

Résumé Lors de ces dix dernières années, les activités de l'équipe iRiBio (*Interactions Rayonnements Ionisants et Biologie*) se sont appuyées sur le développement de techniques innovantes d'analyse, d'imagerie et d'irradiation par faisceaux d'ions focalisés afin de répondre à des applications fondamentales à l'interface avec la physique, la biologie, la chimie du vivant et de la santé. Depuis quelques années, l'aboutissement de ces développements techniques permettent d'envisager la mise en place de programmes de recherche dont les thématiques intrinsèquement transdisciplinaires reposent sur les interactions rayonnement ionisants et le vivant, soit en les **utilisant pour comprendre les mécanismes de régulation de l'homéostasie du vivant**, soit en tant que telles **en étudiant les réponses biologiques radio-induites en conditions d'expositions contrôlées en termes de dose et de cible biologique**.

Faits marquants scientifiques de l'équipe iRiBio

- Le 4^{ème} article de revue de la collaboration Geant4-DNA, focalisé sur les modèles physiques et les exemples d'applications. Geant4-DNA est le seul code ouvert proposant de tels modèles avec sa première application complète utilisant l'approche IRT (radiolyse) pour la simulation des dommages précoces à l'ADN induits par les RI et les premiers modèles pour la simulation des structures de trace des électrons dans l'or.
- Le développement de détecteurs minces et applications à l'irradiation cellulaire contrôlée en dose (alpha, proton) (DIADEM)
- La réalisation des premières micro-irradiations sélectives de cellules spécifiques au sein d'un organisme multicellulaire en développement et suivi *in situ* et en temps réel des dommages radio-induits.

Publications

- > 90 publications sur la période 2015-2021

Composition actuelle de l'équipe

L'équipe iRiBio est une équipe de recherche transdisciplinaire constituée de 8 membres permanents (physiciens, chimistes et biologistes) dont 5 titulaires de l'HDR et un membre titulaire de l'ADT rattachées aux écoles doctorales « Sciences Physiques et de l'Ingénieur » et « Sciences de la Vie et de la Santé » de l'université de Bordeaux.

Trois nouvelles arrivées de personnels permanents sont à noter sur mobilité interne au laboratoire, procédure FSEP (IR BAP A, 2020) et sur concours externe (IR BAP E, 2021)

Sur la période 2015-2021, l'équipe a accueilli 4 chercheurs post-doctorants (physiciens, biologiste) et 10 doctorants (physiciens, biologiste, médecin)¹.

Permanent.e.s	
Philippe Barberet (Mdc, HDR)	<i>Philippe Moretto (Pr, HDR)*²</i>
Franck Gobet (Pr, HDR)	Sébastien Incerti (DR, HDR, <i>DAS In2P3</i>)* ³
Claire Michelet (Mdc, ADT)	Hervé Seznec (CR, HDR)
ITA	
Guillaume Devès (IR BAP B)	<i>Hoang Tran (IR BAP E, <u>recrutement 2021</u>)</i>
Laurent Plawinski (IR BAP A)(<i>FSEP 2020</i>)	
Chercheur.e.s Post doctorant.e.s	
Hoang Tran (2020-2021), Zein Sara (2019-2021), Dosatsu Sakata (2016-2017), Marina Simon (2015-2017)	

Tableau récapitulatif des membres permanents et non-permanents sur la période 2015-2021)

Contexte, Travaux antérieurs et stratégies

Comme son nom l'indique, l'équipe iRiBio développe des programmes de recherches basés sur les interactions des rayonnements ionisants avec la matière vivante. Nos activités peuvent se décliner selon deux principes : **(i) exploiter ces interactions pour comprendre l'organisation et les grandes fonctions physiologiques qui régissent les êtres vivants, (ii) modéliser/étudier ces interactions et les réponses biologiques radio-induites au sein d'organismes vivants en conditions *in vitro* et *in vivo*.**

Nos approches se veulent multi-échelles car elles se déclinent à l'échelle de la molécule (ADN génomique, approche mésoscopique), de la cellule (saines *versus* cancéreuses), de l'organisme aux populations (nématode *Caenorhabditis elegans*) et multi-dimensions (imagerie tridimensionnelle, analyse *in-cellulo* dynamique et cinétique en temps réel).

L'équipe iRiBio s'appuie sur le développement, l'optimisation et l'exploitation de techniques d'analyse chimique, d'imagerie et d'irradiation par faisceaux d'ions focalisés à l'échelle sub-micrométrique afin de répondre à des questions fondamentales à l'interface avec la biologie, la physique des rayonnements ionisants et la chimie du vivant. Dans le cadre de ces développements expérimentaux, l'équipe iRiBio s'appuie et interagit au quotidien avec l'ensemble des services techniques du CENBG (service instrumentation, bureau d'études et service mécanique, service informatique, administration, communication).

Notre équipe est également étroitement associée aux activités techniques et scientifiques de la plateforme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine)

¹ Doctorant.e.s : Zhuxin Li (2019-2022), Beaudier Pierre (2019-2022), Wook-Geun Shin (2017-2020), Eva Torfeh (2016-2019), Nicolas Tang (2016-2019), Nathanael Lampe (2014-2017), Julien Bordes (2014-2017), Giovanna Muggiolu (2013-2016), Sylvain Meylan (2013-2016), Florent Villotte (2017, thèse de médecine)

² Vice-Résidence Recherche Univ. Bordeaux (*)

³ Directeur -Adjoint Scientifique in2P3 (*)

en tant que développeurs, utilisateurs, responsable scientifique et membre du comité « utilisateurs »⁴.

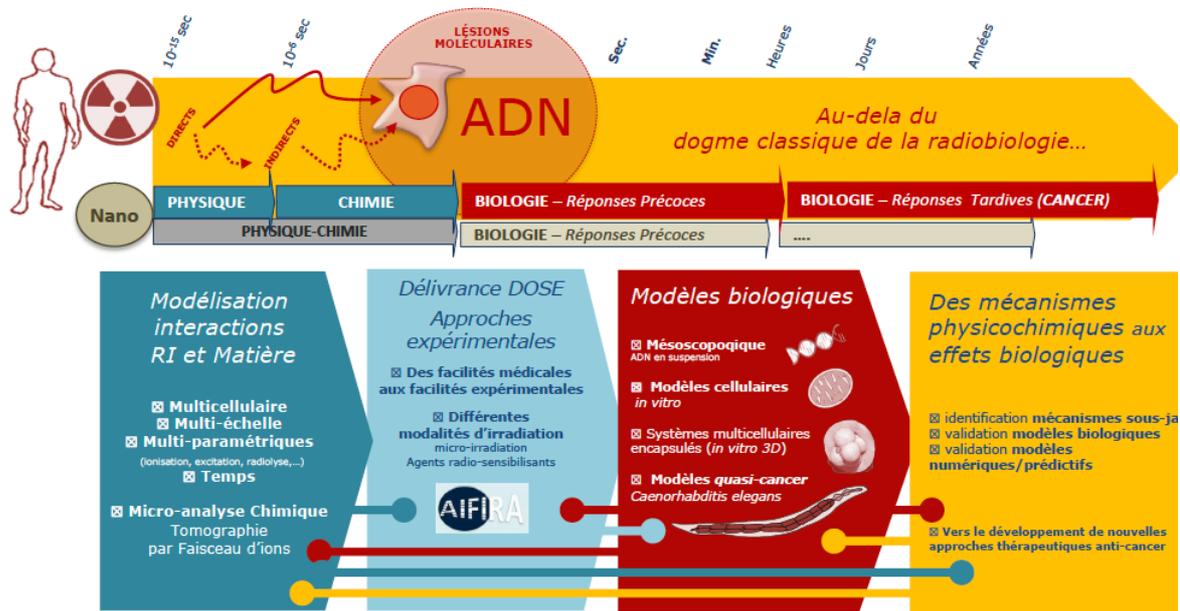


Figure de synthèse de la stratégie et des objectifs de l'équipe iRiBio

En matière d'enseignement, l'équipe iRiBio est associée à l'école doctorale Sciences Physiques et de l'Ingénieur (SPI) et l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (SVS) de l'Université de Bordeaux. Les 4 enseignants-chercheurs de l'équipe sont fortement impliqués dans les formations universitaires avec notamment leur participation à la création et aux responsabilités de formations en ingénierie de la physique des rayonnements ionisants.

Les membres de l'équipe iRiBio sont fortement impliqués dans la formation par la recherche avec la direction de l'école doctorale Sciences Physiques et de l'Ingénieur, la responsabilité du Cours Master en Ingénierie (CMI) « Physique : rayonnements et instrumentation », du master Master Instrumentation Nucléaire, de la formation en alternance du Master et du CMI et des stages de spécialisation du Master Instrumentation Nucléaire.

iRiBio propose également une formation à l'outil de simulation numérique Geant4 pour les étudiants des master "Instrumentation Nucléaire", "Noyau, Plasma, Univers (NPU)" et du CMI.

⁴ Barberet, P., Jouve, J., Sorieul, S., Alfaut, P. & Mathieu, L. AIFIRA: a light ion beam facility for ion beam analysis and irradiation. Eur. Phys. J. Plus 136, 67 (2021).

A. L'utilisation des rayonnements ionisants pour comprendre l'organisation et les fonctions physiologiques qui régissent l'homéostasie chez les êtres vivants

Contributeurs : P. Barberet, G. Devès, C. Michelet, L. Plawinski, H. Seznec, plateforme AIFIRA

Vers la définition des mécanismes d'interactions entre nanoparticules d'oxydes métalliques et l'évaluation de perspectives thérapeutiques anticancéreuses

Dans le domaine de la nanomédecine et de la nanotoxicologie se pose la question de la détection, de la quantification et du devenir des nanoparticules au sein des organismes biologiques. Il est donc essentiel de préciser les mécanismes impliqués dans ces processus de toxicité et de les caractériser au sein de modèles biologiques *in vitro* et *in vivo*. Ces données sont essentielles dans la perspective de l'évaluation d'approches thérapeutiques émergentes combinant rayonnements ionisants et nanoparticules d'oxydes métalliques.

Nous avons validé une méthode de micro-analyse quantitative et d'imagerie corrélative multimodale qui se résume à analyser les mêmes échantillons cellulaires en microscopie de fluorescence, microscopie électronique et par micro-analyse chimique par faisceaux d'ions afin de définir précisément **(i)** l'accumulation et la distribution intracellulaire de nanoparticules d'oxydes de métalliques (Fig.1) ; **(ii)** les mécanismes de toxicité de ces nanoparticules ; **(iii)** leur devenir au sein de modèles biologiques d'intérêt^{5,6}.

Enfin, nos expertises dans les domaines : **(i)** de la microdosimétrie (simulation - modélisation Monte Carlo), **(ii)** de la radiobiologie expérimentale (irradiation cellulaire), **(iii)** de la toxicologie et micro-analyse chimique multi-élémentaire ont été combinées afin d'évaluer la radiosensibilité de lignées cancéreuses issues de patients dont les corrélations génotypes/phénotypes ont été établies et d'évaluer le potentiel radio-potentialisant ou radio-sensibilisant de nanoparticules d'oxydes métalliques d'intérêt (dioxyde de titane).

Pour exemple, des outils de simulation adaptés ont été développés afin de modéliser de manière réaliste les dépôts d'énergie et de dose à l'échelle cellulaire lors d'irradiation. La mise au point de fantômes cellulaires (nommés ainsi par analogie avec les fantômes utilisés en radiothérapie) par imagerie confocale et la modélisation détaillée de nos dispositifs d'irradiation à l'aide de Geant4 nous a permis de caractériser au mieux les processus physiques mis en jeu à l'échelle submicronique. De plus, l'intégration de la composition chimique et notamment de la distribution et quantification à l'échelle cellulaire de composés exogènes tels que des nanoparticules nous a permis d'affiner les processus d'interactions physico-chimiques

⁵ Muggioli G, Simon M, Lampe N, Devès G, Barberet P, Michelet C, Delville MH, Seznec H. In Situ Detection and Single Cell Quantification of Metal Oxide Nanoparticles Using Nuclear Microprobe Analysis. J Vis Exp. 2018 Feb 3;(132). doi: 10.3791/55041.

⁶ Le Trequesser, Q.; Saez, G.; Simon, M.; Devès, G.; Daudin, L.; Barberet, P.; Michelet, C.; Delville, M. H.; Seznec, H. Multimodal correlative microscopy for in situ detection and quantification of chemical elements in biological specimens. Applications to nanotoxicology. Journal of Chemical Biology. 8(4):159-167

dans le cadre de l'évaluation de ces protocoles émergents de radiothérapie associant rayonnements ionisants et nanoparticules.

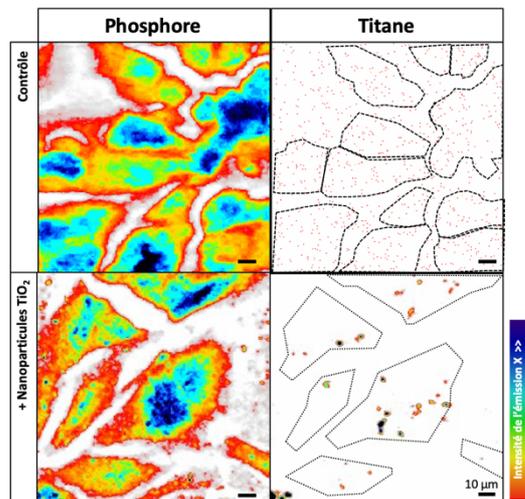


Figure 1: Micro-analyse chimique quantitative à l'échelle de la cellule unique. Distribution spatiale du phosphore et du titane dans des cellules cancéreuses (sarcome) cultivées en présence de nanoparticules de TiO₂ (2 µg.cm⁻²) obtenues par la méthode d'analyse chimique multi-élémentaire (PIXE). La distribution du phosphore est utilisée comme un marqueur cellulaire permettant l'identification individuelle des cellules. Cette détection et quantification des nanoparticules de dioxyde de titane de manière différenciée pour chaque cellule nous a permis de mettre en évidence des effets de seuil minimal d'exposition nécessaires pour induire un stress cellulaire observable au travers de la dérégulation de l'homéostasie calcique.

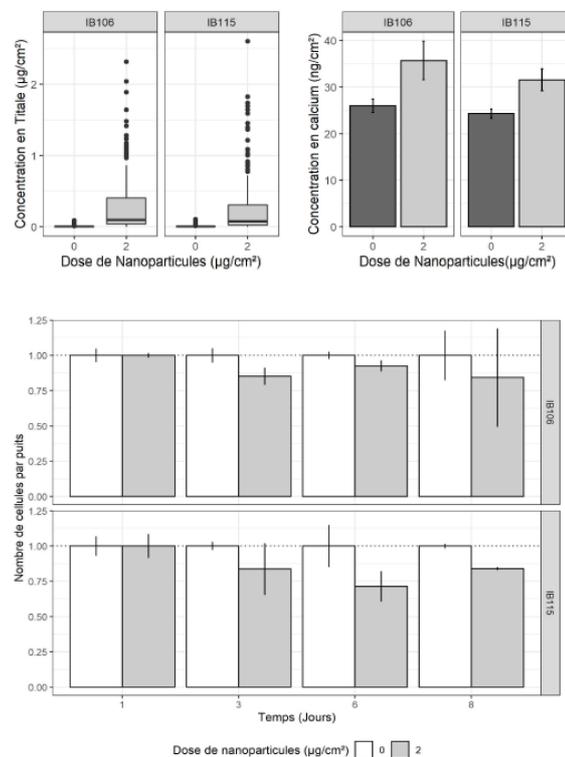


Figure 2: Effets des nanoparticules sur la concentration en calcium et la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses (sarcomes). Les diagrammes du haut montrent respectivement les concentrations en titane et calcium au sein des cellules en fonction de la condition : contrôle ou exposées à des nanoparticules de dioxyde titane à 2 µg.cm⁻². L'augmentation du calcium n'est observée que dans les cellules exposées aux nanoparticules pour les 2 lignées cancéreuses issues de patients atteints de sarcome (lignées IB106 et IB115). La figure du bas montre l'impact de la présence des nanoparticules sur la prolifération des cellules à 1, 3, 6 et 8 jours après exposition. Le nombre de cellules exposées aux nanoparticules est inférieur à celui des cellules dites « contrôles » aux jours 3, 6 et 8 (normalisation par rapport au contrôle du jour correspondant). La présence des nanoparticules dans les cellules impacte donc leur capacité à proliférer.

Nos travaux ont ainsi permis d'identifier une relation entre le niveau d'internalisation des nanoparticules et l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Fig.2). Cette altération de l'homéostasie calcique est étroitement associée au niveau de toxicité de la nanoparticule dépendant de sa forme et de sa réactivité de surface ainsi que de la quantité internalisée⁷.

Ces travaux ont été financés dans les cadres du programme européen SPRITE (*Initial Training Network Marie Curie*), des programmes régionaux POPRA et POPRA 2 financés par le Conseil Régional Nouvelle Aquitaine, du programme du « Défi Nano » de la Mission Interdisciplinaire

⁷ Simon M, Saez G, Muggioli G, Lavenas M, Le Trequesser Q, Michelet C, Devès G, Barberet P, Chevet E, Dupuy D, Delville MH, Sez nec H. In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity. *Nanotoxicology*. 2017 Feb;11(1):134-145. doi: 10.1080/17435390.2017.1278803

du CNRS et ont été réalisés dans le cadre de collaboration avec le Centre Régional de lutte contre le Cancer de Bordeaux (Pr G. Kantor, Institut Bergonié), l'unité VINCO (U916, INSERM, Institut Bergonié) et INC/CNRS (de l'équipe de M-H. Delville). L'ensemble des protocoles sont également mis à la disposition de la communauté AIFIRA^{5,8}.

Pendant cette période, 4 articles dans des journaux à comité de lecture ont été publiés et 2 thèses de Sciences (Biologie, Physique) et une thèse de médecine ont été dédiées à ce sujet.

Tomographie par faisceau d'ions : de la cellule unique à l'organisme multicellulaire

L'équipe iRiBio explore continuellement de nouvelles approches d'imagerie protonique pour le vivant (cellules en culture, microorganismes). Le développement des techniques d'imagerie protonique 3D par tomographie donne accès à une information quantitative : d'une part elle révèle la structure des échantillons, par mesure de la masse (densitométrie), information provenant de l'analyse du spectre en énergie obtenu en transmission (*STIM : Scanning Transmission Ion Microscopy*). D'autre part, la composition chimique élémentaire de la région sous faisceau est obtenue grâce à l'analyse du spectre d'émission X induit (*PIXE : Particle Induced X-ray Emission*)⁹.

Deux domaines de recherche sont explorés : (i) la nanotoxicologie, (ii) l'optimisation d'approches thérapeutiques anticancéreuses associant irradiation proton (protonthérapie) et nanoparticules métalliques (approche théranostique). D'un point de vue méthodologique, il s'agit d'une part de détecter et de localiser les nanoparticules à l'échelle cellulaire par leur signature chimique, et d'autre part de les quantifier *in situ*. Les méthodes d'imagerie protonique 3D par tomographie sont indispensables pour compléter l'approche « classique » en imagerie 2D car elles donnent accès à une localisation à l'intérieur des structures sondées. Une modélisation sous Geant4 du dispositif expérimental a été développée¹⁰. Des fantômes de référence, dont un modèle de *Caenorhabditis elegans*, ont été définis pour évaluer l'effet des méthodes de reconstruction utilisées. Le but est d'évaluer la précision de la reconstruction, en particulier de tester l'efficacité des méthodes de correction d'atténuation du signal employées¹¹.

⁸ Devès, G.; Daudin, L.; Bessy, A.; Buga, F.; Ghanty, J.; Naar, A.; Sommar, V.; Michelet, C.; Seznec, H.; Barberet, P. An ImageJ plugin for ion beam imaging and data processing at AIFIRA facility . *Nuclear Microprobe Technology and Applications*, Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B 348:62-67

⁹ Michelet, C.; Barberet, P.; Moretto, P.; Seznec, H. Development and applications of STIM- and PIXE-tomography: A review. *In 14th International Conference on Particle Induced X-ray Emission*, Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B 15 November 2015 363:55-60. doi: 10.1016/j.nimb.2015.08.070

¹⁰ Michelet C, Li Z, Yang W, Incerti S, Desbarats P, Giovannelli JF, Barberet P, Delville MH, Gordillo N, Devès G, Seznec H. A Geant4 simulation for three-dimensional proton imaging of microscopic samples. *Phys Med*. 2019 Sep 5;65:172-180. doi: 10.1016/j.ejmp.2019.08.022.

¹¹ Michelet, C.; Barberet, P.; Desbarats, P.; Giovannelli, J.-F.; Schou, C.; Chebil, I.; Delville, M.-H.; Gordillo, N.; Beasley, D.G.; Devès, G.; Moretto, P.; Seznec, H. An implementation of the NiftyRec medical imaging library for PIXE-tomography reconstruction. *In Proceedings of the 15th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications*, Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B 1 August 2017 404:131-139 doi : 10.1016/j.nimb.2017.01.067

Ces travaux ont été menés en collaboration avec l'équipe « Image et Son » du LaBRI (P. Desbarats) et groupe « Signal-Image » de l'IMS (J.-F. Giovannelli) et ont été financés par les programmes « Défi Imag'In » de la MITI du CNRS (projets NUMÉTRIX en 2018 et PROTON3D en 2016). Une thèse sur le sujet est actuellement financée par le *China Scholarship Council*.

B. L'utilisation des interactions des rayonnements ionisants avec le Vivant afin de prédire, quantifier et analyser les conséquences biologiques radio-induites

Contributeurs : P. Barberet, G. Devès, F. Gobet, S. Incerti, C. Michelet, L. Plawinski, H. Seznec, plateforme AIFIRA

Simulations Monte Carlo Geant 4/Geant4-DNA à l'interface Physique-Médecine-Biologie

L'équipe iRiBio a coordonné sur la période 2008-2019 le développement de la physique électromagnétique de basse énergie de l'outil Monte Carlo généraliste « Geant4 » (<http://geant4.org>)¹², et coordonne depuis 2008 son extension « Geant4-DNA » vers la radiobiologie (<http://geant4-dna.org>)¹³. Ces deux outils, totalement ouverts et accessibles à tous, sont développés par deux collaborations internationales. Au cours des cinq dernières années et au sein de ces deux collaborations, nos efforts se sont principalement concentrés sur l'amélioration des modèles décrivant les interactions élastiques et inélastiques des électrons dans l'eau liquide, la molécule d'ADN et dans l'or afin de simuler les structures de traces dans ces deux milieux. La possibilité de simuler les interactions élémentaires des électrons dans l'or est une fonctionnalité qui revêt tout son intérêt pour les études de radio-sensibilisation induite par nanoparticules d'or¹⁴. Les interactions élémentaires des électrons ont également été étendues aux 4 bases de l'ADN en utilisant les sections efficaces du code de référence CPA100¹⁵. Nous avons également implémenté la simulation des cascades de désexcitation atomiques (émission Auger et fluorescence)¹⁶. La possibilité de simuler la radiolyse de l'eau de Geant4-DNA a été intégrée depuis la version *Geant4.10.1*. Depuis nos efforts se sont concentrés sur l'amélioration et l'optimisation de la performance de la simulation (approche

¹² Allison *et al.* Recent developments in Geant4 Nucl. Instrum. Meth. A 835 (2016) 186-225

¹³ Incerti, S.; Kyriakou, I.; Bernal, M.A.; Bordage, M.C.; Francis, Z.; Guatelli, S.; Ivanchenko, V.; Karamitros, M.; Lampe, N.; Lee, S.B.; Meylan, S.; Min, C.H.; Shin, W.G.; Nieminen, P.; Sakata, D.; Tang, N.; Villagrasa, C.; Tran, H.N.; Brown, J.M.C. Geant4-DNA example applications for track structure simulations in liquid water: A report from the Geant4-DNA Project. Med. Phys. 45 (2018) e722-e739. doi: 10.1002/mp.13048

¹⁴ Sakata D, Kyriakou I, Okada S, Tran HN, Lampe N, Guatelli S, Bordage MC, Ivanchenko V, Murakami K, Sasaki T, Emfietzoglou D, Incerti S. Geant4-DNA track-structure simulations for gold nanoparticles: The importance of electron discrete models in nanometer volumes. Med Phys. 2018 May;45(5):2230-2242. doi: 10.1002/mp.12827.

¹⁵ Zein S. A., Bordage M.-C., Francis Z., Macetti G., Genoni A., Dal Capello C., Shin W.-G., Incerti S. Electron transport in DNA bases: An extension of the Geant4-DNA Monte Carlo toolkit, Nucl. Instrum. Meth. B 488 (2021). Doi:10.1016/j.nimb.2020.11.021

¹⁶ Incerti S, Douglass M, Penfold S, Guatelli S, Bezak E. Review of Geant4-DNA applications for micro and nanoscale simulations. Phys Med. 2016 Oct;32(10):1187-1200. doi: 10.1016/j.ejmp.2016.09.007. Review.

pas-à-pas)¹⁷ et sur l'implémentation d'une nouvelle approche alternative pour la simulation de la radiolyse de l'eau (l'approche IRT)¹⁸, beaucoup plus efficace que l'approche pas-à-pas. Récemment, dans le cadre du projet MAGIC sur la radiothérapie FLASH au sein d'une collaboration établie avec le Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV, Lausanne), nous avons développé une nouvelle approche de simulation qui nous permet non seulement de simuler de nombreuses espèces chimiques en condition de radiothérapie FLASH, mais aussi d'étendre la simulation chimique à des temps plus longs, jusqu'à l'état stationnaire¹⁹.

Des géométries de cibles biologiques simplifiées (bactérie *E. coli*, noyaux cellulaires) ont également été développées afin de construire deux chaînes de simulation complètes (combinant physique, radiolyse, géométries) permettant de prédire l'induction de dommages biologiques directs et indirects précoces à l'échelle de l'ADN (Fig. 3)^{20,21,22}. Le développement de ces deux chaînes représente l'aboutissement de dix ans de travail au sein de la collaboration Geant4-DNA. D'autres plateformes utilisateurs, comme GATE ou TOPAS/TOPAS-nBio utilisent désormais certains de ces développements.

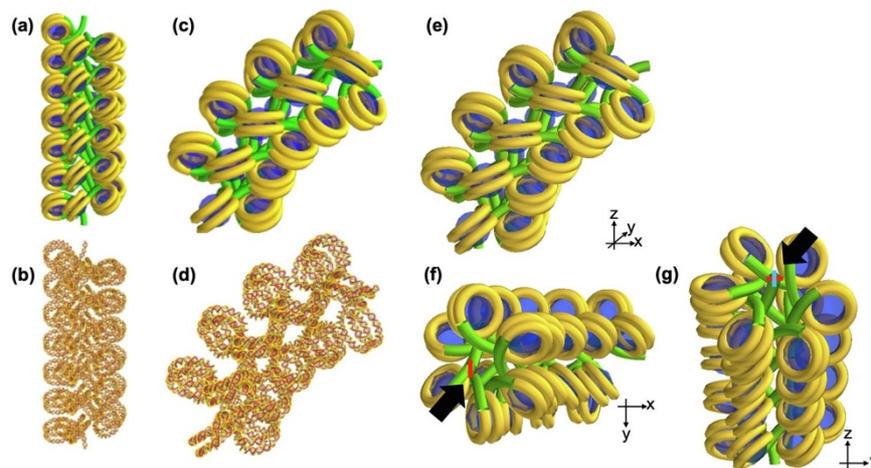


Figure 3 : Modèles de géométries d'ADN développés au CENBG, se composant de segments de chromatine droits (a), tournés (c) et tournés-torsadés (e). A un niveau élevé (a, c, e), les segments de chromatine sont constitués d'une série d'histones (ADN marqué en jaune, noyau protéique représenté en bleu). La structure détaillée des segments droits et tournés est également montrée (b, d), avec des lignes jaunes joignant les molécules de phosphate et des lignes rouges joignant les molécules de sucre. La direction de rotation de la fibre d'ADN au début dans les segments tournés et torsadés est indiquée par la ligne rouge (f). La direction de rotation de la fibre d'ADN à la fin du segment tourné est représentée par une ligne rouge et la direction du segment de torsion tourné est représentée par une ligne bleue (g).

¹⁷ Shin W.-G., Ramos-Mendez J., Faddegon B., Tran H. N., Villagrasa C., Perrot Y., Okada S., Karamitros M., Emfietzoglou D., Kyriakou I., Bordage M. C., Sakata D., Guatelli S., Choi H. J., Min C. H., Lee S. B., Incerti S. Evaluation of the influence of physical and chemical parameters on water radiolysis simulations under MeV electron irradiation using Geant4-DNA, *J. Appl. Phys.* 125 (2019). doi:10.1063/1.5107511

¹⁸ Ramos-Mendez J., Shin W.-G., Domínguez-Kondo J., Incerti S., Tran H., Villagrasa C., Perrot Y., Stepan V., Karamitros M., Okada S., Moreno-Barbosa E., Faddegon B. Independent Reaction Times method in Geant4-DNA: implementation and performance, *Med. Phys.* 47 (2020). Doi:10.1002/mp.14490

¹⁹ Tran H. N., Chappuis F., Incerti S., Bochud F., Desorgher L. Geant4-DNA modeling of water radiolysis beyond the microsecond : an on-lattice stochastic approach, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). Doi:10.3390/ijms22116023

²⁰ Meylan S, Incerti S, Karamitros M, Tang N, Bueno M, Clairand I, Villagrasa C. Simulation of early DNA damage after the irradiation of a fibroblast cell nucleus using Geant4-DNA. *Sci Rep.* 2017 Sep 20;7(1):11923. doi: 10.1038/s41598-017-11851-4.

²¹ Lampe N, Karamitros M, Breton V, Brown JMC, Sakata D, Sarramia D, Incerti S. Mechanistic DNA damage simulations in Geant4-DNA Part 2: Electron and proton damage in a bacterial cell. *Phys Med.* 2018 Apr;48:146-155. doi: 10.1016/j.ejmp.2017.12.008.

²² Sakata D, Kyriakou I, Okada S, Tran HN, Lampe N, Guatelli S, Bordage MC, Ivanchenko V, Murakami K, Sasaki T, Emfietzoglou D, Incerti S. Geant4-DNA track-structure simulations for gold nanoparticles: The importance of electron discrete models in nanometer volumes. *Med Phys.* 2018 May;45(5):2230-2242. doi: 10.1002/mp.12827.

En parallèle, en collaboration avec le Laboratoire d'astrophysique de Bordeaux, l'Institut des biomolécules Max Mousseron et leurs collègues, nous nous sommes aussi impliqués dans l'étude (simulations, expériences) de la résistance aux radiations d'échantillons de biopuces (aptamères, anticorps) pour l'exobiologie, avec notamment l'envoi d'échantillons à bord de la Station spatiale Internationale (mission EXPOSE-R2)²³.

Depuis 2015, 78 articles publiés dans des journaux à comité de lecture et 5 thèses ont été dédiés à ces sujets. Nous avons bénéficié de plusieurs soutiens budgétaires notamment du CNRS, de l'université de Bordeaux, de l'Agence spatiale européenne (ESA), de l'*Australian Research Council* et du *National Swiss Fund*.

Étude *in situ* et en temps réel de la fragmentation radio-induite de l'ADN (INSIDE)

Le projet INSIDE (« *In Situ Detection of DNA-fragmentation induced by proton collision* »), initié en 2019, vise à mesurer des probabilités de fragmentation simple et double brin de l'ADN en solution dans une couche d'eau d'épaisseur micrométrique pour des dépôts d'énergie contrôlés en dose, dans le temps et dans l'espace (Fig.4). Ces mesures sur des modèles physiques simples seront à terme comparées avec des calculs Geant4-DNA afin de répondre à plusieurs questions : (i) quelle fluence minimale de protons génère des brisures doubles brins pour un paramètre d'impact donné ? (ii) à quelle distance de l'ADN des effets indirects continuent-ils de jouer un rôle dans la fragmentation de la macromolécule en solution aqueuse ? (iii) la fragmentation d'ADN est-elle induite par un effet cumulatif de dépôt d'énergie ou est-ce un processus stochastique ne faisant intervenir qu'une ou quelques particules incidentes ?

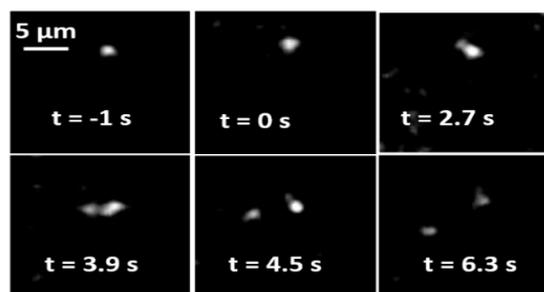


Figure 4 : Détection *in situ* et en temps réel de la fragmentation radio-induite d'ADN de bactériophage T4 en suspension aqueuse (proton, 3 MeV).

Pour répondre à ces questions, nous avons développé des techniques d'observation *in situ* de la dynamique de fragmentation de l'ADN irradié et identifier de premières observables expérimentales (Fig.4). Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des techniques de vidéo-microscopie par fluorescence couplées à la microsonde nucléaire de la plateforme AIFIRA du CENBG. La cible « eau+ADN » peut être irradiée avec des paquets de protons bien définis en

²³ Coussot, G., Le Postollec, A., Incerti, S., Baqué, M., Faye, C., Vandenaabeele-Trambouze, O., Cottin, H., Ravelet, C., Peyrin, E., Fiore, E., Vigier, F., Caron, J., Chaput, D., Przybyla, B., Berger, T., Dobrijevic, M. Photochemistry on the Space Station-Aptamer Resistance to Space Conditions: Particles Exposure from Irradiation Facilities and Real Exposure Outside the International Space Station. *Astrobiology*. 2019 Aug;19(8):1063-1074. doi: 10.1089/ast.2018.1896.

nombre et dans le temps. Les épaisseurs d'eau en jeu sont suffisamment faibles pour que les protons de 3 MeV délivrés par l'accélérateur puissent déposer leur énergie de façon homogène dans la profondeur de la couche d'eau (~15 keV/μm par proton). Dans le cas de l'événement de fragmentation présenté dans la figure ci-contre, l'ADN a été soumis à un flux homogène de 500 protons.μm⁻² sur une durée de 35 ms (instant t=0 sec). L'imagerie en temps réel des brins d'ADN fluorescent pendant l'irradiation permet d'observer la ségrégation des fragments d'ADN. Le suivi, à une fréquence de 10-20 Hz, du centre de masse de l'ADN se déplaçant par mouvement brownien avant et après l'irradiation ainsi que la mesure de la distribution en intensité des structures en jeu devraient permettre de déterminer la distribution en taille des fragments après le dépôt d'énergie. Nous souhaiterions qu'à terme, ces données puissent servir de référence pour le code de calcul Geant4-DNA d'intérêt en radiobiologie.

Ce projet a bénéficié d'un financement en 2019-2020 de la MITI du CNRS (thématique « Modélisation du vivant ») et d'une collaboration avec des physiciens théoriciens de la matière molle au LOMA-Bordeaux (T. Guerin et T. Salez), du CEA.CESTA (D. Hébert), CIMAP-Caen (M. Toulemonde), IP2I-Lyon (M. et B. Farizon).

Micro-irradiation en dose contrôlée et analyse dynamique, quantitative et en temps réel : de la cellule à l'organisme

L'objectif de cet axe de recherche est de définir l'impact des expositions à des doses contrôlées de rayonnement ionisant sur les organismes vivants. À ce jour, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les réponses radio-induites, notamment dans le cadre d'expositions à faible dose, reste encore limitée. L'expertise transdisciplinaire l'équipe iRiBio offre l'opportunité : **(i)** de mettre en œuvre des modèles biologiques cellulaires et multicellulaires originaux (cellules cancéreuses humaines et organisme multicellulaire de référence: *Caenorhabditis elegans*) dans des conditions expérimentales contrôlées (microsonde nucléaire), **(ii)** d'étudier en temps réel les conséquences biologiques radio-induites (vidéo-microscopie) et de réaliser l'analyse quantitative de cinétique moléculaire de ces réponses en fonction de la dose, **(iii)** de définir l'impact de ces expositions sur l'intégrité/stabilité du génome, sur le développement d'un organisme *in vivo*²⁴. L'intégration dynamique et cinétique de l'ensemble des variables telles que la nature des dommages, leur détection, leur réparation et les conséquences moléculaires et cellulaires lors des phases précoces de la réponse radio-induite (dommages ADN) sont réalisées en fonction du type de particules (particules alpha versus proton) ou de la dose d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

Au cours de cette période, l'équipe s'est investie dans l'intégration sur la microsonde de détecteurs minces en transmission. Ces détecteurs, adaptés à chaque type de particules disponibles sur AIFIRA, permettent de compter précisément le nombre de particules délivrées

²⁴ Barberet P, Sez nec H. Advances in microbeam technologies and applications to radiation biology. Radiat Prot Dosimetry. 2015 Sep;166(1-4):182-7. Review.

sur chaque cellule jusqu'au cas extrême d'une particule par cellule, tout en préservant une précision de tir de l'ordre du micromètre. Les détecteurs ont été développés à base de diamants en collaboration avec une équipe du CEA-LIST. Ils génèrent une impulsion électrique pour chaque proton le traversant tout en permettant l'observation des échantillons biologiques par microscopie optique. Ils sont maintenant utilisés en routine sur la plateforme AIFIRA. Ce travail a été publié notamment dans la revue *Applied Physics Letters* en 2017²⁵, a été retenu pour la page de couverture du journal et également fait l'objet de communiqués de presse (*American Institute of Physics*, IN2P3).

Cette évolution technique majeure a mené à une optimisation de nos expériences d'irradiation réalisée à l'échelle de la cellule (approche *in vitro*) et de réaliser notamment la détection et le suivi en temps réel de protéines de réparation (Protéines GFP-XRCC1 et RNF8-GFP) en réponse à des irradiations à la dose ultime d'une particule alpha par cellule. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Scientific Reports* en 2017²⁶.

En parallèle de ces travaux et en collaboration avec l'université de Munich (Pr G. Dollinger), nous avons réalisé des irradiations sélectives d'organelles cellulaires (mitochondries) en dose contrôlées et évaluées en temps réel la réponse radio-induite de ces mitochondries et plus particulièrement leur potentiel de membrane ($\Delta\Phi$) à l'aide de marqueurs fluorescents TMRE. Cette étude a mis en évidence une dépolarisation mitochondriale radio-induite extrêmement localisée au site d'irradiation dans la minute qui suit l'irradiation. Ce travail a été publié dans la revue *Scientific Reports*²⁷.

Enfin, nous avons poursuivi le développement d'un code Monte Carlo basé sur Geant4 intégrant l'ensemble des paramètres de l'expérience de la physique à la biologie avec l'intégration de fantômes biologiques « réalistes » afin de réaliser le calcul de l'énergie déposée dans les zones spécifiquement irradiées. Ainsi, le calcul de l'énergie déposée par des protons (3 MeV) dans un noyau de fantômes numériques « réalistes » basés sur l'utilisation de reconstructions tridimensionnelles d'embryons obtenues par microscopie confocale a été confronté aux données expérimentales. Les différents stades de division cellulaire au cours du développement embryonnaire de *C. elegans* ont été numérisés et intégrés dans Geant4. La sélection de lignées transgéniques d'intérêt autorisant l'irradiation sélective de compartiments subcellulaires ou cellulaires particulier et/ou le suivi des dommages radio-induits en temps réel (dommages à l'ADN) a permis de détecter et de suivre en temps réel dans un organisme en développement les conséquences radio-induite précoces (approche *in vivo*). Ce travail a été publié dans la revue *Scientific Reports* en 2019²⁸.

²⁵ Barberet P, Pomorski M, Muggioli G, et al. Cell micro-irradiation with MeV protons counted by an ultra-thin diamond membrane. *Applied Physics Letters*, 2017 ; 111 (24) : 243701

²⁶ Muggioli G, Pomorski M, Claverie G, Berthet G, Mer-Calfati C, Saada S, Devès G, Simon M, Seznec H, Barberet P. Single α -particle irradiation permits real-time visualization of RNF8 accumulation at DNA damaged sites. *Sci Rep*. 2017 Jan 31;7:41764.

²⁷ Walsh DWM, Siebenwirth C, Greubel C, Ilicic K, Reindl J, Girst S, Muggioli G, Simon M, Barberet P, Seznec H, Zischka H, Multhoff G, Schmid TE, Dollinger G. Live cell imaging of mitochondria following targeted irradiation in situ reveals rapid and highly localized loss of membrane potential. *Sci Rep*. 2017 Apr 25;7:46684.

²⁸ Torfeh E, Simon M, Muggioli G, Devès G, Vianna F, Bourret S, Incerti S, Barberet P, Seznec H. Monte-Carlo dosimetry and real-time imaging of targeted irradiation consequences in 2-cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *Sci Rep*. 2019 Jul 22;9(1):10568. doi: 10.1038/s41598-019-47122-7.

Ces différents travaux ont bénéficié de financements du programme européen SPRITE (*Initial Training Network Marie Curie*), du Défi « Instrumentation aux limites » de la MITI du CNRS, du programme NEEDS (projets Echo et Dose-Echo, IRSN, C. Lecomte-Pradines), du programme PICS INSERM (CEA-List, M. Pomorski), du Défi « Instrumentations aux limites » de la MITI CNRS et du programme CNRS 80'PRIME (RADIANCE, H. Seznec).

C. Autres activités et insertion dans l'environnement social, économique, culturel et sanitaire

L'équipe iRiBio participe à différentes actions :

- **Interactions avec le secteur industriel et économique** au travers d'échanges avec l'association professionnelle COSMEBIO (expertise relative à l'utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les produits dermo-cosmétiques). Contact réalisé par le biais du portail « *trouver un expert* » du CNRS.
- **Consulting** - Invitation au "Consultancy Meeting on Recent Status and Advances of Biomedical Imaging with Ion Beams, X-rays and Other Complementary Techniques" pour l'AIEA (IAEA: EVT1806673), Vienne, Autriche, 24 – 26 Septembre 2019 (P. Barberet)
- **Transfert de compétences techniques/scientifiques** au travers de collaboration avec l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) concernant les développements de code de simulation et de protocoles d'irradiation.
- **Collaborations avec le service de radiothérapie du Centre Régional de lutte contre le Cancer de Bordeaux et la société « Nanobiotix »** (expertise dans le cadre d'essai clinique nanomédecine), du service de radiothérapie du CHUV de Lausanne (expertise dans le cadre de la modélisation Monte Carlo – Geant4 DNA dans le cadre du projet MAGIC en FLASH radiothérapie), de l'Agence spatiale européenne (ESA).
- **Animation d'ateliers scientifiques** dans le cadre des « fêtes de la Sciences » et contribution à l'accueil d'enseignants de l'Education Nationale (Stages « découverte de la recherche »).

L'équipe iRiBio intervient dans le cadre de **projet de communication et de vulgarisation scientifique** avec en particulier la rencontre du journaliste Didier DUBRANAT et la réalisation du portrait de H. Seznec paru dans le Magazine de la Recherche Translationnelle, n° 10 « Chercheurs de la Nouvelle Aquitaine, Zoom sur l'oncologie » (www.chercheursdaquitaine.com)

D. Projets et stratégies à 5 ans

Analyse SWOT

Points forts : L'équipe iRiBio rassemble l'ensemble des compétences techniques, scientifiques et humaines complémentaires et nécessaires à la réalisation de programmes de recherche transdisciplinaires.

Équipe de référence dans les domaines de la modélisation (Geant4-DNA), de la micro-irradiation et de la micro-analyse chimique au travers du développement et de l'optimisation

des microsondes nucléaires installées sur la Plateforme AIFIRA du CENBG. Outils et méthodes uniques initiés par l'équipe iRiBio (AIFIRA, Geant4-DNA).

Nos activités de recherche reposent sur un socle solide et conséquent de collaborations dans les domaines de la physique théorique, de la physique instrumentale, de la modélisation (science ouverte *via* Geant4-DNA et Geant4) et de la reconstruction numérique, de la chimie des nanoparticules, de la radiobiologie/radiothérapie et du cancer... Ces collaborations sont internationales, nationales et locales.

L'équipe s'intègre aussi bien dans le tissu académique (CNRS, université) qu'au sein d'organisations non académiques telles que des institutions hospitalières (Centre Régional de lutte contre le Cancer) ou de groupement d'intérêt collectif (GDR Mi2B, Cancérôpole Grand Sud Ouest...).

Points à améliorer : L'équipe est constituée essentiellement de permanents fortement impliqués dans les organes de fonctionnement du CNRS (Direction Scientifique), de l'université (Responsables de formations, directeur d'école doctorale, vice-présidence recherche), d'animation scientifique au niveau national et régional (comité de pilotage GDR CNRS, comité de pilotage cancérôpole, d'expertise, ...) et donc moins disponibles pour le suivi et le développement d'activités de recherche.

S'ajoutent les difficultés d'obtention de crédits de fonctionnement récurrent pour l'équipe mais également pour la plateforme AIFIRA (essentielle à l'activité de l'équipe). Ainsi, l'équipe fonctionne pour l'essentiel en réponse à de multiples appels d'offres (MITI CRNS, ANR, Physique Cancer, Europe, Région,...) et obtient régulièrement des financements pour des durées de projet à court terme et souvent non reconductibles (1 an) obligeant l'équipe à déposer de nombreux dossiers (>5/an), à reconsidérer sans cesse ses objectifs scientifiques. De plus, ces appels d'offre nécessitent souvent l'établissement de collaboration avec des partenaires tiers hors instituts avec des critères d'éligibilité toujours plus restrictifs (financiers, disciplinaires, thématiques). Ces conditions exigent un investissement humain très conséquent, induit une pression supplémentaire afin d'assumer les projets à court terme (tant sur le plan scientifique qu'administratif) et conduisent à un sentiment de frustration.

Opportunités : L'équipe iRiBio bénéficie de l'opportunité de nombreux appels d'offres sur la thématique « interdisciplinaire » notamment au niveau local avec un soutien fort de l'université et de la Région sur la thématique du Cancer avec la possibilité de valoriser les activités de recherches aux interfaces physique/biologie, modélisation/expérimentation (matière molle, photonique, physique médicale, ...). L'équipe est fortement impliquée dans la structuration et l'animation scientifique de ces activités au niveau de l'université de Bordeaux et de la Région (aussi bien sur le volet « formation » que sur le volet « recherche »).

Risques : Les diminutions de crédits récurrentes et constantes poussent les institutions à privilégier leurs activités dites « cœur de métier » et à reconsidérer leur soutien aux activités dites « interdisciplinaires ». Cette évolution pose donc la question du maintien d'activités de recherche transversales et transdisciplinaires avec les difficultés de financement associées, de recrutement de jeunes chercheurs mais également de reconnaissance/valorisation des carrières des personnels permanents (évolution des carrières). Cette évolution n'est ni favorable à la « prise de risque », ni favorable à l'émergence souvent nécessaire à la rupture et au « dépassement des frontières de la connaissance ».

Les activités de l'équipe reposent pour l'essentiel sur l'accès à la plateforme AIFIRA et donc de son mode de fonctionnement et de son financement récurrent. Les récentes réorganisations autour de cette plateforme peuvent soulever de nombreuses interrogations et inquiétudes pour l'avenir des activités de l'équipe.

Structuration, effectifs et orientations scientifiques

Les activités de l'équipe iRiBio (*Interactions Rayonnements Ionisants et Biologie*) s'appuient sur le développement d'outils uniques de modélisation/simulation Monte Carlo, de techniques d'analyse physico-chimique, d'imagerie et d'irradiation par faisceaux d'ions focalisés afin de modéliser, exploiter et étudier les mécanismes des interactions des rayonnements ionisants avec la matière vivante. Les thèmes de recherche interdisciplinaire abordés par l'équipe iRiBio ont en commun de se baser **sur ces interactions, soit en les utilisant pour comprendre les mécanismes de régulation de l'homéostasie du vivant, soit en tant que telles en étudiant les réponses biologiques radio-induites en conditions d'expositions contrôlées en termes de dose et de cible biologique.** L'originalité de notre projet de recherche repose sur l'intégration d'une **une approche multi-échelle (de la molécule à l'organisme) et multi-dimensions (2D versus 3D, en temps réel).**

Les orientations de nos programmes de recherche multidisciplinaires et transversaux (chimie, physique, biologie) développées par l'équipe iRiBio tendent à caractériser les bases fondamentales :

(i) **des mécanismes d'interactions des rayonnements ionisants avec la matière vivante.** Ces approches combinent l'ensemble des compétences de l'équipe (modélisation, instrumentation, expérience). Nous focaliserons nos études à l'échelle moléculaire/mésoscopique (ADN génomique, ARN), de la cellule en culture (saines *versus* cancéreuses), de l'organisme multicellulaire en développement (*Caenorhabditis elegans*). Nous concentrerons particulièrement nos efforts sur le développement/optimisation de modèles biologiques 3D (tel *C. elegans*, sphéroïdes/organoides...) en exploitant les dernières innovations dans les domaines de l'instrumentation, de la microfluidique, de la microscopie, de la bio-informatique (analyse haut débit, dynamique et multi-dimension). Notre objectif est d'obtenir des données expérimentales qui permettront d'améliorer la détection, la caractérisation et la quantification des dommages radio-induits aux échelles moléculaire/mésoscopique et cellulaire ainsi que leurs conséquences dans la réponse radio-induite.

Notre ambition est de produire à terme une chaîne d'analyse complète et intégrée de la simulation à l'expérience (Geant4-DNA), de la molécule à l'organisme, au cours du temps c'est-à-dire des processus d'interactions physico-chimiques primordiaux initiaux induits par les rayonnements ionisants aux mécanismes biologiques régulant l'homéostasie d'un organisme multicellulaire en développement.

(ii) **des mécanismes d'interactions des nanoparticules d'oxydes métalliques avec le vivant.** Ces travaux nécessitent l'ensemble des compétences de l'équipe en termes de modélisation, reconstruction et analyse d'images, d'instrumentation/expérimentation. Nos études concernent la caractérisation qualitative et quantitative à l'échelle de la cellule des

compositions physico-chimiques d'échantillons biologiques en réponses à différentes conditions expérimentales. L'objectif est d'améliorer notre compréhension des mécanismes biologiques et physico-chimiques nano-induits et d'évaluer le lien entre la réponse biologique (analyse du transcriptome) et la régulation de l'homéostasie ionique (micro-analyse chimique multi-élémentaire - PIXE). **Notre ambition est d'obtenir à terme des données quantitatives originales à l'échelle de la cellule unique au sein d'un tissu/organe donné au sein d'un organisme multicellulaire tant à l'échelle biologique (génom-transcriptome) que physico-chimique (*single-cell analysis*).**

Conclusion

La structuration scientifique de l'équipe iRiBio est unique, originale, cohérente et constante depuis plusieurs années reposant sur un socle de méthodes et d'outils validés et éprouvés tant sur le plan de la modélisation que de l'expérimentation. L'équipe iRiBio se positionne aujourd'hui comme un groupe de référence tant par les outils développés que par les compétences humaines. L'ensemble de ces activités trouvent un écho très positif notamment dans le domaine émergent des thérapies innovantes associant **nanotechnologies et radiothérapie**. L'expertise de l'équipe est reconnue et permet de nous impliquer dans la structuration et l'animation scientifique au niveau de l'université de Bordeaux et de la Région afin de promouvoir des programmes de recherche de l'équipe.

Nos efforts se concentreront sur le maintien de nos activités en termes de financement mais également sur le lien essentiel avec la nouvelle structuration et réorganisation de la plateforme AIFIRA (maintien des activités, pérennité des financements...)