp. 269–279, 2013.
- [136] S. J. McMahon, K. M. Prise, and F. J. Currell, “Comment on ‘implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location’,” *Physics in medicine and biology*, vol. 57, no. 1, p. 287, 2012.
- [137] J. Coulter, W. Hyland, J. Nicol, and F. Currell, “Radiosensitising nanoparticles as novel cancer therapeutics — pipe dream or realistic prospect?” *Clinical Oncology*, no. 0, pp. –, 2013. [Online]. Available : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0936655513002628>
- [138] D. R. Cooper, D. Bekah, and J. Nadeau, “Gold nanoparticles and their alternatives for radiation therapy enhancement,” *Frontiers in Chemistry*, vol. 2, no. 86, 2014. [Online]. Available : [http://www.frontiersin.org/chemical\\_engineering/10.3389/fchem.2014.00086/abstract](http://www.frontiersin.org/chemical_engineering/10.3389/fchem.2014.00086/abstract)
- [139] S. Jain, D. Hirst, and J. O’sullivan, “Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy,” *British Journal of Radiology*, vol. 85, no. 1010, pp. 101–113, 2012.
- [140] L. Štefančíková, E. Porcel, P. Eustache, S. Li, D. Salado, S. Marco, J.-L. Guerquin-Kern, M. Réfrégiers, O. Tillement, F. Lux *et al.*, “Cell localisation of gadolinium-based nanoparticles and related radiosensitising efficacy in glioblastoma cells,” *Cancer nanotechnology*, vol. 5, no. 1, pp. 1–15, 2014.
- [141] S. H. Cho and S. Krishnan, *Cancer Nanotechnology : Principles and Applications in Radiation Oncology*. CRC Press, 2013.
- [142] M. Martinov and R. Thomson, “Su-et-667 : Radiosensitization due to gold nanoparticles : A monte carlo cellular dosimetry investigation of an expansive parameter space,” *Medical physics*, vol. 42, no. 6, pp. 3490–3490, 2015.



- [143] S. Elzey, D.-H. Tsai, S. A. Rabb, L. Y. Lee, M. R. Winchester, and V. A. Hackley, “Quantification of ligand packing density on gold nanoparticles using icp-oes,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 403, no. 1, pp. 145–149, 2012.
- [144] L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, E. Thomas, B. van der Sanden, J.-P. Klein, B. Laurent, M. Cottier *et al.*, “Long-term in vivo clearance of gadolinium-based aguix nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection,” *ACS nano*, vol. 9, no. 3, pp. 2477–2488, 2015.
- [145] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “Nih image to imagej : 25 years of image analysis,” *Nature methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, 2012.
- [146] R. C. Team, “R : A language and environment for statistical computing. r foundation for statistical computing, vienna, austria, 2012,” 2014.

## Résumé

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse sont divisés en trois grandes parties qui concernent l'utilisation des nanoparticules métalliques pour augmenter les effets de la radiothérapie. Cette utilisation très particulière des nanoparticules n'a fait l'objet, jusqu'à présent, que d'études précliniques sauf un nano-objet qui fait actuellement l'objet de phases cliniques I et II à l'Institut Gustave Roussy de Villejuif, France. La première partie est une recherche bibliographique qui s'est concrétisée par la parution d'un état de l'art dans une revue internationale. Ce dernier identifie les paramètres jouant un rôle clef dans l'augmentation de la radiothérapie par les nanoparticules. Suite à cette étude de la littérature, le constat a été fait que la recherche préclinique en nanomédecine est plus longue et plus onéreuse que celle qui s'intéresse aux objets (macro-molécules) de taille standard. C'est pour améliorer cette prise en charge préclinique qu'une plateforme informatique de simulation Monte-Carlo des interactions nanoparticules – rayons X a été développée. Cette dernière ayant pour objectif de réaliser un classement *in silico* rapide et fiable des nanoparticules radiosensibilisantes permettant d'identifier de façon efficiente les nanostructures présentant les propriétés les plus prometteuses. La seconde partie de cette thèse consiste en une analyse de robustesse de ce simulateur, visant à identifier les paramètres de variabilité intrinsèques au simulateur et à quantifier leur influence sur la variation des résultats. Trois paramètres ont été identifiés comme paramètres critiques de simulation et doivent être maintenus constants entre les différentes études. Enfin, une troisième partie traite de l'application de cet outil de simulation au screening virtuel de nanoparticules radiosensibilisantes. Dans cette partie sont réalisées une analyse de prédiction *in silico* / *in vitro* et une analyse de prédiction *in silico* / *in cellulo*. Les résultats très encourageants (correspondance acceptable entre les prédictions du simulateur et les résultats *in cellulo*) obtenus durant cette dernière phase ont également fait l'objet d'une soumission à publication dans une revue internationale.

**Mots-clés:** Nanoparticules, cancer, radiothérapie, modélisation.

## Abstract

The work that has been carried out during this PhD thesis is divided into three main parts that are related to the use of metallic nanoparticles to enhance the effects of radiation therapy. Until now, this particular use of nanoparticles has only been limited to preclinical trials apart from a single nano-object which is currently tested in phases I and II clinical trials in the Institut Gustave Roussy of Villejuif, France. The first part of this study is a bibliographic research that has been published as a review article in an international journal. The latter identifies the key parameters responsible for the enhancement of radiation therapy by nanoparticles. Following this part, the observation was made that the preclinical research in nanomedicine is longer and more expensive than for classical macromolecules. That is why, in order to improve this preclinical step, a Monte Carlo simulation platform of nanoparticles – X rays interactions has been developed. The aim of this platform is to perform a quick and reliable *in silico* ranking of radiosensitizing nanoparticles in order to efficiently identify the nanostructures with the most promising properties. The second part of this thesis consists of a robustness analysis of the latter simulator, aiming to identify its intrinsic variability parameters and to quantify their influence on the variability of the results. Three parameters have been identified as critical simulation parameters and should be kept constant between studies. Finally, a third part deals with the application of the simulation platform to the virtual screening of radiosensitizing nanoparticles. A predictive *in silico* / *in vitro* and *in silico* / *in cellulo* analysis are carried out in this section. Promising

results (acceptable matching between simulator's predictions and *in cellulo* results) obtained during this last phase were also submitted for publication in an international journal.

**Keywords:** Nanoparticles, cancer, radiation therapy, computer modeling.