



HAL
open science

Etude de l'impact du radiomarquage de cellules avec des émetteurs $\beta+$ pour l'imagerie TEP : développement dosimétrique à l'échelle multi-cellulaire, analyse des paramètres d'influence et application au cas du $^1\text{F-FDG}$

Manon Jacquemin

► **To cite this version:**

Manon Jacquemin. Etude de l'impact du radiomarquage de cellules avec des émetteurs $\beta+$ pour l'imagerie TEP : développement dosimétrique à l'échelle multi-cellulaire, analyse des paramètres d'influence et application au cas du $^1\text{F-FDG}$. Physique Médicale [physics.med-ph]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASP007 . tel-03167164

HAL Id: tel-03167164

<https://theses.hal.science/tel-03167164>

Submitted on 11 Mar 2021

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.

Étude de l'impact du radiomarquage de
cellules avec des émetteurs β^+ pour
l'imagerie TEP : développement
dosimétrique à l'échelle multi-cellulaire,
analyse des paramètres d'influence et
application au cas du ^{18}F -FDG.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n° 576, Particules, Hadrons, Énergie, Noyau, Instrumentation,
Imagerie, Cosmos et Simulation (PHENIICS)

Spécialité de doctorat : Imagerie médicale et radioactivité

Unité de recherche : Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Laboratoire d'évaluation de la dose
interne

Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 07 octobre 2020, par

Manon JACQUEMIN

Composition du jury :

Elias KHAN Professeur, Université Paris-Saclay (IJCLab)	Président
Régine GSCHWIND Professeur, Université de Franche-Comté	Rapporteur, examinateur
Benoît PAQUETTE Professeur, Université de Sherbrooke	Rapporteur, examinateur
Isabelle GARDIN Physicienne, Centre Henri Becquerel	Examineur
Elif HINDIÉ PU-PH, Centre hospitalo-universitaire de l'Université de Bordeaux	Examineur
Charles TRUILLET Chercheur, CEA (SHFJ)	Examineur
Didier FRANCK Chercheur, IRSN (SDOS)	Directeur
Aurélié DESBRÉE Chercheur, IRSN (LEDI)	Co-directrice
Jean-Marc BERTHO Chercheur, IRSN (LRTOX)	Invité

"There's been time this whole time. You can't kill time with your heart. Everything takes time."

- David Foster Wallace, Brief Interviews with Hideous Men.

Remerciements

Je tiens à remercier les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à ce travail de thèse.

Je souhaite en premier lieu remercier Monsieur Elias KHAN pour avoir accepté de présider la soutenance de cette thèse.

Je remercie chaleureusement Mme Régine GSWCHIND, Professeure à l'Université de Franche-Comté et M. Benoit PAQUETTE, Professeur à l'Université de Sherbrook de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Merci pour le temps consacré à la relecture minutieuse du manuscrit et pour vos précieux commentaires. Je remercie également les autres membres du Jury, Mme Isabelle GARDIN, M. Elif HINDIÉ et M. Charles TRUILLET pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux et pour tous les commentaires constructifs échangés lors de la soutenance.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Didier FRANCK, mon directeur de thèse, qui m'a accueilli au sein du LEDI et m'a accordé sa pleine confiance pour mener à bien cette thèse. Un grand merci pour ton soutien et tous tes précieux conseils.

Merci infiniment à ma co-directrice de thèse, Aurélie DESBRÉE auprès de qui j'ai beaucoup appris. Ce n'est pas peu dire que j'ai traversé des turbulences durant ces quatre années de thèse (trois à tes côtés) - mais ton encadrement plus qu'exemplaire, tes encouragements et ta bienveillance m'ont porté et permis de réaliser une thèse dont je suis fière. Je te remercie pour tout le temps consacré à mon travail et pour la rigueur scientifique que tu m'as transmise.

Merci à Jean-Marc BERTHO, sans qui une partie essentielle de mes recherches n'aurait pas vue le jour. Tu as été mon deuxième encadrant (malgré toi!) et je n'aurais pas pu souhaiter mieux. Merci de m'avoir formé à la biologie cellulaire, merci d'avoir trouvé le temps de suivre mon travail, et ce malgré tes nombreux engagements.

Je souhaite remercier également tous les membres de l'équipe du LRTOX que j'ai eu l'occasion de croiser sur la plateforme PARISII. Merci à Monsieur Dmitri KLOKOV, Chef du LRTOX, notamment pour son aide

à l'exploitation des données expérimentales, pour sa sympathie et sa disponibilité. Merci à Dimitri KERESLIDZE pour son aide technique et à Margot COCHARD pour son travail sur la partie caractérisation des cellules mésenchymateuses.

Je tiens à remercier l'équipe du Service Hospitalier Frederic Joliot à Orsay et plus particulièrement Charles TRUILLET pour l'intérêt porté au projet, donnant lieu à belle collaboration scientifique. Merci d'avoir rendu possible la réalisation de radiomarquage au ^{18}F -FDG.

Merci à Fabienne RIBEIRO pour son aide sur la partie RDF. Ce fut un plaisir de collaborer avec toi.

Je n'oublie pas mes collègues du LEDI que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant cette aventure et qui m'ont offert un cadre chaleureux et bienveillant : Estelle DAVESNE, David BROGGIO, Eric BLANCHARDON, Cécile CHALLETON de VATHAIRE, Raphael BÔ.

Merci David d'avoir fait en sorte que je réalise ma thèse dans les meilleures conditions possibles.

Un grand Merci à mes copines de thèse Tiffany BEAUMONT et Nadia BENABDALLAH qui m'ont tant aidé, conseillé, et avec qui j'ai partagé de très beaux moments.

Je souhaite également remercier Khalil ALIANE, de passage au LEDI pour son stage de Master 2. J'ai pris un réel plaisir à t'encadrer.

Merci à toutes les belles rencontres que j'ai faites durant cette thèse, à Nicolas, Lucie et Marion, toute la colonie du LRMEd, Mohammed (lâche rien Mimou), ...

Enfin, je veux remercier tous mes proches, famille et ami(e)s pour le soutien qu'ils m'ont apporté.

Table des matières

Glossaire	5
Introduction générale	7
1 Contexte scientifique	11
1 Introduction	13
2 Principe de la médecine nucléaire	13
2.1 Principe général	13
2.2 Physique des rayonnements utilisés en médecine nucléaire	14
2.3 Applications	16
3 Le suivi de cellules par imagerie <i>in vivo</i> en médecine nucléaire	19
3.1 Principe de l'imagerie du suivi de cellules radiomarquées	20
3.2 Caractérisation du radiomarquage cellulaire <i>in vitro</i>	22
3.3 Applications	23
3.4 Limites du radiomarquage et problématique	29
3.5 Enjeux de la thèse	35
4 La dosimétrie des radiopharmaceutiques à l'échelle multi-cellulaire	36
4.1 Introduction	36
4.2 Formalisme du MIRD	37
4.3 Activité cumulée	39
4.4 Dose absorbée par unité d'activité cumulée (facteur S)	40
4.5 Association transport/modèle	45
4.6 Optimisation de la dosimétrie des β	47
5 L'évaluation des effets biologiques <i>in vitro</i>	48
5.1 Interaction des RI avec la cellule	48

5.2	Chronologie des évènements	48
5.3	Réponse cellulaire aux RI	50
5.4	Devenir des cellules suite aux dommages à l'ADN	55
5.5	Modélisation de la survie cellulaire	59
5.6	Études <i>in vitro</i> de la relation dose-effet	63
6	Conclusion	63
2	Dosimétrie multi-cellulaire des émetteurs β^+ : étude paramétrique	65
1	Introduction	67
2	Méthode pour la dosimétrie multi-cellulaire : formalisme et applications	68
2.1	Principales caractéristiques des radiopharmaceutiques d'intérêt	68
2.2	Dosimétrie appliquée au marquage de cellules avec des émetteurs β^+	68
2.3	Code MCNP6	71
2.4	Calcul de la dose auto-absorbée	74
2.5	Calcul du tir croisé moyen	75
2.6	Calcul de la dose non-spécifique	80
2.7	Étude paramétrique	80
2.8	Calculs de la dose absorbée moyenne délivrée au noyau d'une cellule lors du radio- marquage de cellules au ^{18}F -FDG à partir des données de la littérature	84
3	Résultats	84
3.1	Étude de la convergence du facteur $\bar{S}^{\text{croisé}}$ en fonction du volume d'étude et du nombre de cellules	84
3.2	Effet de la densité cellulaire sur la dose absorbée moyenne au noyau	85
3.3	Effet de l'efficacité de marquage sur la dose absorbée moyenne au noyau	86
3.4	Effets de la densité cellulaire et du paramètre k sur les écarts entre D_{cel} et D_{conv}	88
3.5	Dosimétrie du radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG à partir de données de la litté- rature	90
4	Discussion	92
4.1	Développement d'une méthode de calcul hybride	92
4.2	Influence de la densité cellulaire et de l'efficacité de marquage sur la dose absorbée	92
4.3	Dose conventionnelle <i>versus</i> Dose cellulaire	93
4.4	Effet du radionucléide	94
4.5	Doses absorbées dans le contexte d'une radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG	96
4.6	Limitations du modèle	96

5	Conclusion	97
3	Optimisation du calcul du tir croisé à l'aide de fonctions de distribution radiale	99
1	Introduction	101
2	Méthode RDF : formalisme et applications	102
2.1	Fonction de distribution radiale : cadre théorique	102
2.2	Calcul du tir croisé : nouveau formalisme en fonction de la <i>rdf</i>	103
2.3	Implémentation de la méthode basée sur la <i>rdf</i>	105
2.4	Comparaison de la méthode RDF à la méthode de référence et au MIRDCell	112
2.5	Etude de l'influence de la configuration géométrique sur le tir croisé moyen en fonction de la densité cellulaire et du volume d'étude	114
2.6	Application de la méthode RDF à un modèle de culture cellulaire <i>in vitro</i>	114
3	Résultats	118
3.1	Comparaison de la méthode RDF à la méthode de référence et au MIRDCell	118
3.2	Impact de la configuration géométrique sur le tir croisé	120
3.3	Application de la méthode RDF à un modèle de culture cellulaire <i>in vitro</i>	124
4	Discussion	125
4.1	Comparaison de la méthode RDF à la méthode de référence et au MIRDCell	126
4.2	Impact de la configuration géométrique sur le tir croisé	127
4.3	Application de la méthode RDF à un modèle de culture cellulaire <i>in vitro</i>	130
4.4	Modèle dosimétrique et utilisation de LAMMPS : limitations et perspectives	130
5	Conclusion	133
4	Relation dose-effet de cellules radiomarquées au ¹⁸F-FDG	135
1	Introduction	137
2	Matériels et méthodes expérimentales	138
2.1	Cellules et conditions de culture	138
2.2	Caractérisation du marquage au ¹⁸ F-FDG	139
2.3	Tests fonctionnels <i>in vitro</i>	143
3	Évaluation dosimétrique	152
3.1	Présentation du modèle dosimétrique	152
3.2	Méthode de calcul de la dose moyenne absorbée au noyau et des incertitudes associées	155
3.3	Applications	165
4	Résultats	166

4.1	Caractérisation du marquage	166
4.2	Calculs dosimétriques	171
4.3	Survie cellulaire	178
4.4	Résultats de cytométrie en flux	180
5	Discussion et perspectives	189
5.1	Dosimétrie	189
5.2	Relation dose-effet : interprétation des résultats	191
5.3	Perspectives générales sur la pratique du radiomarquage	198
	Conclusion générale	201
	Bibliographie	205
	Annexe 1	233
1	Auto-absorption du ^{18}F , ^{64}Cu et ^{68}Ga : pourcentage de contribution selon le type de particules	233
2	Tir croisé du ^{18}F , ^{64}Cu et ^{68}Ga : pourcentage de contribution selon le type de particules . . .	233
	Annexe 2	235
1	Application de la méthode RDF à une distribution hétérogène de cellules : simulation directe avec LAMMPS	235
2	Cinétique des distributions cellulaires	236
2.1	Aspects théoriques	237
2.2	Modélisation et calcul de $g(r)$	240
	Annexe 3	245
1	Calculs de la dose totale déposée aux cellules	246
	Liste des figures	249
	Liste des tableaux	257
	Publications et communications	261

Glossaire

7-AAD 7-amino-actinomycineD.

adCSM cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux.

CFU-F colony-forming unit fibroblast.

CI conversion interne.

CSMh cellules souches mésenchymateuses humaines.

Cy cytoplasme.

DM dynamique moléculaire.

EANM European Association of Nuclear Medicine.

FDG fluorodéoxyglucose.

GEANT-4 GEometry And Tracking.

GUM guide to the expression of Uncertainty in Measurement.

LAMMPS Large-scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator.

LRTOX Laboratoire de Radiotoxicologie et Radiobiologie expérimentale.

MCNP Monte-Carlo N-Particle.

MIRD Medical Internal Radiation Dose.

N noyau.

PENELOPE PENetration and Energy Loss of Positrons and Electrons.

rdf fonction de distribution radiale.

RI rayonnements ionisants.

RIV radiothérapie interne vectorisée.

Sc surface cellulaire.

SHFJ Service Hospitalier Frédéric Joliot.

SLM scintigraphie des Leucocytes Marqués.

STP solution de tampon au phosphate.

STP-SAB sérum-albumine bovine diluée au STP.

TEL transfert d'énergie linéique.

TEMP tomographie par émission monophotonique.

TEP tomographie par émission de positons.

Introduction générale.

La médecine nucléaire est une discipline médicale reposant sur l'administration au patient d'un radiopharmaceutique, c'est-à-dire un radionucléide éventuellement couplé à un vecteur, lui permettant de se fixer sur des cibles biologiques déterminées.

Ces radiopharmaceutiques sont utilisés à des fins d'imagerie diagnostique ou de thérapie.

Dans les applications diagnostiques, l'objectif est principalement la détection *in vivo* des pathologies chez le patient à l'aide de radionucléides émettant un rayonnement γ mono-énergétique détectable par une gamma-caméra ou deux rayonnements γ issus de la désintégration β^+ détectables par une caméra TEP (Tomographie par Emission de Positons). Le suivi *in vivo* de cellules spécifiques est aussi possible en prélevant du patient un lot de ces cellules au préalable, en les radiomarquant *in vitro* puis en les ré-injectant dans l'organisme.

Dans les applications thérapeutiques, la radiothérapie interne vectorisée (RIV) a pour objectif de détruire des cibles pathologiques en utilisant des radiopharmaceutiques émetteurs β^- et α .

La première application de radiomarquage de cellules pour réaliser un suivi par imagerie nucléaire a fait son apparition dans les années 70. Elle concerne le marquage *in vitro* de leucocytes¹ au ^{99m}Tc -HMPAO ou à l' ^{111}In -oxine dans le but de localiser des foyers infectieux et inflammatoires.

Plus récemment, l'émergence des thérapies cellulaires, à la fois dans le domaine de la médecine régénérative (cellules souches) et de l'oncologie (cellules souches, lymphocytes T, etc.), a entraîné le développement de l'imagerie nucléaire afin de fournir des données quantitatives sur la localisation, la viabilité et la migration des cellules *in vivo*.

L'imagerie TEP est particulièrement intéressante pour ces applications car elle bénéficie d'une meilleure résolution et d'une meilleure sensibilité que l'imagerie TEMP. De ce fait, en théorie, pour une même qualité d'image, une quantité d'activité plus faible dans les cellules devrait être nécessaire. La faisabilité d'un suivi de cellules *via* le radiomarquage de cellules avec des émetteurs β^+ tels que le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM ou le ^{89}Zr -oxine est de plus en plus étudiée mais il n'existe pas, à ce jour, de recommandations pratiques sur ce type de marquage pour la clinique ou les études pré-cliniques.

Malgré les bénéfices apportés par l'imagerie TEP, un certain nombre de questionnements se pose sur son

1. Globule blanc à un (mononucléaire) ou à plusieurs (polynucléaire) noyaux, présent dans le sang.

utilisation. Le radiomarquage des cellules repose en effet sur l'incubation *in vitro* du radiopharmaceutique avec les cellules afin de permettre son internalisation dans les cellules par transport actif ou diffusion passive à travers la membrane, ou sa liaison en surface des cellules. Or, l'exposition des cellules aux rayonnements ionisants peut induire des effets délétères au niveau des cellules. L'amplitude et la nature des effets biologiques dépendent de nombreux facteurs, notamment du type de radionucléide et de la quantité d'activité, des conditions *in vitro* (temps d'incubation, densité cellulaire, etc.) ou encore la radiosensibilité des cellules. La mort des cellules notamment peut conduire à une élution du marqueur hors des cellules (en plus de l'élution naturelle) et ainsi affecter la qualité d'image.

Cette problématique a été soulevée très tôt avec l'avènement du radiomarquage des cellules avec des émetteurs γ et devient cruciale pour les émetteurs β^+ , une dose plus importante étant susceptible d'être délivrée à l'échelle multi-cellulaire.

Bien qu'un certain nombre d'études ait été réalisé sur ce sujet, les résultats présentés sont assez hétérogènes et même parfois contradictoires pour différentes raisons :

- Les effets biologiques radio-induits sont généralement évalués en fonction de l'activité par cellule et non en fonction de la dose absorbée. Ce manque de considération dosimétrique rend particulièrement difficile la comparaison des études entre elles et la possibilité de tirer des conclusions claires sur l'impact de la procédure sur les cellules et l'imagerie.

Contrairement à la radiothérapie externe, la dose délivrée aux cellules dépend de façon importante de l'environnement biologique et des caractéristiques physiques et pharmaco-cinétiques du radiopharmaceutique. Le développement d'un modèle dosimétrique tenant compte de ces différents facteurs est essentiel pour pouvoir comparer différentes configurations de marquage et mieux appréhender leur impact sur la dose.

- Les effets biologiques étudiés peuvent varier d'une étude à l'autre, de même que les temps de mesure choisis, ce qui rend complexe l'interprétation des données.

Par ailleurs, l'évaluation des effets biologiques induits par des radionucléides est d'autant plus complexe qu'elle s'intègre dans une radiobiologie encore mal connue qui est associée à une irradiation prolongée, hétérogène, mettant en œuvre des rayonnements ionisants de qualités différentes et qu'elle touche au domaine des faibles doses et faibles débits de dose.

Il était donc indispensable de développer des méthodes réalistes de calculs de dose au niveau cellulaire des émetteurs β^+ prenant en compte l'ensemble de paramètres de marquage afin de mieux appréhender leur implication dans l'irradiation et de permettre de les corrélérer ensuite à des effets biologiques pertinents.

La visée finale étant de s'assurer de l'innocuité de la procédure de radiomarquage chez l'homme.

La structure de ce document répond à cette logique.

Le **chapitre 1** a pour objectif de définir le cadre de nos recherches. Après une description succincte de la médecine nucléaire et de ses applications, l'imagerie *in vivo* pour le suivi de cellules sera présentée. Les avantages et les limitations du radiomarquage ainsi que les enjeux actuels seront développés. Nous présenterons ensuite le formalisme de la dosimétrie interne ainsi qu'un état de l'art des méthodes de calcul dosimétrique appliquées à l'échelle cellulaire. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée à la présentation de concepts fondamentaux de radiobiologie.

Les aspects dosimétriques relatifs aux émetteurs β^+ seront traités dans le **chapitre 2**. Un modèle dosimétrique générique adapté aux scénarios *in vitro* sera développé à partir de calculs Monte Carlo et de calculs analytiques afin de calculer la dose absorbée moyenne au noyau d'une cellule.

Une étude systématique visant à étudier l'influence de deux paramètres de radiomarquage, à savoir l'efficacité de marquage et la densité cellulaire, sur la dose absorbée sera ensuite réalisée pour trois radionucléides émetteur β^+ utilisés pour le radiomarquage de cellules.

Nous analyserons l'apport de l'approche dosimétrique à l'échelle multi-cellulaire par rapport à une approche conventionnelle pour différentes valeurs de densité cellulaire et d'efficacité de marquage. Enfin, des calculs dosimétriques seront réalisés à partir de données de radiomarquage issues de différentes publications de la littérature.

Ceci nous amènera à étudier, dans le **chapitre 3**, une nouvelle approche de calcul plus rapide basée sur l'utilisation de fonctions de distribution radiale² calculées à l'aide d'un outil de dynamique moléculaire. L'objectif de ce chapitre sera de démontrer les avantages de la méthode proposée pour le calcul du tir croisé, composante prépondérante de la dose comme nous le verrons.

Pour compléter l'analyse paramétrique du chapitre précédent, une étude de l'influence de la configuration géométrique des cellules sur le tir croisé sera réalisée en fonction de la densité cellulaire et de la taille du volume d'étude.

Notre nouvelle méthode sera appliquée à une configuration géométrique plus complexe dans le cadre d'un radiomarquage au ^{18}F -FDG. Les perspectives possibles d'utilisation des outils de dynamique moléculaire seront finalement discutées.

2. Outil mathématique fondamental permettant de décrire la distribution d'entités dans l'espace

Enfin, ces outils seront utilisés dans une étude expérimentale présentée dans le **Chapitre 4**, qui aura comme objet principal l'évaluation de la relation dose-effet du radiomarquage au ^{18}F -FDG sur des cellules lymphoblastoïdes T et des cellules mésenchymateuses.

Dans un premier temps, la mise au point du protocole de radiomarquage et la réalisation de tests fonctionnels *in vitro* de la survie cellulaire et des dommages à l'ADN induits par le radiomarquage au ^{18}F -FDG seront décrites et une comparaison avec l'irradiation externe sera réalisée.

Dans un deuxième temps, le développement d'un modèle dosimétrique permettra d'évaluer de manière précise les doses reçues aux cellules au cours de la procédure de radiomarquage ainsi que les incertitudes associées, pour ensuite les corrélérer aux effets observés. A partir de ces résultats, les optimisations possibles pour l'amélioration de l'imagerie seront discutées.

Chapitre 1.

Contexte scientifique

1 Introduction

Ce premier chapitre a pour objectif d'exposer les enjeux liés au radiomarquage de cellules pour l'imagerie et les outils à développer pour y répondre. Après avoir présenté le principe général de la médecine nucléaire et les applications diagnostiques et thérapeutiques, l'utilisation de l'imagerie nucléaire pour le suivi de cellules radiomarquées sera développée, avec un intérêt particulier pour l'imagerie TEP. La deuxième partie du chapitre s'attachera à fournir l'état de l'art permettant d'adresser les questions soulevées, d'un point de vue dosimétrique et radiobiologique, et dans le même temps, de préciser les développements et les choix effectués pour ce travail de thèse. Le formalisme de la dosimétrie interne à l'échelle cellulaire et la modélisation des effets biologiques radio-induits dans le cadre d'expérimentations *in vitro* seront ainsi abordés.

2 Principe de la médecine nucléaire

2.1 Principe général

Comme déjà indiqué, la médecine nucléaire est une discipline qui repose sur l'administration de radionucléides sous forme de sources non scellées dans le corps d'un patient. Les produits administrés sont appelés des radiopharmaceutiques. Il peut s'agir du radionucléide seul qui sera directement métabolisé par l'organisme (exemple : ^{131}I pour l'évaluation de la fonction thyroïdienne) ou d'un radionucléide combiné avec un vecteur permettant le ciblage spécifique d'un marqueur biologique reflétant une fonction physiologique ou pathologique.

Le choix du vecteur dépend de la nature de la cible biologique *in vivo*. Le vecteur peut être par exemple un anticorps se fixant spécifiquement sur un antigène surexprimé à la surface de cellules tumorales, un anticorps ou un peptide pouvant se fixer sur des protéines membranaires. De multiples autres vecteurs comme des sucres, des vitamines, des aptamères, des nanoparticules ou des cellules peuvent être utilisés (1, 2). L'utilisation de cellules comme vecteurs est réalisée dans un cadre bien spécifique qui fera l'objet de la section 3 de cette partie.

Le radionucléide quant à lui émet des rayonnements ionisants (RI) qui peuvent être détectés et servir à décrire la distribution du radiopharmaceutique dans le corps du patient à des fins d'imagerie, ou mis à profit pour détruire des cellules dans le cadre d'une thérapie.

Le développement de nouveaux radiopharmaceutiques mobilisent les compétences d'équipes pluridisciplinaires en médecine, radiopharmacie et physique. Celui-ci est classiquement organisé en plusieurs phases :

- une phase d'essais *in vitro* pour évaluer l'efficacité du radiopharmaceutique (efficacité de marquage ou efficacité thérapeutique) sur différents modèles cellulaires,
- une phase pré-clinique chez l'animal. Les modèles animaux utilisés sont essentiellement des rongeurs, le porc ou des primates non-humains,
- une phase d'essai clinique chez l'homme.

Ces principales étapes franchies, les radiopharmaceutiques peuvent être ensuite utilisés en routine clinique.

Avant de détailler les applications en imagerie et en thérapie, les différents types de radionucléide impliqués en médecine nucléaire et les caractéristiques physiques des rayonnements émis sont présentés dans le paragraphe suivant.

2.2 Physique des rayonnements utilisés en médecine nucléaire

Les électrons, positons et particules α émis par différents modes de désintégration nucléaire de radionucléides sont utilisés en médecine nucléaire.

Les électrons dits β^- sont émis lors d'une désintégration β^- , causé par un excès de neutrons au sein d'un noyau. Lors de cette désintégration, l'émission d'une **particule β^-** est accompagnée de l'émission d'un anti-neutrino. Le partage de l'énergie de désintégration entre les deux entités fait que la particule β^- présente un spectre d'énergie continu. Les énergies sont relativement faibles, en moyenne entre 0,05 MeV et 2,5 MeV. Le transfert d'énergie linéique (TEL), qui correspond à l'énergie transférée au milieu par la particule incidente par unité de longueur (en keV/ μm), est relativement faible pour les β^- et se situe entre 0,2 et 4 keV/ μm .

Les positons ou particules β^+ sont issus de la désintégration β^+ , qui a lieu lorsqu'un noyau a un excès de proton. Alternativement, le noyau peut se désintégrer par capture électronique c'est-à-dire par capture d'un électron du cortège électronique entourant le noyau, sans émission de β^+ . Les β^+ partagent les mêmes caractéristiques physiques que les β^- (TEL, parcours, gamme d'énergie) exceptée la charge. La charge positive du positon fait que, en fin de parcours, il s'associe à un électron de la matière pour former un état lié, le positronium. Un processus de dématérialisation se produit et deux photons γ sont alors émis dans deux directions opposées avec une énergie de 511 keV chacun.

Les **particules α** sont des particules lourdes chargées positivement, issues de la désintégration α qui a lieu dans le cas de noyaux lourds riches en protons. Elles interagissent principalement par des forces coulombiennes entre leur charge positive et la charge négative des électrons des atomes, ce qui cause des ionisations et des excitations. En raison de leurs masses importantes (8 fois plus importantes que celle des électrons), elles sont très peu déviées par les interactions, et suivent ainsi une trajectoire presque rectiligne. Le TEL des α est bien plus élevé que celui des β entre 80 keV/ μ m et 300 keV/ μ m.

Suite à une désintégration du noyau, un réarrangement du cortège électronique a généralement lieu, se traduisant par l'émission de rayons X ou d'électrons Auger.

Les **électrons Auger** sont également d'intérêt pour la médecine nucléaire. Ce sont des particules de faibles énergies ; leur spectre contenant des émissions monoénergétiques allant de 10 eV à 10 keV. Les Auger ont également un TEL très important (4 - 26 keV/m) par rapport à celui des β et donc un parcours beaucoup plus faible.

Enfin, outre les rayonnements particulaires, les **rayonnements électromagnétiques γ** sont également d'intérêt.

Les γ utilisés sont issus de la désintégration β^+ comme vu précédemment ou de la désexcitation nucléaire. En effet, la désexcitation d'un noyau vers son état fondamental se fait de deux manières :

- émission d'un rayonnement électromagnétique γ par transition directe si l'énergie du γ émis est égale à l'énergie d'excitation ou par cascade de rayonnements γ dont la somme des énergies est égale à l'énergie d'excitation,
- par conversion interne (CI), c'est-à-dire un transfert direct de l'énergie d'excitation à un électron du cortège électronique.

Pour les γ , il n'y a donc pas de notion de TEL ou de parcours. Les photons n'ont pas un parcours spécifique dans la matière, mais possèdent une atténuation exponentielle caractérisée par la couche de demi-atténuation (CDA), c'est à dire l'épaisseur de milieu qu'un faisceau peut traverser avant d'être atténué de moitié.

Les rayonnements γ sont utilisés pour les applications diagnostiques, tandis que les radionucléides émetteurs de particules β^- , α et Auger sont utilisés dans un cadre thérapeutique (**figure 1.1**).

Les caractéristiques physiques des principaux rayonnements d'intérêt utilisés en médecine nucléaire sont résumées dans le **tableau 1.1** (3, 4). À dose absorbée équivalente, les particules de haut TEL sont plus cytotoxiques.

Tableau 1.1 – Caractéristiques des rayonnements d'intérêts en médecine nucléaire. *Dans les tissus mous.

Caractéristique	β	α	Auger	γ
Energie	0,05-2,5 MeV	3-10 MeV	10 eV-10 keV	keV - MeV
Parcours*	0,2-11 mm	50-100 μm	10 nm	-
TEL*	0,2-4 keV/ μm	80-300 keV/ μm	4-26 keV/ μm	-
Application	Thérapie (β^-), Imagerie (β^+)	Thérapie	Thérapie	Imagerie

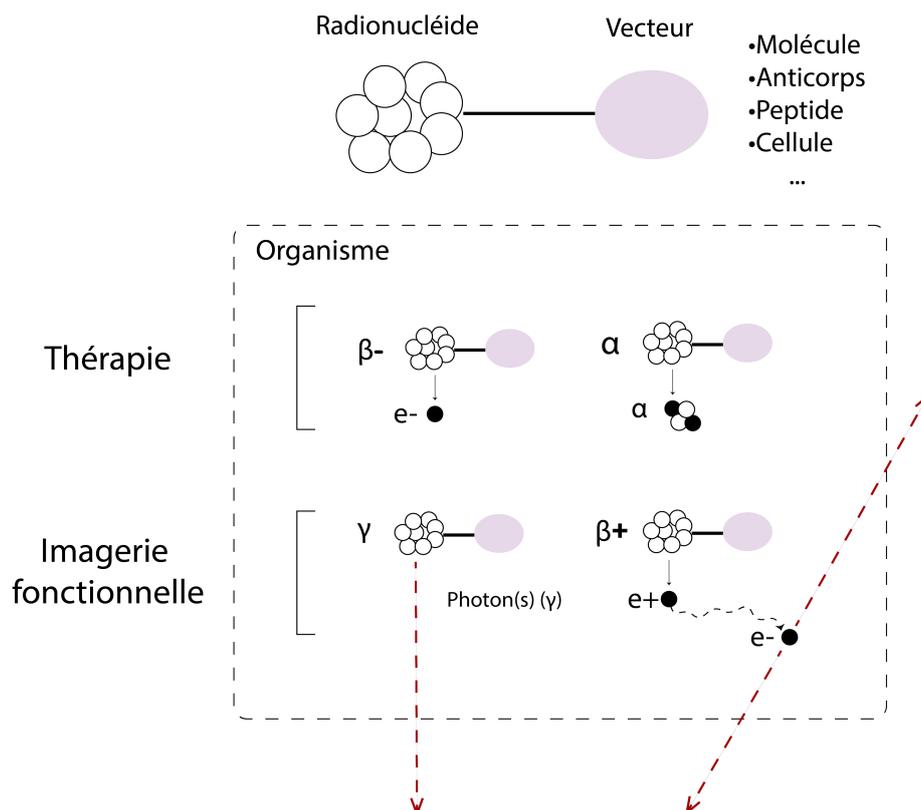


FIGURE 1.1 – Les radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire sont constitués d'un radionucléide seul ou lié à un vecteur, par exemple, une molécule, un anticorps, un peptide, une cellule. Les rayonnements émis par désintégration des radionucléides peuvent être utilisés pour réaliser une imagerie (γ) ou pour détruire des cellules pathologiques (β^- , α , Auger).

2.3 Applications

2.3.1 Imagerie fonctionnelle

Représentant plus de 90% des actes de médecine nucléaire en France, l'imagerie est la principale application en médecine nucléaire visant à établir un diagnostic, pronostic ou un suivi thérapeutique de pathologies (5). L'obtention d'images décrivant la biodistribution du radiopharmaceutique dans le corps du patient permet d'étudier le métabolisme des éléments constituant de l'organisme, normaux et pathologiques, parfois avant l'apparition d'anomalies anatomiques.

Elle est dite *fonctionnelle* par opposition aux techniques d'imagerie dites *structurelles* comme celles basées sur les rayons X ou IRM qui réalisent des images de l'anatomie. Une acquisition multi-modale est souvent utilisée pour permettre une meilleure qualité d'imagerie et un repérage anatomique précis des lésions métaboliques dans les trois plans de l'espace.

L'imagerie repose sur l'utilisation de radionucléides émettant des rayonnements γ . Avec un pouvoir pénétrant très important, ceux-ci peuvent sortir du corps des patients et être détectés par une caméra externe. Deux systèmes de détection sont alors disponibles selon le radionucléide utilisé :

- La **gamma-caméra**,
- La **caméra TEP** basée sur le principe de la Tomographie par émission de positons (TEP).

Dans les deux cas, la détection des rayonnements par la caméra se base sur la conversion de l'énergie des photons incidents en un signal électrique, permettant par la suite de localiser ces photons pour en faire une image.

La gamma-caméra. Les acquisitions réalisées avec une gamma-caméra peuvent se faire selon différents modes en fonction de l'information recherchée. Les acquisitions planaires, ou scintigraphies, en deux dimensions, permettent de mettre en évidence des anomalies de fixation du radiopharmaceutique sur une région d'intérêt. Les acquisitions en mode balayage sont des acquisitions planaires pour lesquelles la caméra ou le support du patient se déplace afin d'obtenir une image dont la dimension est supérieure à la taille du champ de vue du détecteur. Ce mode est souvent appliqué pour réaliser une imagerie du corps entier. Enfin, les acquisitions en mode tomographique ou Tomographie par émission monophotonique (TEMP) consistent à faire tourner la gamma-caméra autour du patient et à reconstruire, à l'aide d'algorithmes mathématiques, l'image en volume de l'objet source à partir des différentes projections acquises. Ce procédé permet de dissocier deux fixations distinctes dans le cas d'organes superposés.

Selon l'enquête nationale de la SFMN datant de 2017, les actes les plus fréquents en TEMP sont les scintigraphies osseuses et les scintigraphies cardiaques (35% chacune) avec les radiopharmaceutiques marqués au ^{99m}Tc d'une période physique t_p de 6h (^{99m}Tc -DMSA ou ^{99m}Tc -DTPA)¹. La scintigraphie de la thyroïde avec de l' ^{123}I constitue aussi un des examens de médecine nucléaire les plus répandus.

La caméra TEP. Des émetteurs β^+ sont utilisés pour l'imagerie TEP. La détection simultanée de deux photons issus de l'annihilation d'un positon avec un électron du milieu et émis dans des directions opposées permet de localiser le radionucléide avec une incertitude plus ou moins grande selon le parcours de

1. La période physique t_p correspond au temps au bout duquel la moitié des isotopes initialement présents ont disparu par transformation spontanée

la particule β^+ . L'imagerie TEP bénéficie d'une excellente sensibilité avec une limite de détection de l'ordre du picomolaire (6).

La majorité des procédures est réalisée à partir du radionucléide ^{18}F ($t_p=110$ minutes). En 2016, les examens basés sur le radiopharmaceutique ^{18}F -fluorodéoxyglucose (FDG) représentaient autour de 90% des actes d'imagerie TEP et au total 35% des actes d'imagerie en médecine nucléaire (5).

L'utilisation du ^{18}F -FDG comme radiopharmaceutique permet de mettre en évidence des foyers hypermétaboliques, avec des cellules consommant plus de glucose que les cellules saines environnantes, notamment les cellules cancéreuses qui prolifèrent très rapidement. La TEP au ^{18}F -FDG est ainsi devenue un outil essentiel dans le domaine de l'oncologie, pour la prise en charge des patients souffrant de cancers. Cet examen est aussi indiqué à la fois pour le diagnostic initial, l'évaluation de l'efficacité des traitements et la détection de récives.

La ^{18}F -Choline et la ^{18}F -DOPA sont les deux autres radiopharmaceutiques les plus utilisés, respectivement pour la prise en charge du cancer de prostate et l'imagerie du cerveau.

En routine clinique, le ^{68}Ga associé à des peptides possédant une forte affinité pour les récepteurs de la somatostatine, comme le DOTATOC ou DOTATATE est aussi couramment utilisé pour diagnostiquer les tumeurs neuro-endocrines (5). D'autres radionucléides comme le ^{89}Zr ($t_p=3,3$ j) et le ^{64}Cu ($t_p=12,7$ h) sont essentiellement utilisés en recherche.

Cas particulier : utilisation de cellules comme vecteurs d'imagerie. Les radionucléides utilisés pour l'imagerie TEMP et TEP peuvent être au préalable associés à des cellules d'intérêts en *in vitro* afin de suivre leur biodistribution spécifique *in vivo*.

En diagnostic clinique, par exemple, à partir d'un volume de sang prélevé chez un patient, les leucocytes sont isolés, puis radiomarqués *in vitro* au ^{99m}Tc -HMPAO. Les leucocytes radiomarqués sont ensuite réinjectés au patient et leur détection par imagerie permet de révéler des foyers infectieux et inflammatoires. Le principe de l'imagerie nucléaire pour le suivi de cellules d'intérêts et les enjeux de cette application, faisant l'objet de cette thèse, seront développés dans la section 3.

2.3.2 Thérapie

Les applications thérapeutiques visent à détruire sélectivement des cellules pathologiques. Pour cela, une quantité importante de radiopharmaceutique doit être administrée au patient afin de délivrer une dose maximale au niveau des cellules cibles.

La thérapie phare de la médecine nucléaire est celle utilisant de l' ^{131}I seul (émetteur β^-), pour le traitement des pathologies bénignes et cancéreuses de la thyroïde. Cette thérapie est réalisée depuis plus de 70 ans et représente actuellement en France 91% des actes à visée thérapeutique (5). Les thérapies hors-thyroïde les plus importantes concernent les radiosynovectomies par administration locale d' ^{90}Y , de ^{186}Re ou d' ^{169}Er sous forme colloïdale. Par ailleurs, l'iobenguane marqué à l' ^{131}I (^{131}I -mIBG) est utilisé pour traiter certaines tumeurs neuro-endocrines, telles que le neuroblastome chez l'enfant.

D'autres formes de thérapies ont aussi émergé depuis les années 2000 : la radioimmunothérapie pour le traitement des lymphomes non-hodgkinien, avec en particulier l'utilisation du ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), la radiothérapie interne sélective par microsphères marquées à l' ^{90}Y pour le traitement des cancers du foie (SIRT) ou encore la peptidothérapie pour les tumeurs neuro-endocrines avec l'utilisation du ^{177}Lu -DOTATATE (Lutathera®) avec une autorisation de mise sur le marché obtenue en 2017.

Les émetteurs α de plus faible parcours (cf. **tableau 1.1**) sont principalement utilisés pour traiter des micro-métastases ou de très petites tumeurs. Le Xofigo ($^{223}\text{RaCl}_2$) est le premier radiopharmaceutique α à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2013. Ce radiopharmaceutique est utilisé pour traiter des métastases osseuses du cancer de la prostate.

Les radionucléides émetteurs d'électrons Auger, tels que l' ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I ou le ^{99m}Tc , suscitent aussi un intérêt pour la thérapie. La distribution de ce type de radionucléide proche du noyau cellulaire et donc de l'ADN radiosensible produirait un effet léthal pour la cellule bien plus important que les particules β (7, 8, 9, 10). Le ciblage des noyaux des cellules cancéreuses doit alors être le plus précis possible pour les détruire efficacement. Leur potentiel dans le traitement de certains cancers, comme ceux de type cérébraux (11), a été mis en évidence.

3 Le suivi de cellules par imagerie *in vivo* en médecine nucléaire

Comme évoqué précédemment, des cellules radiomarquées peuvent être utilisées comme radiotraceurs pour réaliser une imagerie spécifique. Cette procédure est utilisée dans le cadre de deux applications principales :

- le suivi de leucocytes pour la détection de foyers d'inflammation ou d'infection (routine clinique),
- le suivi de cellules transplantées dans le cadre du développement de thérapies cellulaires (pré-clinique et essai clinique).

La thérapie cellulaire étant une discipline en plein essor, l'imagerie nucléaire, et particulièrement l'imagerie

TEP, représente dans ce cadre un outil prometteur pour l'évaluation de l'efficacité de thérapies cellulaires, *via* par exemple la quantification des cellules greffées au niveau des sites cibles. Cette deuxième application sera donc plus particulièrement détaillée. Avant de décrire ces deux applications, le principe général de l'imagerie du suivi de cellules radiomarquées est présenté.

3.1 Principe de l'imagerie du suivi de cellules radiomarquées

La détection de cellules *in vivo* est possible grâce au radiomarquage spécifique des cellules avec un radionucléide. Le radiomarquage peut être réalisé de manière directe ou indirecte.

La méthode de radiomarquage dite *directe* est la plus facile à mettre en oeuvre et est celle qui est utilisée en clinique. Dans un premier temps, les cellules d'intérêts sont prélevées et isolées du patient. Puis, les cellules sont radiomarquées *in vitro* par incubation avec une solution radioactive. Enfin, les cellules marquées sont ré-injectées dans l'organisme selon différentes voies possibles (*e.g.*, voie intraveineuse, voie intracoronarienne, etc). Cette procédure est illustrée **figure 1.2**.

Les radionucléides sont associés au préalable à des vecteurs qui permettent leur incorporation dans les différents compartiments cellulaires *via* un mécanisme de transport actif (exemple : ^{18}F -FDG), ou par diffusion passive à travers la membrane cellulaire (exemple : ^{111}In -oxine, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO). Le vecteur peut également se lier au niveau de la membrane (exemple : ^{68}Ga -DOTATOC). Il est à souligner qu'avec cette stratégie de marquage, une fois les cellules administrées dans l'organisme, le signal provenant de cellules vivantes n'est *a priori* pas différenciable de celui provenant de cellules mortes ou endommagées. De plus, la division des cellules peut entraîner une dilution du signal.

Ces désavantages peuvent être évités en utilisant une méthode de radiomarquage dite *indirecte*, qui repose en premier lieu sur l'introduction d'un gène rapporteur à l'intérieur de chaque cellule que l'on souhaite suivre.

Ce gène sera ensuite transcrit puis traduit en protéine ayant une affinité spécifique à un vecteur radiomarqué. Le gène rapporteur typiquement utilisé est la thymidine kinase du virus Herpes simplex de type 1 (HSV1-TK). La protéine thymidine kinase traduite à partir de celui-ci est capable ensuite de phosphoryler des substrats marqués à des radionucléides utilisés en TEP, dérivées de la thymidine et de l'acylguanosine, tels que $^{124}\text{I}/^{18}\text{F}$ -FIAU, $^{124}\text{I}/^{18}\text{F}$ -FEAU, ^{18}F -FHGP/FHBG (14).

Dans ce cas, les cellules transfectées sont d'abord administrées dans l'organisme et le substrat radio-marqué est injecté au moment de l'imagerie. Les cellules exprimant le gène HSV1-TK peuvent ainsi être spécifiquement visualisées *in vivo* (15).

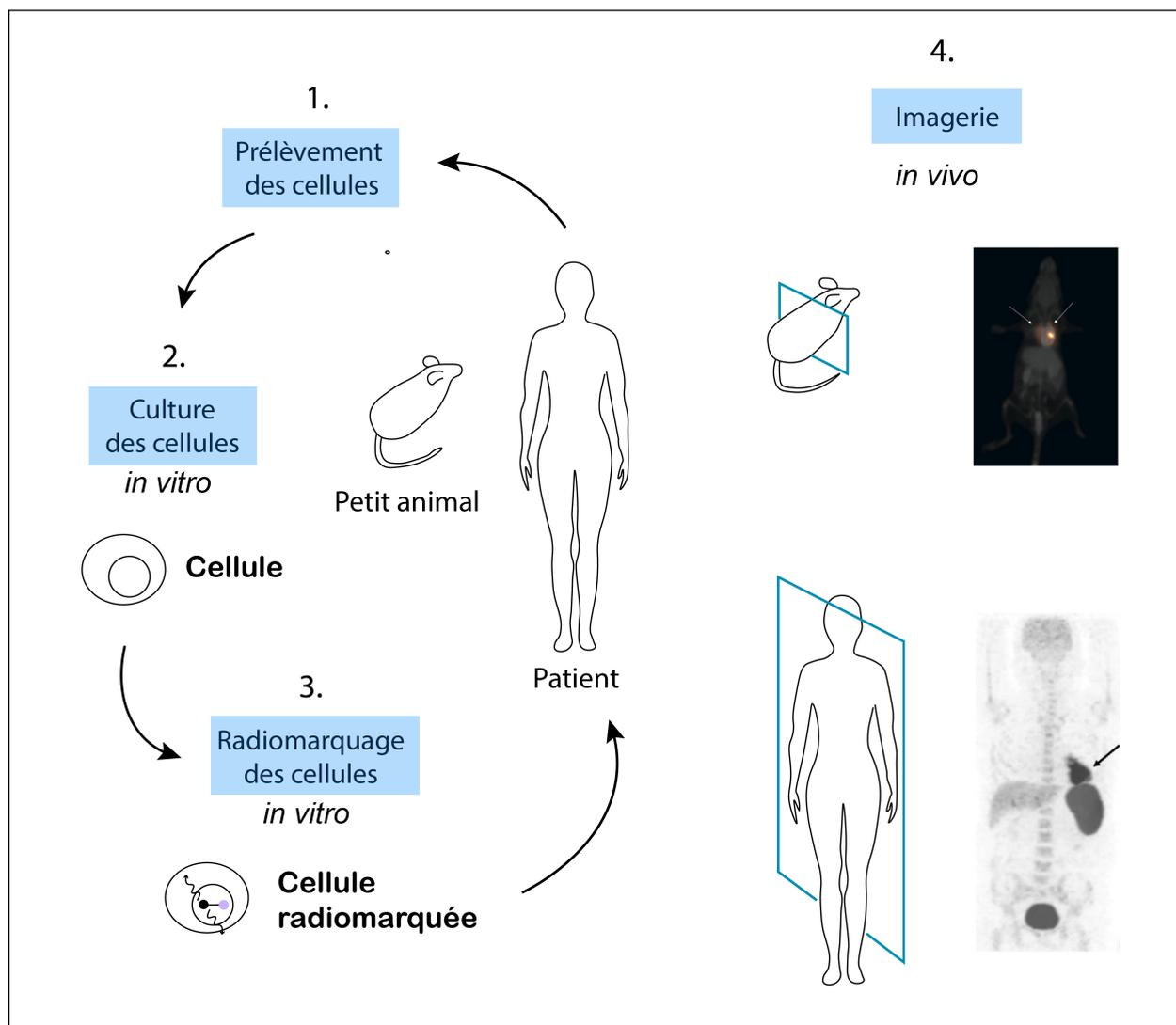


FIGURE 1.2 – Principe de l'imagerie nucléaire pour le suivi *in vivo* de cellules d'intérêt radiomarquées. Exemple d'un radiomarquage direct de cellules avec un radiopharmaceutique émetteur β^+ pour une imagerie TEP : (1) les cellules sont prélevées de l'organisme, (2) et (3) les cellules sont mises en culture et radiomarquées, puis (4) les cellules radiomarquées sont ré-injectées dans l'organisme (petit animal ou patient). (4) Une image de la biodistribution des cellules marquées est obtenue. La première image (haut) montre l'accumulation de cellules souches embryonnaires (CSE) au niveau du coeur après transplantation dans une souris avec un infarctus du myocarde (12). L'image patient (bas) montre l'accumulation de cellules souches hématopoïétiques marquées au ^{18}F -FDG dans le myocarde 2h après administration (13).

L'approche transgénique offre la possibilité de réaliser des sessions d'imagerie autant de fois que l'on souhaite après l'intégration stable du transgène dans les cellules, sans dilution du marqueur lors la division cellulaire. Elle requiert toutefois une manipulation génétique des cellules et des processus de radiochimies complexes, ce qui limite son application clinique à l'heure actuelle (16, 17).

Les stratégies de marquage direct et indirect sont illustrées **figure 1.3**.

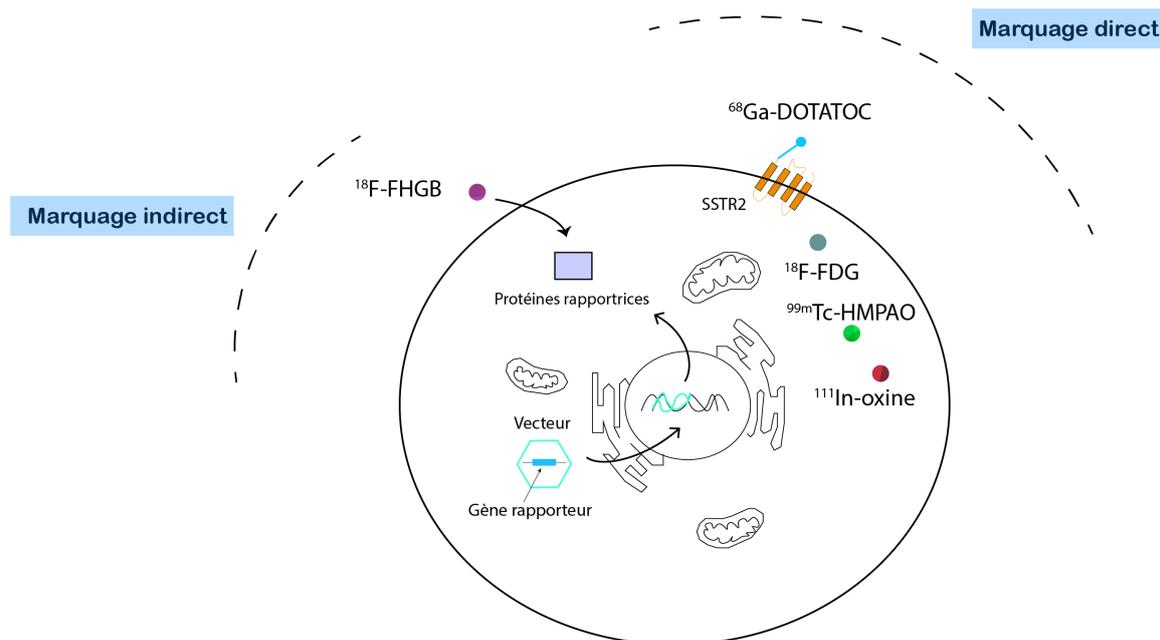


FIGURE 1.3 – Principe des stratégies de radiomarquage direct et indirect. Exemples de radiomarquage direct : les vecteurs $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ ou $^{111}\text{In-oxine}$ sont des complexes lipophiles qui entrent dans les cellules de manière passive à travers la membrane. Le $^{18}\text{F-FDG}$ est incorporé dans les cellules de manière active *via* les transporteurs de glucose. Le $^{68}\text{Ga-DOTATOC}$ se lie à l'extérieur de la membrane au niveau des récepteurs de la somatostatine. Exemple de radiomarquage indirect : un gène rapporteur est intégré au génome de la cellule, ce qui permet la production d'une protéine spécifique capable de phosphoryler le substrat radiomarqué $^{18}\text{F-FHGB}$.

3.2 Caractérisation du radiomarquage cellulaire *in vitro*

Le radiomarquage des cellules représente une étape clé de la procédure. Il est important de développer une méthode de radiomarquage des cellules *in vitro* qui permette une incorporation rapide et stable du radionucléide, sans compromettre la viabilité ou la fonctionnalité des cellules à étudier.

L'efficacité et la **stabilité** du radiomarquage sont deux paramètres *in vitro* clés du radiomarquage. L'efficacité représente le pourcentage d'activité incorporé dans les cellules en fin d'incubation. L'efficacité et la stabilité sont systématiquement caractérisées *in vitro* pour valider la méthode de radiomarquage, avant la réalisation d'études de biodistribution *in vivo*.

Les mécanismes qui permettent l'incorporation puis l'accumulation de l'activité dans les cellules sont propres à chaque radiopharmaceutique. Pour reprendre un des exemples illustrés **figure 1.3**, le $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ est un complexe lipophile qui est incorporé à l'intérieur des cellules en passant à travers la membrane de manière passive. Ensuite, deux mécanismes ont été suggérés pour expliquer la maintenance du radiopharmaceutique à l'intérieur de la cellule : la conversion du radiopharmaceutique en un complexe hydrophile par la réduction d'agents comme la glutathione² ou la liaison du $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ à des protéines

2. Substance organique de nature peptidique servant au transport de l'hydrogène.

non-diffusibles et aux organelles de la cellule (18).

Cependant, de multiples paramètres peuvent influencer l'efficacité de marquage (19, 20), notamment le type cellulaire, la densité cellulaire, le temps d'incubation, l'activité volumique, la température ou encore la composition du milieu de marquage.

Par ailleurs, certains mécanismes de radiomarquage ne sont pas irréversibles. Les cellules peuvent alors relarguer de l'activité au cours du temps - c'est le cas du ^{99m}Tc -HMPAO et du ^{18}F -FDG par exemple (18, 21). De plus, du fait de la cytotoxicité intrinsèque du marquage liée au radionucléide et/ou au ligand utilisés, celles-ci pourraient être endommagées et relarguer également de l'activité. Ce point sera développé dans la section dédiée aux limites du radiomarquage (§ 3.4). Ces deux effets combinés caractérisent la stabilité du radiomarquage (18). Ce paramètre représente le pourcentage d'activité restant dans les cellules à un instant t après la fin de l'incubation.

3.3 Applications

Comme indiqué précédemment, le radiomarquage de cellules pour le suivi par imagerie est utilisé principalement pour deux applications.

3.3.1 Imagerie *in vivo* de l'infection et de l'inflammation

La scintigraphie des Leucocytes Marqués (SLM) est pratiquée en clinique dans le but de détecter des sites infectieux ou inflammatoires, notamment les infections de prothèses articulaires, fièvre d'origine inconnue, infections du poumon ou encore les infections de pieds diabétiques (18). Cette technique représente aujourd'hui la technique de référence en médecine nucléaire pour la détection d'infection/inflammation et, plus globalement, la première application clinique de marquage cellulaire pour une imagerie *in vivo* (22). L'examen consiste à prélever du sang chez le patient, isoler les leucocytes par sédimentation, à radiomarquer les cellules, puis les réinjecter au patient par voie intraveineuse. Des images planaires et/ou TEMP sont ensuite utilisées pour visualiser leur biodistribution dans le corps du patient.

La SLM a été réalisée pour la première fois en 1979 en utilisant le radiopharmaceutique ^{111}In -oxine ($T_p = 2,8$ jours) (23). Celui-ci a ensuite été approuvé comme substance à faible risque par la FDA en 1985.

Au fil des années, l' ^{111}In -oxine a été largement remplacé par le ^{99m}Tc -HMPAO pour sa disponibilité, son coût et ses caractéristiques physiques. Un kit de préparation pour le radiomarquage au ^{99m}Tc -HMPAO a été mis sur le marché depuis 1988. Le radiomarquage des leucocytes à l' ^{111}In reste malgré tout le plus adapté dans le cas de maladies intestinales inflammatoires et les infections rénales. La meilleure stabilité du radio-

pharmaceutique dans les cellules permet de limiter l'activité non-spécifique (lié au radiotraceur seul) dans les voies urinaires et gastrointestinales (18).

Afin de combiner la spécificité des leucocytes pour les foyers infectieux et inflammatoires et les avantages de la TEP, l'utilisation de leucocytes radiomarqués au ^{18}F -FDG a par la suite suscité un intérêt particulier. La première étude *in vitro* de faisabilité du radiomarquage de leucocytes au ^{18}F -FDG a été réalisée par Osman *et al.* en 1992 (21). Dix ans plus tard, une étude de biodistribution *in vivo* de leucocytes marqués au ^{18}F -FDG est réalisée chez 4 volontaires adultes (24).

L'administration de ^{18}F -FDG seul peut être également utilisée pour la détection de lésions inflammatoires. Cependant, par rapport au FDG seul, une meilleure spécificité des cellules marquées pour les foyers infectieux a été observée (25). En 2006, une étude menée sur 21 patients (26) a montré que la technique d'imagerie hybride ^{18}F -FDG-leucocytes TEP/TDM présentait une très bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic de l'infection. L'application clinique du ^{18}F -FDG pour le marquage des leucocytes est encore limitée, en raison des contraintes d'acquisition d'images pour des temps plus longs après administration des cellules (2-6h) et d'une élution importante du ^{18}F -FDG.

Par ailleurs, Bhargava *et al.* (27) rapportent l'intérêt du ^{64}Cu comme marqueur potentiel des leucocytes. Des études supplémentaires sont attendues pour évaluer de manière approfondie la faisabilité de ce type de marquage pour les études de suivi *in vivo*.

3.3.2 Imagerie *in vivo* permettant le suivi de cellules thérapeutiques

Afin de bien comprendre le rôle de l'imagerie dans l'optimisation de thérapies cellulaires, il nous a semblé important de présenter dans un premier temps le principe de la thérapie cellulaire et les différentes cellules impliquées.

Principe général de la thérapie cellulaire. La thérapie cellulaire est une forme de traitement consistant à produire des cellules issues d'un donneur sain dans un laboratoire ou à prélever des cellules chez un patient, à les amplifier et éventuellement les modifier afin de leur attribuer une fonction précise, pour les réimplanter au patient. Il en découle deux stratégies principales : l'utilisation de cellules souches pouvant se substituer aux cellules ciblées ou l'utilisation de cellules pouvant produire une substance dont a besoin l'organisme.

Applications de la thérapie cellulaire. Les thérapies cellulaires validées et autorisées pour une application en clinique par les autorités de santé sont essentiellement basées sur des cellules souches. La première thérapie cellulaire est appliquée depuis les années 1970 et repose sur l'utilisation de cellules

souches cutanées pour reconstituer des feuilles d'épiderme en laboratoire puis la greffe chez des grands brûlés (28). L'administration de cellules souches sanguines dites *hématopoïétiques*, provenant de la moelle osseuse est également utilisée dans le traitement d'hémopathies malignes depuis les années 1980. Les greffes de cellules provenant du sang de cordon ombilical, moins fréquentes, sont réalisées pour traiter des hémopathies malignes comme les leucémies ou des lymphomes.

Ces dernières années, de nombreuses autres approches de thérapie cellulaire ont été explorées en recherche et testées dans le cadre d'essais cliniques et pré-cliniques. Les efforts ont été particulièrement déployés autour des thérapies cellulaires basées sur les **cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh)**. Plus de 350 essais cliniques de thérapies basées sur les CSMh sont en cours dans le monde, pour des indications extrêmement variées en raison des capacités de ces cellules à se différencier en différents types cellulaires (os, cartilage, muscle, etc) (29). Des études ont également montré que les CSMh pouvaient favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, grâce à la production de facteurs de croissance. Cette propriété a justifié de nombreux travaux dans le domaine cardiovasculaire, visant à favoriser la croissance des tissus lésés après un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral ou une artériopathie des membres inférieurs (16, 30, 31, 32, 33).

Par ailleurs, les CSM étant dotées d'un tropisme naturel vers les cellules cancéreuses, les CSM sont envisagées comme de potentiels candidats pour la délivrance de vésicules d'agents thérapeutiques (34, 35). Plus généralement, les CSMh migrent vers les sites de dommages tissulaires dont les sites inflammatoires et les tissus normaux ayant subi des lésions après irradiation (36).

La **greffe de cellules d'îlots de Langerhans**³ est également explorée pour les patients atteints de diabète de type I. Ce type de greffe, moins risqué que la greffe de pancréas, permet une amélioration de l'hémoglobine glyquée⁴ et une diminution du nombre d'hypoglycémies. L'efficacité de la procédure est encore faible aujourd'hui, et des îlots provenant de plus d'un pancréas sont généralement nécessaires pour s'affranchir d'un traitement d'insuline (37).

Une autre forme de thérapie cellulaire basée sur des **cellules immunocompétentes**, telles que les lymphocytes T et B⁵, les cellules NK⁶ (*Natural killer* en anglais) ou les cellules dendritiques⁷, a offert

3. Cellules endocrines (produisant des hormones) du pancréas regroupées en petits amas (ou îlots) disséminés entre les acini séreux (cavités arrondies débouchant sur le canal pancréatique).

4. L'hémoglobine glyquée est la part de l'hémoglobine qui capte le sucre dans le sang.

5. Les lymphocytes B et T participent quant à eux à la réponse immunitaire adaptative.

6. Les cellules NK sont un type de lymphocytes cytotoxiques qui constituent une composante majeure du système immunitaire inné. Ils jouent un rôle majeur dans le rejet de tumeurs et de cellules infectées par des virus.

7. Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans l'initiation des réponses immunes adaptatives.

récemment de nouvelles perspectives dans le domaine de l'oncologie. Les lymphocytes T, par exemple, jouent un rôle important dans le processus d'élimination de tumeurs. Après migration au site tumorale, les cellules spécifiques à un antigène de la tumeur exercent une activité de lyse et participe à la destruction de la tumeur (38). Les protocoles d'immunothérapies dites *adoptives* visent à renforcer la migration et l'activité de ces cellules (39).

Malgré les efforts considérables réalisés dans le développement des thérapies cellulaires, de nombreux défis restent à surmonter pour faire de ces thérapies alternatives des traitements de premières lignes. La translation des études pré-cliniques à l'homme reste difficile pour nombre de cas.

Un obstacle majeur à surmonter a trait au devenir des cellules transférées. Pour que le traitement soit efficace, les cellules thérapeutiques doivent, d'une part, persister suffisamment longtemps chez le receveur et, d'autre part, être à même de parvenir à l'endroit où se trouvent le tissu à réparer ou les cellules à éliminer (dans une stratégie anti-cancéreuse). L'évaluation du nombre de cellules transplantées, de leur localisation, de leur survie, de leur fonctionnalité, ou encore de leur capacité de division après transplantation sont autant d'informations qui permettrait une meilleure compréhension des mécanismes conduisant au succès ou à l'échec d'une thérapie.

L'étude du devenir des cellules thérapeutiques transférées repose traditionnellement sur des techniques indirectes et invasives. Par exemple, dans le cas de l'immunothérapies, des biopsies de tumeur ou une détection de cytokines sécrétées par les cellules immunitaires ou protéines versées par les cellules tumorales sont typiquement effectuées (38). Dans le cas de la transplantation de cellules d'ilôts, des tests métaboliques sont réalisés pour mesurer la fonction des cellules (40). Ces marqueurs cliniques offrent des informations utiles mais incomplètes pour évaluer l'efficacité d'une thérapie.

Pour répondre à ces limites, les équipes de recherche se sont alors tournées vers les méthodes d'imagerie non-invasives, sensibles et quantitatives permettant de visualiser les cellules thérapeutiques *in vivo* et à l'échelle du corps entier. Cette approche est essentielle pour mieux comprendre les mécanismes thérapeutiques et aider à l'optimisation des nombreux paramètres contribuant au succès ou à l'échec d'une thérapie cellulaire. Le rôle de l'imagerie pour quelques uns de ces paramètres est illustré dans le **tableau 1.2**. Il s'agit d'un exemple relatif à la thérapie cellulaire cardiaque mais dont les enjeux s'appliquent bien à tout type de thérapie cellulaire.

Dans ce cadre, et grâce à l'expérience acquise avec la scintigraphie des leucocytes, de nombreuses études de suivi de thérapies cellulaires se sont appuyées sur des stratégies de radiomarquage combinées à l'ima-

gerie TEMP ou TEP. Différentes études cliniques et pré-cliniques portant sur le suivi *in vivo* de cellules souches puis de cellules immunocompétentes sont présentées dans les deux paragraphes suivants.

Tableau 1.2 – Contribution de l'imagerie pour optimiser la thérapie cellulaire cardiaque. *Tableau traduit de l'anglais (41)*

Question	Rôle de l'imagerie
Voie d'administration la plus adaptée ?	Quantification de l'accumulation des cellules dans les régions cibles
Migration des cellules et viabilité ?	Acquisition d'images en série de la biodistribution
Efficacité thérapeutique ?	Lien entre le signal émis par les cellules et les marqueurs biologiques, physiologiques et fonctionnels
Type cellulaire le plus adapté ?	Comparaison des dynamiques et des effets fonctionnels des différents types cellulaires
Différentiation cellulaire ?	Imagerie des cellules en maturation <i>via</i> des gènes rapporteurs spécifiques

Application 1 : Cellules souches

Le **tableau 1.3** récapitule les différentes études de suivi de cellules souches basées sur des stratégies de radiomarquage. Un nombre important d'études expérimentales de la biodistribution de cellules souches a reposé sur un radiomarquage à l'¹¹¹In-oxine.

Globalement, il est montré que le radiomarquage à l'¹¹¹In-oxine est faisable jusqu'à une dizaine de jours post-administration avec une efficacité relativement élevée mais une stabilité limitée. Certaines études rapportent un relargage de l'activité hors des cellules (61–82% après 48–96 h) (48, 49, 47).

L'utilisation de radionucléides détectables en TEP, comme le ¹⁸F ($t_p=110$ min), le ⁶⁴Cu ($t_p=12,7$ h) ou le ⁸⁹Zr ($t_p=78,4$ h) ont émergé en raison des avantages en termes de sensibilité et résolution que cette technique d'imagerie apporte par rapport à l'imagerie TEMP.

Tableau 1.3 – Résumé des études pré-cliniques et cliniques pour le suivi de cellules souches radiomarquées (liste non-exhaustive). CSE = cellules souches embryonnaires.

Cellule	Hôte	Indication	Radiopharmaceutique	Référence
CD34-HPCs	Petit animal (rat)	Infarctus du myocarde	¹¹¹ In-Oxine	(42)
CSH	Petit animal (souris)	-	¹¹¹ In-Oxine	(43)
CSM	Petit animal (rat)	Accident vasculaire cérébral	^{99m} Tc-HMPAO	(32)
CSM	Petit animal (rat)	Infarctus du myocarde	¹¹¹ In-oxine	(44)
			^{99m} Tc-exametazime/PKH2	(33)
CSM	Canin	Infarctus du myocarde	¹¹¹ In-tropolone	(45)
CSM	Petit animal (lapin)	Greffe dans la moelle épinière	¹²⁵ I/ ¹³¹ I-transferrine	(46)
CSH	Petit animal (rat)	Infarctus du myocarde	¹¹¹ In-oxine	(47)
	Petit-animal (porcin)	Ischémie du myocarde	¹¹¹ In-oxine	(48)
CSM	Homme	Cirrhose avancée	¹¹¹ In-oxine	(49)
CMB	Homme	Infarctus du myocarde	¹⁸ F-FDG	(50)
CSH	Homme	Infarctus du myocarde	¹⁸ F-FDG	(13)
CSH	Cochon	Infarctus du myocarde	¹⁸ F-FDG	(20)
CSM	Gros animal (cheval)	Tendinopathie	^{99m} Tc-HMPAO	(51)
CSM	Petit animal (rat)	-	¹¹¹ In-oxine	(52)
CSM CSH	Singe	-	⁶⁴ Cu-PTSM	(53)
Ilôts Langerhans	Porcin	Diabète type I	¹⁸ F-FDG	(54)
Ilôts Langerhans	Petit animal (souris)	Diabète type I	¹⁸ F-FHBG	(55)
Ilôts Langerhans	Petit animal (rat)	Diabète type I	¹⁸ F-FDG	(56)
CSH	Petit animal (souris)	Diabète/Immunodéf.	^{99m} Tc-tropolone	(57)
CSM	Canin	Infarctus du myocarde	¹¹¹ In-Tropolone	(58)
CSM	Petit animal (souris)	-	⁸⁹ Zr-DBN	(59)
CSE	Petit animal (souris)	Infarctus du myocarde	¹⁸ F-FDG	(12)

La principale limite observée avec les radiopharmaceutiques ¹⁸F-FDG ou ⁶⁴Cu-PTSM est une élution importante du radiotracer au fil des heures, compliquant l'interprétation des images de biodistribution *in vivo* (6).

Application 2 : cellules immunocompétentes

Les essais de radiomarquage pour les cellules immunocompétentes sont moins nombreuses que pour les cellules souches (**tableau 1.4**). L'enjeu de l'imagerie dans ce cadre est d'évaluer la réponse anti-tumorale

au cours du temps, et d'optimiser l'immunothérapie en termes de quantité de cellules et de voies d'administration.

Le radiomarquage à l'¹¹¹In-oxine a été utilisé pour étudier le suivi de lymphocytes T (60), de cellules NK (jusqu'à 6 jours post-administration chez l'homme) (61, 62, 63) ou de cellules dendritiques (64).

Meier *et al.* (65) ont démontré la faisabilité du suivi clinique de cellules NK avec le radiomarquage au ¹⁸F-FDG jusqu'à trois heures après l'administration des cellules radiomarquées.

La stratégie de radiomarquage indirecte a également été utilisée pour suivre des lymphocytes T ou des cellules dendritiques (38, 66).

Pour des études de suivi sur un temps plus long, d'autres radiotraceurs TEP comme le ⁶⁴Cu-PTSM ou des anticorps marqués au ⁶⁴Cu ($t_p=12,7$ h) ou au ⁸⁹Zr ($t_p=78,4$ h) ont été utilisés pour le suivi de lymphocytes T et de cellules NK (67, 68, 69).

Charoenphun *et al.* (68) ont obtenu des images de meilleure qualité avec un marquage au ⁸⁹Zr-oxine qu'avec un marquage à l'¹¹¹In-oxine grâce à une meilleure rétention du traceur dans les cellules.

3.4 Limites du radiomarquage et problématique

Dans un certain nombre d'études, des écueils liés au radiomarquage ont été observés sur les images de biodistribution *in vivo* des cellules.

La radiotoxicité de l'¹¹¹In-oxine a très tôt été mise en évidence, du fait de l'émission d'électrons Auger et de CI (14,7 électrons Auger par désintégration) (73). Des études ont rapporté une altération de migration des leucocytes marquées à l'¹¹¹In-oxine au niveau des sites inflammatoires (74) et une diminution des capacités de chimiotaxie⁹ (75).

Au-delà des conséquences directes sur l'imagerie que peut causer une mortalité des cellules, la question de l'effet de cancérogénèse à long terme, notamment dans la sous-population lymphocytaire qui possède un potentiel clonogène apparaît importante (76, 77).

Dans le cas d'un radiomarquage à l'¹¹¹In-oxine, Berge *et al.* (77) ont observé que 95% des lymphocytes radiomarqués à des activités habituellement utilisées pour l'imagerie (5,5 MBq/1.10⁸ cellules) présentaient des aberrations chromosomiques. Certaines équipes ont isolé les polynucléaires afin de les marquer spécifiquement et de ne pas réinjecter au patient des lymphocytes irradiés. L'augmentation d'un risque de tumeurs lymphoïdes malignes associée au radiomarquage des leucocytes reste toutefois très discutée.

9. Mouvement non orienté d'une cellule ou d'un organisme en réponse à un stimulus chimique.

Tableau 1.4 – Utilisation de l'imagerie nucléaire dans le cadre d'une immunothérapie (liste non-exhaustive). CDMO = cellules dendritiques⁸ dérivées de la moelle osseuse. Elle joue le rôle de cellule phagocytaire et de cellules présentatrice d'antigène, lui permettant d'activer les lymphocytes (B et T) présents au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Cellule	Hôte	Indication	Radiopharm.	Référence
Lymphocytes LIT	Porcin	-	¹⁸ F-FDG	(37)
Lymphocytes NK	Homme	Carcinome à cellules rénales	¹¹¹ In-oxine	(63, 61)
Lymphocytes NK	Homme	Carcinome du colon	¹¹¹ In-oxine	(62)
Lymphocytes NK	Petit animal (rat)	-	¹⁸ F-FDG	(70)
Lymphocytes NK	Petit animal (souris)	Sarcome	¹⁸ F-FDG	(65)
Lymphocytes T	Petit animal (souris)	Lymphome non hodgkinien	¹³¹ I-FIAU	(71)
Lymphocytes T	Petit animal (souris)		¹⁸ F-FHBG	(38)
Lymphocytes T	Petit animal (souris)			(69)
Lymphocytes NK	Petit animal	Fibrosarcome	¹¹ C	(72)
Lymphocytes T	Petit animal (souris)	-	⁶⁴ Cu-PTSM	(67)
CDMO	Petit-animal (souris)	-	¹⁸ F-HFB	(66)
Cellule de myélome	Petit animal (souris)	-	⁸⁹ Zr-oxine	(68)
Lymphocytes T	Xénogreffe tumorale	-	¹¹¹ In-oxine	(60)
Cellules dendritiques	Homme (Phase I/II)	-	¹¹¹ In-oxine, ^{99m} Tc-HMPAO	(64)

Les effets cytotoxiques des radiotraceurs à l'¹¹¹In sont également préoccupants pour le suivi de cellules souches. La plupart des études montrent un impact négatif de ce type de radiomarquage sur la viabilité, et les capacités fonctionnelles des cellules (48, 42). À 10 Bq/cellule, une perte significative de l'activité métabolique et de la migration a été observée par Gildehaus *et al.* (52). Pour une activité de 4,98 MBq/1.10⁶ cellules, plus de 80% des cellules avaient perdu leur viabilité sur 2 semaines de suivi (49). Une perte de viabilité et de prolifération ainsi qu'une prise de greffe limitée après administration des cellules (30 MBq/1.10⁶ cellules) ont été observées (43, 42). Par ailleurs, Mirpour *et al.* (78) soulignent que l'observation d'une augmentation du signal dans la région réticulo-endothéliale pourrait être liée à la phagocytose de cellules souches non viables par les cellules réticulo-endothéliales.

Un point discordant concerne le seuil d'activité avant l'apparition d'effets. Par exemple, l'activité minimale d'¹¹¹In-tropolone détectable, sans induction d'effets sur les CSM, a été estimée à 0,14 Bq/cellule (79) dans

une étude et 30 Bq/cellule dans une autre (80).

L'impact du radiomarquage de leucocytes au ^{99m}Tc -HMPAO semble moins sévère mais significatif. Les résultats présentés dans Merz *et al.* (81) ont montré que des lymphocytes marqués au ^{99m}Tc -HMPAO à une concentration de 9 MBq/ 1.10^8 cellules perdaient 20% de leur capacité proliférative.

Une étude réalisée sur des CSM avec du ^{99m}Tc par Detante *et al.* (32) rapporte une diminution de la fraction de survie clonogénique dès 5 Bq/cellules. Les auteurs soulignent que l'altération de la capacité des cellules radiomarquées à proliférer doit être considérée avec attention, puisque cela peut affecter leur bénéfice thérapeutique.

Une accumulation de l'activité dans les poumons a également été observée pour les cellules CSM marquées au ^{99m}Tc -HMPAO administrées par voie intraveineuse (33). Seulement 1% des cellules transplantées a été retrouvé au niveau de l'organe cible (coeur), 4h après l'infusion.

Concernant l'imagerie TEP, les études de suivi ont principalement reposé sur l'utilisation du ^{18}F -FDG. Il est important de souligner que, du fait de l'émission d'un β^+ , la dose délivrée par un émetteur comme le ^{18}F sera sans doute plus importante que celle délivrée par des radionucléides comme l' ^{111}In ou de ^{99m}Tc à activité égale, ce qui renforce l'intérêt de la question de la radiotoxicité des émetteurs β^+ .

En principe, la meilleure sensibilité de la TEP rend possible l'obtention d'images de qualité équivalente à celles de la TEMP en marquant les cellules avec une quantité d'activité plus faible (41, 82). Pourtant, les activités ^{18}F -FDG utilisées pour le radiomarquage sont généralement très élevées (supérieures à 100 MBq). Le **tableau 1.5** présente les valeurs d'activité totale, d'activité volumique et de temps d'incubation utilisées pour le radiomarquage de cellules (leucocytes majoritairement) au ^{18}F -FDG dans une vingtaine d'articles. Les contrôles effectués pour évaluer la radiotoxicité du marquage sont également indiqués.

On observe que dans la plupart des études concernant les leucocytes, l'évaluation des effets du radiomarquage a reposé sur un test de viabilité au bleu de trypan, immédiatement après radiomarquage ou à des temps précoces. Néanmoins, si le test au bleu trypan est couramment présenté comme une méthode permettant d'évaluer la viabilité cellulaire, il ne met en évidence qu'une intégrité membranaire des cellules, qui ne préjuge ni de la viabilité des cellules au sens radiobiologique du terme, ni de la conservation de leurs propriétés fonctionnelles.

Pour des activités de l'ordre de 440-496 MBq/mL, les résultats de viabilité supérieurs à 98% obtenus par (83) suggèrent que l'impact du marquage est négligeable, alors que pour des activités volumiques considérablement plus faibles, des dommages sévères aux lymphocytes ont été relevés par ailleurs. Par exemple, (84) ont observé une augmentation des mutations chromosomiques et une réduction de la capacité proliférative pour une activité de 40 MBq/mL (0,14–0,28 MBq pour 1.10^6 cellules).

Bien qu'il y ait beaucoup d'études TEP pour les cellules souches, les évaluations de la radiotoxicité du marquage au ^{18}F -FDG sont moins nombreuses. Certaines études, basées sur des tests de viabilité et des tests de fonctionnalités (migration, différenciation) n'ont pas mis en évidence d'atteinte fonctionnelle sévère liée au radiomarquage au ^{18}F -FDG (12, 85). Dans une étude réalisée par Ehlami *et al.* (86), la viabilité des cellules après marquage est restée supérieure à 90% mais une perte des capacités de prolifération a été observée. Une étude réalisée par Botti *et al.* (87) comparant la toxicité du marquage de lymphocytes T avec les radiopharmaceutiques ^{99m}Tc -HMPAO, ^{111}In -oxine et ^{18}F -FDG ont montré que l' ^{111}In -oxine et le ^{18}F -FDG induisaient une perte de l'activité cytotoxique des lymphocytes contre les cellules de carcinome visées.

Par ailleurs, les résultats de biodistribution de cellules d'îlots de Langerhans marquées au ^{18}F -FDG (≈ 20 MBq/mL) vont dans le sens d'une radiotoxicité significative du radiotraceur.

En effet, il a été montré que seulement 50% de la radioactivité contenue dans celles-ci se trouvaient au niveau du foie (organe cible) (54, 56, 88). L'interprétation des auteurs sur ce résultat est qu'il est possible que 50% des cellules ont été endommagées durant les 20 premières minutes après transplantation et que cela a entraîné le relargage de la forme métabolisée ^{18}F -FDG-6P piégée dans les cellules, puis une dilution dans le reste de l'organisme.

À partir de ce recueil d'études, on constate que les conditions de marquage sont très variables. Malheureusement, le manque de considération dosimétrique rend difficile l'analyse des données. On observe en effet que les effets biologiques sont généralement reliés à des activités (Bq/cellule) et non à des doses absorbées (Gy) (85, 80, 89, 52, 32). Ainsi, le seuil d'apparition des effets biologiques et l'implication des différentes variables de marquage (temps d'incubation, densité cellulaire, ...) dans l'induction des effets radio-induits restent encore confus.

Quelques études ont néanmoins adopté une approche dosimétrique pour évaluer l'impact du radiomarquage sur les cellules. Dans Elhami *et al.* (86), une estimation simplifiée de la dose reçue par les cellules a été réalisée par conversion de l'énergie moyenne du β^+ émis par le ^{18}F -FDG (0,211 MeV) en Gy. Dans une étude réalisée par Miñana *et al.* (84), la dose absorbée moyenne aux noyaux d'un lymphocyte marquée au ^{18}F -FDG a été calculée, en considérant uniquement l'activité incorporée dans le cytoplasme de la cellule cible, sans prendre en compte le tir croisé de la particule β^+ . Une dosimétrie à l'échelle cellulaire plus poussée a été réalisée par Zanzonico *et al.* (90) pour des lymphocytes T radiomarquées par incubation *in vitro* à l' ^{131}I -FIAU. Les contributions de dose provenant du noyau, du cytoplasme et du milieu de culture ont été considérées en supposant une incorporation instantanée de l'activité dans les cellules. La fonction

immunitaire des lymphocytes T a ensuite été corrélée avec la dose absorbée au noyau. Une dose de tolérance préliminaire (≈ 800 cGy) associée au radiomarquage des lymphocytes T pour l'étude de suivi *in vivo* a été dérivée à partir de ces calculs dosimétriques. Au-delà, il a été montré que les cellules marquées relarguaient de l'activité, ce qui conduisait à une augmentation du bruit de fond.

Ainsi, les calculs dosimétriques sont peu nombreux ou s'appuient sur des modèles généralement simplifiés. Il apparaît ainsi essentiel de développer des modèles dosimétriques complets et adaptés, prenant en compte les différentes variables de marquage, telles que la densité cellulaire, les dimensions de la culture, etc., afin de calculer de manière précise la dose absorbée aux cellules et établir une corrélation de la dose aux effets la plus juste possible.

Tableau 1.5 – Paramètres de radiomarquage au ^{18}F -FDG utilisés dans différentes études de la littérature et effets sur les cellules (liste non-exhaustive).

Cellule	Activité vol. (MBq/mL)	T_{incub} (min)	Type de contrôle	Résultat	Référence
Leucocytes	296-370	30	-	-	(83)
Leucocytes	90-510	30	Viabilité	>96%	(91)
Leucocytes	296	30	Viabilité	NC	(26)
Leucocytes	616,6	30	Viabilité Chemotaxie Phagocytose	>99% Pas d'effet Pas d'effet	(19)
Leucocytes	148-296	20	Viabilité	98,5-99,9% à 1,5h 84-87% à 4h	(25)
Leucocytes	440-493	30	Viabilité	98±1%	(92)
Leucocytes	0,1-27	30	Viabilité	97%	(21)
Leucocytes (66% de CD34+)	10	30	Viabilité	92-96%	(50)
Leucocytes	82	25	test de génotoxicité Prolifération Viabilité	Nb de MN x48 Forte inhibition à J3 >95%	(84)
Lymphocytes T			Viabilité Activité cytotoxique		(87)
Cellules NK	170	60	Viabilité	86% à 1h 88% à 12h 86% à 24h	(65)
Cellules NK	1665	60	Viabilité test cytotoxique	>90% à 2h Pas d'effet	(70)
EPC	74	30	Viabilité Migration Phenotype	92% à 0,5h 75% à 24h 72,1% à 5j Pas d'effet Pas d'effet	(93)
ADSC	2,5-10	90	Viabilité Prolifération Dommages à l'ADN Différentiation Sécrétion cyto-kines	>90% Inhibition à J3 (A_{max}) 1,5-15,3% Pas d'effet Diminution signif. (4,15 MBq/mL)	(86)

3.5 Enjeux de la thèse

Comme nous l'avons vu précédemment, lors du radiomarquage *in vitro*, les cellules sont susceptibles de recevoir une dose non négligeable, pouvant altérer leur fonctionnalité et induire une mort cellulaire.

Cela peut conduire d'une part à une mauvaise interprétation des images ou une perte globale de la qualité d'image, liée à une sous-estimation ou une sur-estimation de la quantité de cellules accumulées dans un volume donné. D'autre part, d'un point de vue sanitaire, des questionnements subsistent quant au risque d'une prolifération anormale de cellules endommagées (**figure 1.4**).

Pour un radiopharmaceutique et un type cellulaire donnés, il apparaît donc essentiel d'évaluer au préalable les effets biologiques radio-induits pour mieux comprendre les implications chez l'homme.

Cependant, dans la littérature, les données existantes sont assez disparates. Il y a d'abord une variabilité dans le choix des paramètres de marquages, qui, combiné à une absence d'évaluation dosimétrique ou une évaluation imprécise, rend difficile la comparaison des études entre elles. D'autre part, les tests réalisés pour évaluer les effets biologiques et les temps d'analyse post-marquage varient également et ne sont pas toujours adaptés. La mesure de la survie à des temps trop précoces, notamment, ne suffit pas à caractériser le devenir des cellules.

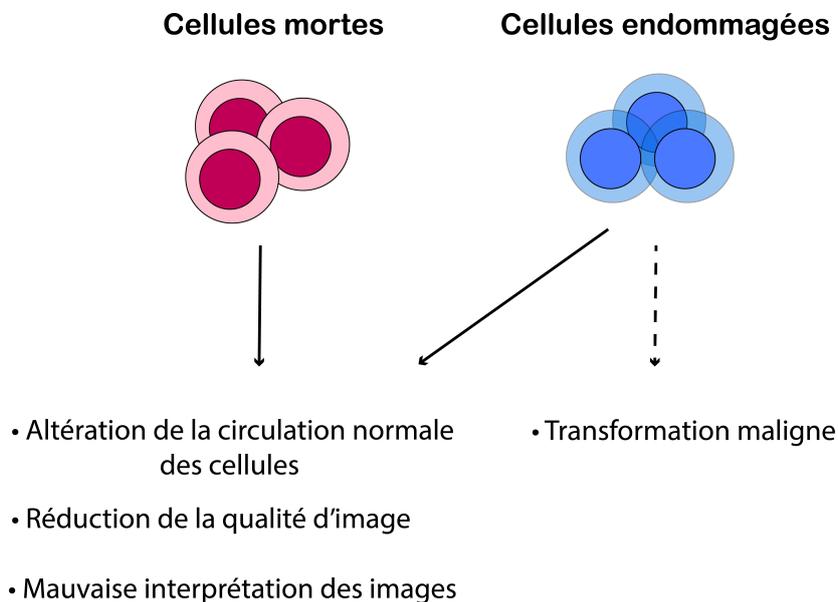


FIGURE 1.4 – Potentielles conséquences de la mort de cellules ou de l'endommagement de cellules induites par le radiomarquage dans le cadre d'un suivi de cellules par imagerie nucléaire.

Un premier point d'amélioration consiste donc à mettre en place une dosimétrie adaptée afin de fournir le référentiel nécessaire à l'étude des effets. Le passage de l'activité à la dose absorbée n'est pas trivial en dosimétrie interne. De multiples variables comme la répartition de l'activité et la distribution spatiale des

cellules entrent en jeu. La prise en compte de toutes ces variables dans le calcul de la dose représente un défi en soi.

Un deuxième enjeu est de mettre en place des tests biologiques appropriés pour caractériser les effets radio-induits et évaluer les conséquences potentielles pour le patient.

Afin d'adresser les problématiques identifiées et de définir les développements qui seront appliqués dans ce travail de thèse, il nous est paru indispensable dans la suite de ce chapitre de présenter :

1. Le formalisme de la dosimétrie interne à l'échelle cellulaire et les outils de calcul, en mettant l'accent sur la dosimétrie des émetteurs β ;
2. Les concepts fondamentaux de radiobiologie afin de mieux comprendre l'action des RI sur les cellules et les spécificités lors d'une irradiation suite à l'incorporation d'un radionucléide. Dans le cadre de notre étude, nous nous attarderons sur deux paramètres biologiques pertinents pour l'évaluation de la radiotoxicité d'un radiomarquage : la survie clonogénique et les dommages à l'ADN.

4 La dosimétrie des radiopharmaceutiques à l'échelle multi-cellulaire

4.1 Introduction

La dosimétrie des radiopharmaceutiques repose communément sur le formalisme développé par le comité du Medical Internal Radiation Dose (MIRD). Le premier formalisme du MIRD a été développé pour les besoins de la radioprotection lors d'applications diagnostiques en médecine nucléaire avec des modèles à l'échelle de l'organe. L'hypothèse générale est que l'activité est distribuée uniformément dans l'organe (94).

Les progrès réalisés en imagerie ont permis d'améliorer la détermination de l'activité à l'échelle du voxel¹⁰. L'identification de sous-structures et de régions spécifiques de certains organes a permis de développer des modèles géométriques plus représentatifs prenant en compte les hétérogénéités de distribution de l'activité à l'intérieur d'un organe. Plusieurs pamphlets du MIRD abordent ces aspects (95, 96).

En outre, un tissu peut être composé d'une variété de cellules ayant des radiosensibilités très différentes et contenant une quantité d'activité très différente également, selon le radiopharmaceutique. Selon le parcours du radionucléide et la configuration, la dose absorbée moyenne à l'échelle de l'organe ou du voxel peut ne plus être pertinente pour prédire les effets biologiques radio-induits. Des modèles à l'échelle cellulaire et multi-cellulaire ont été développés pour répondre à ces besoins.

10. Elément de volume parallélépipédiques, appelés voxels pour VOLUME X ELEMENTS (par analogie aux pixels – PICTURE X ELEMENTS – définis en deux dimensions). Ils sont réalisés à partir d'images obtenues par TDM ou par IRM.

Le comité du MIRD a publié en 1997 un ouvrage spécifique à la dosimétrie à l'échelle cellulaire, représentant une première étape dans la simplification des calculs de la dose absorbée moyenne à la cellule suite à l'incorporation d'un radionucléide (97).

Après une présentation des équations du MIRD, seront discutés les différents contextes d'études *in vitro* dans lesquels la dosimétrie cellulaire est appliquée. Puis les différents modèles géométriques et méthodes de calcul seront développés.

4.2 Formalisme du MIRD

4.2.1 Généralités

De manière générale, la dosimétrie des radiopharmaceutiques consiste à calculer la dose absorbée à une région cible, c'est-à-dire l'énergie déposée par unité de masse dans le volume cible par les radiations émises dans les volumes sources au cours du temps. La dose absorbée (D) correspond à l'énergie (E) déposée dans un volume cible par unité de masse (M), et s'exprime en Gy (1 Gy = 1 J/kg) :

$$D(\text{Gy}) = \frac{E(\text{J})}{M(\text{kg})} \quad (1.1)$$

Selon le formalisme du MIRD, la dose absorbée (en Gy) à une région cible r_T (t pour *target*, c'est-à-dire cible en anglais) provenant de l'activité distribuée dans plusieurs sources r_S peut s'écrire (98) :

$$D(r_T, T_D) = \sum_{r_S} \tilde{A}(r_S, T_D) \times S(r_T \leftarrow r_S) \quad (1.2)$$

où $\tilde{A}(r_S)$ (en Bq.s) est l'activité cumulée (ou le nombre total de désintégrations) dans la région source r_S au cours de la période d'irradiation T_D et $S(r_T \leftarrow r_S)$ est la dose absorbée dans la région cible par unité d'activité cumulée, appelée facteur S (en Gy/Bq.s⁻¹).

Le facteur S est défini pour un couple de régions source-cible et un radionucléide. Il dépend de la géométrie du couple source-cible et du radionucléide utilisé. Dans cette équation, il est supposé que le facteur S est indépendant du temps, ce qui est convenable lorsque les masses et positions relatives des régions sources et cibles restent constants pendant la période d'irradiation. Le facteur S englobe la notion de fraction absorbée (géométrie) et d'énergie moyenne par transition nucléaire (physique), qui tient compte des différents types de rayonnements émis lors d'une désintégration. On peut l'expliciter par l'équation

1.3.

$$S(r_T \leftarrow r_S) = \frac{1}{M_{r_T}} \sum_i E_i Y_i \phi_i(r_T \leftarrow r_S) = \frac{1}{M_{r_T}} \sum_i \Delta_i \phi_i(r_T \leftarrow r_S) \quad (1.3)$$

où E_i l'énergie moyenne de la i ème transition nucléaire, Y_i correspond au nombre de transitions nucléaires de type i par transformation nucléaire, Δ_i est le produit des deux termes, *i.e.*, l'énergie moyenne émise par la i ème transition par transformation nucléaire exprimée en $\text{J.Bq}^{-1}.\text{s}^{-1}$; $\phi_i(r_t \leftarrow r_s)$ est la fraction absorbée, définie comme la fraction de l'énergie E_i émise de la région source r_s absorbée dans la région cible r_T et M_{r_T} est la masse de la région cible.

Cette formule s'applique à toutes les échelles - échelle macroscopique, échelle du voxel, échelle cellulaire. Dans notre étude, nous nous intéressons à la dosimétrie dans un contexte *in vitro*. Suite à l'ajout d'une activité, une fraction de l'activité peut se distribuer dans le milieu de culture, être internalisée dans les cellules et/ou se lier à la surface des cellules. Le formalisme spécifique de la dosimétrie à l'échelle cellulaire prenant en compte ces différentes régions est présenté dans le paragraphe suivant.

4.2.2 A l'échelle cellulaire et subcellulaire

La dose absorbée à une cellule cible D_t est la somme de l'auto-absorption ou dose auto-absorbée (la source et la cible sont confondues) et du tir croisé provenant des cellules voisines ou de l'environnement cellulaire (la cible et les sources sont différentes) (99).

Dans la suite de ce manuscrit, nous considérerons toutefois que le tir croisé représente la contribution des cellules voisines uniquement et distinguerons la dose provenant de l'activité dans le milieu extra-cellulaire comme étant la dose non-spécifique. En suivant le formalisme du MIRD, chaque composante peut être ensuite décrite en fonction de l'activité cumulée et d'un facteur S pour la combinaison source/cible appropriée, tel que :

$$D(t) = D_{auto} + D_{croisé} + D_{NS} = \tilde{A}_t \times S_{t \leftarrow t} + \sum_i^{N-1} \tilde{A}_s^i \times S_{(t \leftarrow s^i)}(d^i) + \tilde{A}_{NS} \times S_{t \leftarrow NS} \quad (1.4)$$

où \tilde{A}_t , \tilde{A}_s^i , \tilde{A}_{NS} sont respectivement l'activité cumulée dans la cellule cible (internalisée ou sur la surface), dans la i ème cellule source s , et dans le milieu extra-cellulaire. Les facteurs $S_{t \leftarrow t}$ et $S_{t \leftarrow NS}$ correspondent respectivement aux couples cellule cible/cellule cible et cellule cible/milieu-extracellulaire. Enfin $S_{(t \leftarrow s^i)}$ correspond au couple cellule cible/cellule source i pour une distance relative d_i .

Le tir croisé est donc une somme de contribution sur N cellules sources.

Les doses absorbées délivrées aux cellules au cours d'une irradiation ne pouvant pas être mesurées expérimentalement, différentes techniques existent pour caractériser les différents termes intervenant dans l'équation 1.4. Pour un couple source-cible, l'activité cumulée est obtenue en intégrant l'activité contenue dans la région source en fonction du temps. Le paragraphe 4.3 sera donc consacré aux méthodes permet-

tant de caractériser la distribution de l'activité dans les cellules et dans les compartiments cellulaires à un instant donné.

De plus, les facteurs S sont liés à la géométrie du problème, c'est-à-dire la distribution spatiale des cellules, et au parcours des particules. Les méthodes disponibles pour modéliser les systèmes cellulaires et simuler le transport des particules dans les cellules seront présentées respectivement aux paragraphes 4.4.1 et 4.4.2.

4.3 Activité cumulée

4.3.1 Mesure expérimentale de l'activité et calcul de l'activité cumulée

La mesure de l'activité incorporée dans les cellules et le milieu extra-cellulaire, après ajout d'un radio-pharmaceutique, est généralement réalisée à des temps différents afin d'établir une courbe d'activité en fonction du temps. L'activité cumulée dans chaque compartiment correspond alors à l'aire sous la courbe de l'activité dans la région source au cours du temps. Lors d'expérimentation *in vitro*, l'activité incorporée dans les cellules et dans le milieu extra-cellulaire (surnageant) est mesurée par comptage externe avec un détecteur adapté au radionucléide. Cette étape nécessite une séparation préalable des différentes régions sources. Il s'agit d'une étape délicate mais essentielle de la dosimétrie ; la fiabilité du calcul de la dose absorbée étant directement liée à la précision de l'activité cumulée dans les différentes régions sources sur la période considérée.

4.3.2 Distribution de l'activité

La mesure de l'activité incorporée dans les cellules par comptage externe donne une valeur moyenne sur l'ensemble de la population de cellules, ce qui ne permet pas de connaître les possibles variations de l'activité au sein des cellules. De plus, la détermination expérimentale de la répartition de l'activité au sein d'une population de cellules n'est pas aisée.

Pour les émetteurs de faibles parcours (α , Auger), les techniques d'autoradiographie (9, 76, 100, 101, 102) peuvent être utilisées pour évaluer la distribution de l'activité. Ces techniques offrent en général une représentation qualitative de la distribution d'activité, *e.g.*, une accumulation périphérique de l'activité dans un agrégat de cellules (9).

Neti *et al.* (102) ont toutefois pu mettre en évidence une distribution lognormale de l'activité, à partir de la distribution des traces de particules α issues de la désintégration du radionucléide ^{210}Po .

Le modèle normal ou lognormal est fréquemment utilisé pour la modélisation d'une distribution hétérogène de l'activité.

À l'échelle subcellulaire, la distribution de l'activité dans les différents compartiments des cellules peut aussi varier selon le radiopharmaceutique considéré. La quantification de l'activité dans les différents compartiments sont généralement réalisés par des procédures chimiques de fractionnement (9, 103) et plus rarement par des techniques de spectroscopie (67).

La prise en compte de ces différentes échelles d'hétérogénéités est particulièrement importante dans un contexte où l'auto-absorption est prépondérante car elles peuvent avoir un impact significatif sur la distribution de dose.

En revanche, dans un contexte où le tir croisé est prépondérant, la localisation subcellulaire a moins d'impact sur la dose absorbée et l'hypothèse d'une répartition uniforme de l'activité, c'est-à-dire une activité par cellule constante peut suffire.

4.4 Dose absorbée par unité d'activité cumulée (facteur S)

Le facteur S dépend du radionucléide, de la géométrie des régions cibles/sources considérées, de leur position relative et leur masse, ainsi que du mode de calcul.

Les deux paragraphes suivant présentent les modèles géométriques utilisés pour les calculs de la dose absorbée à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire et les différents modes de calcul du dépôt d'énergie.

4.4.1 Modèles géométriques

Cellule. Le modèle de cellule unique est utilisé pour calculer la dose auto-absorbée pour des radionucléides répartis dans différents compartiments cellulaires.

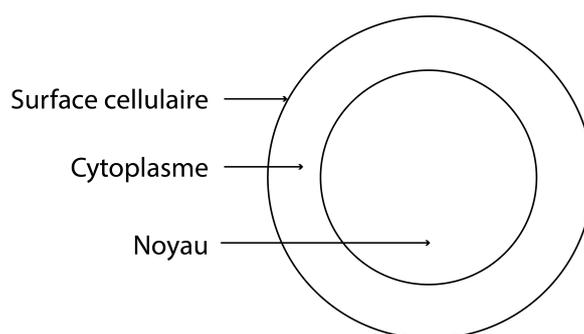


FIGURE 1.5 – Modèle de cellule à géométrie sphérique composée de trois compartiments : le noyau, le cytoplasme et la surface cellulaire.

Dans le MIRD (97), un modèle mathématique standard de la cellule est utilisé, se composant de deux sphères concentriques de densité uniforme de 1 g.cm^{-3} . Trois compartiments cellulaires sont identifiés : le noyau, le cytoplasme et la surface cellulaire (figure 1.5).

Dans les cas où la contribution de la dose auto-absorbée est importante, les asymétries dans la géométrie ainsi que les irrégularités morphologiques des cellules peuvent significativement impacter la dose absorbée au noyau des cellules ; il a été montré que cet effet était maximal pour les électrons de faibles énergies (5 keV) et pour la combinaison surface cellulaire (source) vers noyau (cible). Il peut alors être important de décrire la cellule de manière réaliste et détaillée, en utilisant par exemple des modèles mathématiques de formes variées (cône tronquée, parallélépipède, etc.) (104, 105) et voire même des géométries voxélisées à partir d'images acquises au microscope confocal (103).

Distribution spatiale multicellulaire. La description de géométries multi-cellulaires 2D et 3D est nécessaire au calcul du tir croisé.

La **figure 1.6** illustre les principaux modèles géométriques multi-cellulaires considérés. Les modèles mathématiques peuvent décrire :

- Une paire de cellules,
- Une distribution de cellules en 2D, typiquement pour modéliser une monocouche de cellules lors de tests clonogéniques *in vitro* (106, 103),
- une distribution de cellules en 3D, typiquement pour modéliser des agrégats de cellules tumorales.

Les distributions multi-cellulaires sont généralement formées en positionnant les cellules selon un arrangement en réseau (généralement cubique ou hexagonal compact) ou de manière aléatoire. La configuration en réseau hexagonal compact a été particulièrement utilisée pour modéliser des micrométastases, dans un contexte de radioimmunothérapie (107, 108, 109).

Plus récemment, des modèles géométriques voxélisés en 3D à partir de sphéroïdes en 3D de cellules cultivées *in vitro* ont également été développés (110). Le **tableau 1.6** récapitulent les différentes géométries existantes et les références associées.

Tableau 1.6 – Modèles multicellulaires utilisés pour le calcul de dose. Hexa. signifie hexagonal ; cs signifie cubique simple.

Type de géométrie	Configuration	Dimension	Réf.
Mathématique	Réseau cs	Monocouche (2D), cluster 3D	(111, 112, 113, 99, 114)
	Hexa. compact	Monocouche (2D), cluster 3D	(115, 35)
	Couronne sph.	3D	(116)
Mathématique	Aléatoire	Monocouche (2D), cluster 3D	(9, 117, 118)
Voxélisé	-	cluster 3D	(110, 119)

Modèles de distribution multi-cellulaires

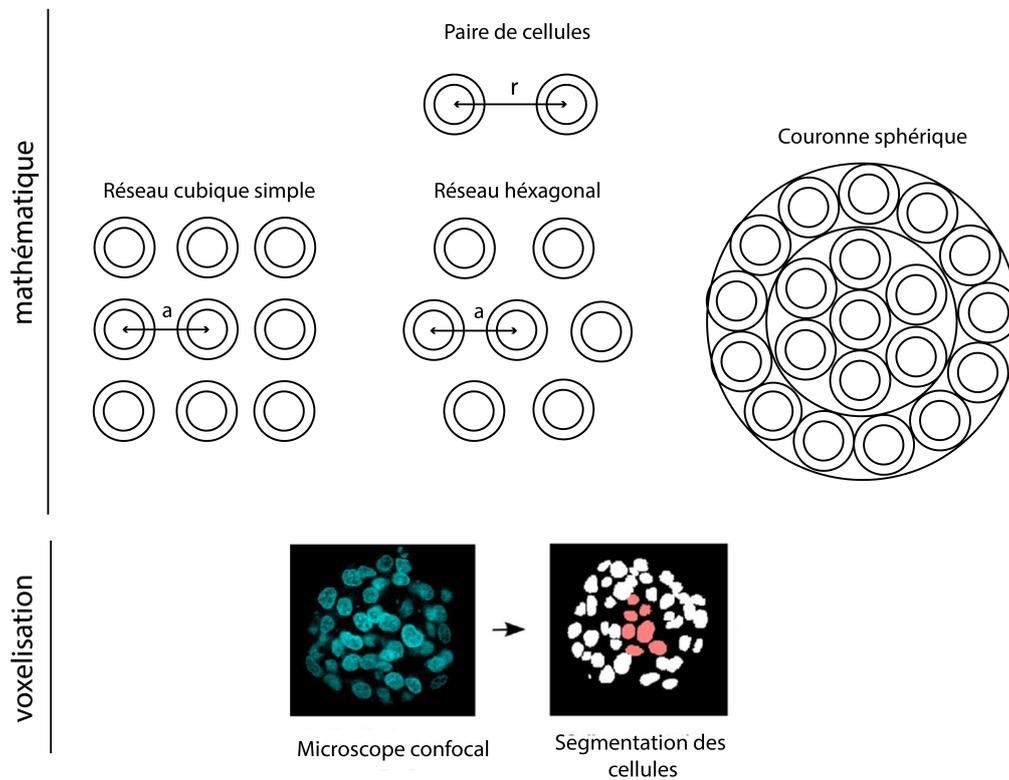


FIGURE 1.6 – Principaux modèles multi-cellulaires utilisés pour les évaluations dosimétriques à cette échelle. r représente la distance entre les deux cellules ; a correspond au paramètre de réseau.

4.4.2 Mode de calcul du dépôt d'énergie

La dernière étape nécessaire à l'obtention d'une estimation des doses absorbées délivrées dans la géométrie par une distribution d'activité est l'estimation des dépôts d'énergie. Plusieurs méthodes existent pour simuler le transport des particules dans la géométrie, à savoir les méthodes analytiques, les simulations Monte-Carlo et l'utilisation de dose-point kernels (DPK). Les principes de ces trois méthodes sont présentés dans les paragraphes suivants.

Approche analytique. Le calcul de la dose pour une désintégration peut être calculé par une approche analytique à partir des pouvoirs d'arrêt des particules émises et de leur spectre en énergie.

Mathématiquement, pour chaque particule mono-énergétique i , la fraction absorbée $\phi_{r_t \leftarrow r_s, E_i}$ peut s'écrire :

$$\phi_{r_t \leftarrow r_s, E_i} = \int_0^\infty \psi_{r_t \leftarrow r_s}(x) \frac{1}{E_i} \frac{dE}{dX} \Big|_{X(E_i)-x} dx \quad (1.5)$$

où E_i est l'énergie initiale de la i ème particule, $\psi_{r_t \leftarrow r_s}$ est le facteur géométrique, et $\frac{dE}{dX} \Big|_{X(E_i)-x}$ est le pouvoir d'arrêt évalué à $X(E_i - x)$, la différence de distance entre la portée de la particule d'énergie E_i et

x la distance parcourue par la particule.

L'équation 1.5 est en fait une convolution entre un facteur géométrique (ψ) qui caractérise la distribution de la source dans le milieu et un terme de perte d'énergie ($\frac{dE}{dX}$). Pour calculer la fraction absorbée totale, l'équation est intégrée sur tout le spectre du radionucléide, considérant les émissions mono-énergétiques et les spectres d'émission de la particule β .

Le facteur géométrique $\psi_{r_t \leftarrow r_s}$ représente la probabilité moyenne qu'un vecteur de longueur x aléatoirement dirigé, à partir d'une position aléatoire dans la région source r_s , termine son parcours dans la région cible r_t (figure 1.7). Pour les électrons, les valeurs de pouvoirs d'arrêt sont estimées à partir de l'équation de Cole qui relie l'énergie et la portée d'une particule (120, 121).

Ceux-ci sont calculés en supposant que la perte d'énergie (potentielle et cinétique) d'une particule primaire par collision inélastique est déposée de manière rectiligne le long de sa trajectoire, en négligeant les fluctuations. C'est le principe de l'approximation de ralentissement continu.

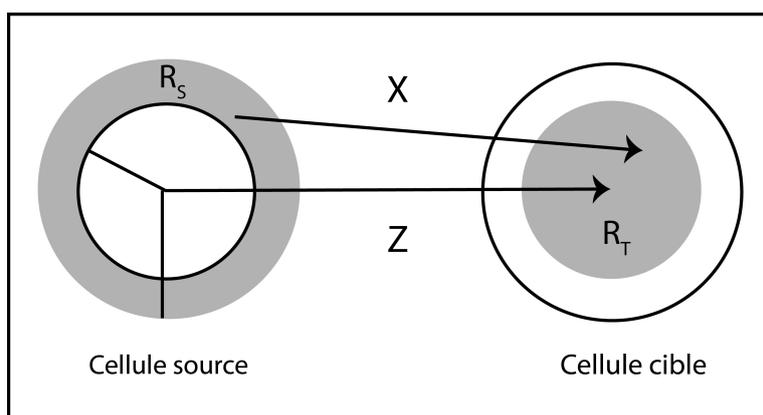


FIGURE 1.7 – Le facteur géométrique est la probabilité moyenne qu'un vecteur de longueur x aléatoirement dirigé, à partir d'une position aléatoire dans la région source r_s , finisse dans la région cible r_t .

Approche Monte-Carlo. Les dépôts d'énergie dans une géométrie peuvent être estimés de manière plus précise à partir de calculs Monte-Carlo.

De manière générale, la méthode Monte-Carlo désigne l'ensemble des techniques qui utilisent la génération de nombres aléatoires pour calculer une grandeur. Les tirages de nombres aléatoires permettent d'échantillonner des distributions de probabilité caractéristiques du problème. Le développement de codes de calcul Monte-Carlo s'est multiplié ces 60 dernières années notamment dans le domaine du médical et de la radioprotection afin de simuler le transport de particules dans la matière de manière réaliste et d'estimer des grandeurs telles qu'une dose déposée dans une région cible.

La méthode Monte-Carlo appliquée au transport des particules consiste à créer un grand nombre de parti-

cules incidentes et à suivre chacune d'entre elles au fur et à mesure de sa progression dans les différents milieux traversés. Chaque "histoire" créée tient compte des différentes interactions des particules avec la matière qui sont définies mathématiquement sous la forme de fonction de densité de probabilité de variables aléatoires. Ces fonctions sont déterminées par les sections efficaces différentielles d'interaction, obtenues expérimentalement par les laboratoires de physique nucléaire et diffusées sous forme de bibliothèques. Elles caractérisent l'histoire d'une particule à partir du libre parcours moyen entre deux interactions successives, du type d'interaction, de l'énergie perdue et de l'angle de déviation ainsi que les caractéristiques des éventuelles particules secondaires créées.

La combinaison de l'échantillonnage numérique des distributions de probabilité et de la génération de nombres pseudo-aléatoires permet de simuler la trajectoire d'une particule.

Le dépôt d'énergie dans un volume défini est obtenu à partir de la simulation d'un grand nombre de particules primaires (dit « histoires »). Cette méthode est adaptée à tout type de géométrie, simple ou complexe, de milieu homogène ou hétérogène.

Dose-Point Kernel (DPK). Un dose-point kernel (DPK) représente la distribution radiale de la dose absorbée autour d'un point source isotropique dans un milieu homogène infini (122). Les DPK sont définis pour des électrons, des photons, des sources monoénergétiques ou des radionucléides à partir de mesures expérimentales ou de calculs (analytiques ou Monte-Carlo).

Le DPK normalisé représente la fraction absorbée ϕ dans une couronne sphérique d'épaisseur dr à une distance r autour d'une source ponctuelle d'électron monoénergétique avec une énergie initiale E_0 dans un milieu homogène à une densité ρ (123) :

$$F(r/r_0, E_0) = 4\pi r \rho r^2 \phi_{r_0} \quad (1.6)$$

où r_0 est le parcours maximal de l'électron, r la distance entre le point source et un point donné (101). Les DPKs pour les électrons monoénergétiques sont fréquemment utilisés pour les calculs de dose, dans les cas où la géométrie du système considéré est dans l'échelle de grandeur du parcours maximal des électrons et où le milieu peut être considéré comme homogène sur ce parcours.

Dans le cas d'une source volumique, la contribution de chaque point source est calculée et la distribution de la dose absorbée totale est finalement obtenue par convolution de la distribution d'activité par le DPK.

Les codes Monte-Carlo (ETRAN, EGS4, MCNP) sont bien adaptés pour le calcul de DPK (122, 124, 125, 123) ; les calculs reposent sur la modélisation d'une source ponctuelle et le calcul de dépôt d'énergie dans des couronnes sphériques autour de la source ponctuelle.

4.5 Association transport/modèle

4.5.1 Calcul des facteurs S

Les trois approches de calcul de dépôt d'énergie présentées peuvent être utilisées pour calculer les facteurs S nécessaires à l'application de l'équation du formalisme du MIRD (équation 1.4).

À l'échelle cellulaire, un facteur S définit, pour une unité d'activité cumulée, la dose absorbée déposée dans un compartiment d'une cellule cible en provenance d'une source distribuée de manière uniforme dans un compartiment de la cellule cible elle-même (facteur S d'auto-absorption) ou d'une autre cellule à distance (Facteur S de paires).

Dans la littérature, la méthode analytique a été largement appliquée au calcul de facteurs S d'auto-absorption et de facteurs S de paires pour une géométrie sphérique standard, principalement pour des radionucléides émetteurs β et Auger (126, 127). Les facteurs S d'auto-absorption calculés pour différentes combinaisons source/cible et tailles de cellules ont été publiés pour 287 radionucléides dans le MIRD n°38 (97).

Pour le calcul de facteurs S par simulation Monte-Carlo, les codes Monte-Carlo N-Particle (MCNP) (106, 128, 118), GEometry And Tracking (GEANT-4) (114, 129, 105, 130), PENetration and Energy Loss of Positrons and Electrons (PENELOPE) (110, 131, 103) sont utilisés.

D'autres codes Monte-Carlo comme CELLDOSE (132) ou PARTRAC (133) ont été développés par différentes équipes de recherche. Le mode de calcul DPKs a également été utilisé pour la génération de facteur S d'auto-absorption délivré par les électrons de radionucléides utilisés en diagnostic (134), ou pour estimer des facteurs S de paires à de grandes distances pour des radionucléides émetteurs β (118).

4.5.2 Calcul de la dose absorbée

Finalement, l'estimation de la dose absorbée totale peut être réalisée en calculant directement l'énergie déposée en chaque point de la géométrie par simulation Monte-Carlo pour une distribution d'activité donnée ou en utilisant des facteurs S.

Approche hybride. L'approche hybride correspond à l'implémentation explicite de la formule du MIRD (équation 1.4), où chaque contribution est déterminée à partir d'un ou plusieurs facteurs S pré-déterminés. Pour calculer le tir croisé à une cellule cible donnée, la distribution spatiale des cellules doit être connue. Les coordonnées spatiales sont généralement créées afin de calculer les distances entre la cible et toutes les autres cellules. Ensuite, les contributions de chaque cellule source sont sommées, à partir du facteur S de paires approprié.

Approche Monte-Carlo directe. Les méthodes Monte-Carlo peuvent être utilisées pour calculer directement la distribution des doses absorbées pour une géométrie et une distribution d'activité cumulée données. Tous les modèles géométriques présentés dans le paragraphe 4.4.1 peuvent y être implémentés. À l'échelle multi-cellulaire, cette approche Monte-Carlo directe est souvent utilisée pour modéliser l'ensemble d'un dispositif expérimental *in vitro*, comme par exemple une plaque de culture avec une monocouche de cellules (112, 108, 135).

4.5.3 L'outil MIRDCell

En collaboration avec le comité du MIRDCell, l'université Rutgers a développé en 2014 le logiciel MIRDCell (disponible en ligne : <http://mirdcell.njms.rutgers.edu/>), visant à faciliter le calcul de la dose absorbée à l'échelle cellulaire et à la modélisation de la réponse biologique (fraction de survie) pour un grand nombre de radionucléides et rayonnements mono-énergétiques de différents types. Ce nouvel outil a fait l'objet du pamphlet n°25 du MIRDCell (127).

Le logiciel propose des géométries 1D (paire de cellules), 2D (monocouche de cellules) et 3D (agrégats de cellules). Une approche de calcul de la dose standard est suivie. Dans un premier temps, les facteurs S d'auto-absorption et les facteurs S croisés sont calculés pour chaque cellule et chaque paire de cellules, respectivement, en utilisant une méthode semi-analytique selon l'approximation de ralentissement continu. Une activité est ensuite attribuée à chaque cellule et la dose absorbée pour chaque cellule, ainsi que la fraction de survie, sont calculées.

Il est possible de prendre en compte une répartition non homogène de l'activité au sein d'une population de cellules. L'utilisateur peut sélectionner le pourcentage de cellules radiomarquées et la forme de distribution de l'activité (uniforme ou lognormale) pour des distributions cellulaires.

Il faut noter toutefois que plusieurs variables ne sont pas prises en compte. Par exemple, la contribution de dose non-spécifique n'est pas considérée, le modèle cellulaire est limité au modèle sphérique, les cellules au sein d'un agrégat sont supposées de même taille et le choix de la configuration multi-cellulaire est limité. Pour des expérimentations *in vitro* plus complexes (distribution de cellules hétérogènes par exemple) ou impliquant un grand nombre de cellules, son utilisation n'est pas adaptée.

4.5.4 Considérations microdosimétriques

Un autre aspect à considérer lorsque l'on aborde la dosimétrie à l'échelle cellulaire est la nature stochastique du dépôt d'énergie. La dose moyenne déposée dans une cellule est pertinente lorsque les conditions d'équilibre électronique sont satisfaites par rapport à la quantité et le type de particules entrants et sortants d'un volume cible. C'est le cas généralement pour les rayonnements de faible TEL car un grand nombre de transitions sont nécessaires pour déposer une dose considérable. Toutefois, si la répartition de l'activité est

fortement hétérogène ou que la dose déposée dans une cellule est très faible, les variations stochastiques peuvent être importantes, et donc la dose absorbée moyenne pourrait ne pas être un bon indicateur de l'effet biologique. Ce phénomène est particulièrement accentué pour les radionucléides émetteurs α puisque ces particules déposent beaucoup d'énergie sur un faible parcours. Le concept de la microdosimétrie a ainsi été développé pour prendre en compte la nature stochastique des dépôts d'énergie pour un nombre faible d'évènements atteignant des cibles de petits volumes (136).

4.6 Optimisation de la dosimétrie des β

Nous avons vu que plusieurs types d'hétérogénéités pouvaient exister au sein d'une population de cellules ; des hétérogénéités au niveau de la géométrie et des hétérogénéités au niveau de la distribution d'activité. Suivant le nombre, le type et l'énergie des rayonnements émis par le radionucléide, les conséquences de ces hétérogénéités sur la distribution des doses absorbées peuvent varier. Le niveau de réalisme du modèle doit être pertinent par rapport aux dimensions relatives du système d'étude et du parcours des radionucléides.

Les particules β , du fait de leur long parcours par rapport à la dimension d'une cellule (en moyenne), déposent leur énergie de manière relativement homogène sur de longues distances par rapport aux dimensions d'une cellule, entraînant un tir croisé important. La distribution de l'activité à l'échelle subcellulaire a dans ce cas moins d'impact sur la dose absorbée. En revanche, le tir croisé étant lié à la distribution spatiale des cellules, une modélisation complète et réaliste de la géométrie de la culture cellulaire est nécessaire. Le calcul associé peut alors impliquer un nombre important de cellules (supérieur à 1.10^6 cellules) et ainsi être coûteux en temps.

Dans un contexte *in vitro*, où une activité est ajoutée à une culture de cellules, la dosimétrie est un pré-requis indispensable pour (i) évaluer les irradiations et fournir un référentiel permettant de comparer les expériences entre elles et (ii) établir un lien avec les effets biologiques en tenant compte des variables de configuration et de conditions de marquage.

La partie suivante est consacrée à une présentation des évènements consécutifs à une irradiation de cellules d'un point de vue radiobiologique et à la modélisation d'une réponse dose-effet. Des précisions méthodologiques seront apportées pour les effets qui nous intéressent par rapport aux applications de la thèse.

5 L'évaluation des effets biologiques *in vitro*

5.1 Interaction des RI avec la cellule

5.1.1 Cibles des RI

Chaque composante de la cellule peut être endommagée. Ces lésions apparaissent de manière naturelle par des processus endogènes, mais leur incidence augmente suite à des facteurs exogènes comme les RI.

Les cellules sont composées de trois structures principales : le cytoplasme et ses organites, la membrane cytoplasmique et le noyau qui contient l'acide désoxyribonucléique (ADN), support de l'information génétique de tous les êtres vivants. Les organites sont les différentes structures spécialisées contenues dans le cytoplasme impliquées dans des processus de synthèse métaboliques (par exemple mitochondrie, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) ou de dégradations métaboliques (par exemple endosome, lysosome, péroxysome).

La membrane cellulaire (137) et les mitochondries (138, 139) sont des cibles non négligeables des RI, notamment suite à l'action de rayonnements pour des faibles doses. Le noyau reste toutefois la cible la plus radiosensible. Il a été montré que les dommages causés par les RI dans le noyau cellulaire étaient 100 à 1000 fois plus toxiques que ceux créés dans les membranes ou dans le cytoplasme (140).

L'interaction d'un rayonnement avec une cellule entraîne une cascade d'évènements physiques, chimiques, biochimiques puis biologiques, qui sont présentés dans le paragraphe suivant.

5.2 Chronologie des évènements

La chronologie des évènements est illustrée **figure 1.8**.

La première **phase physique**, d'une durée inférieure à 10^{-14} secondes consiste au transfert de l'énergie du rayonnement incident à la matière biologique. L'énergie cédée est transférée au milieu par des ionisations et/ou des excitations d'atomes dont la densité d'énergie dépend de la nature du rayonnement. La notion de dosimétrie est basée sur la caractérisation de cette phase.

La **phase chimique et biochimique** correspond aux réactions chimiques consécutives aux réarrangements moléculaires produits lors de la phase physique. Cette phase se situe de 10^{-6} à 10^{-2} secondes après l'irradiation. Il y a deux modes d'actions possibles :

- Les RI interagissent directement avec une molécule de la cellule, provoquant son ionisation - on parle d'**effet direct**. Fortement instable, cette molécule va retourner à son état de stabilité en expulsant de l'énergie par fluorescence ou par rupture de liaison, ce qui entraîne la destruction ou l'altération de l'activité biochimique de la cellule,
- Les RI interagissent avec les molécules d'eau. Cette interaction, appelée radiolyse de l'eau, conduit à la création de deux radicaux libres hautement réactifs et instables $\text{OH}\cdot$ et $\text{H}\cdot$ qui peuvent ensuite diffuser aux différents constituants cellulaires dont l'ADN - on parle alors d'**effet indirect**. Ces deux modes d'action sont illustrés dans la **figure 1.8** dans le cas de l'endommagement de l'ADN.

La recombinaison des radicaux libres entre eux peut donner naissance à des entités telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (141). Les radicaux libres formés s'ajoutent à la concentration en radicaux libres de l'oxygène créés naturellement par les cellules, notamment lors du métabolisme respiratoire de la mitochondrie. On les appelle plus communément les espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species). Les radicaux libres, pour retrouver un état d'équilibre, vont oxyder les protéines, l'ADN et les membranes cellulaires, infligeant des lésions importantes, notamment en s'additionnant sur les doubles liaisons ou en arrachant des atomes d'hydrogène (142).

L'oxygène joue donc un rôle clé dans la survenue de lésions indirectes. Des cellules peu alimentées en oxygène (hypoxie) seront donc moins sensibles aux RI.

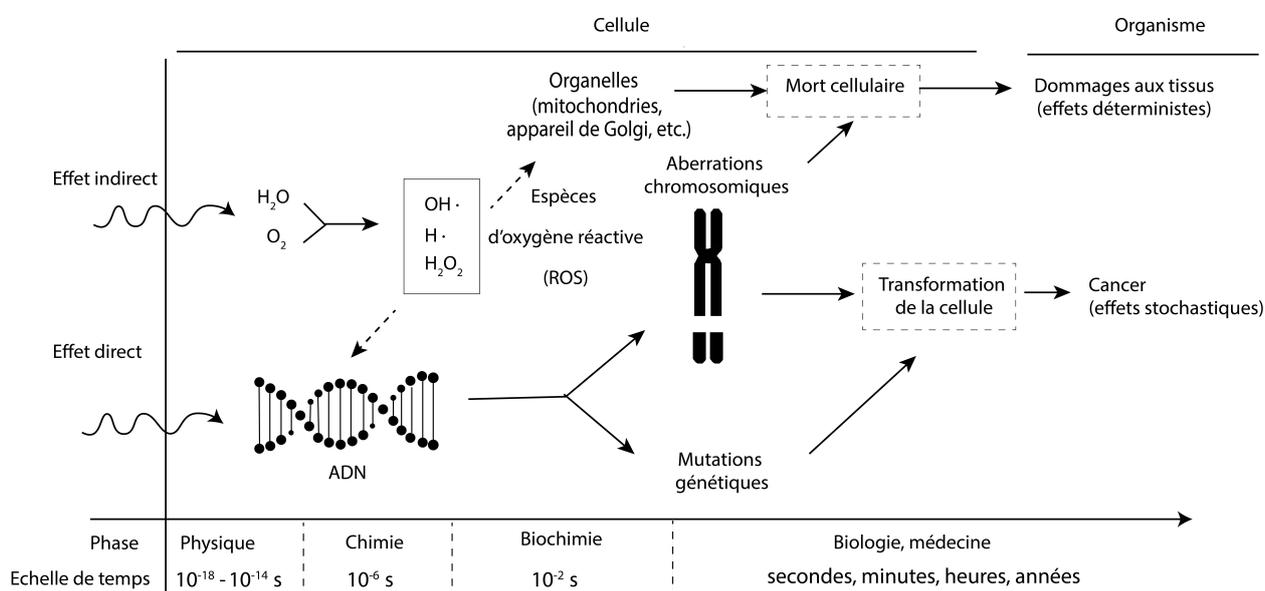


FIGURE 1.8 – Chronologie des événements induits par les RI dans l'organisme, aux différentes échelles de temps et de dimensions, et les principaux risques consécutifs. *Source : Lundholm et al. (143)*

La **phase biologique** correspond aux réponses biologiques provoquées par les lésions formées. En fonction du type de dommage radio-induit, de son étendue, la cellule va mettre en place une réponse adaptée, via des mécanismes de réparation des dommages. Les dommages non réparés peuvent conduire à des

transformations morphologiques, au niveau de l'ADN, à des mutations génétiques et à des aberrations chromosomiques ; avec des conséquences visibles à court, moyen ou long terme (de quelques secondes à des années).

5.3 Réponse cellulaire aux RI

5.3.1 Les types de lésions à l'ADN

La molécule d'ADN est une double hélice composée de deux brins enroulés l'un autour de l'autre et chaque brin est composé d'une succession de nucléotides qui sont un assemblage de trois molécules : un groupe phosphate, un sucre (désoxyribose) et une base azotée.

Les effets directs ou indirects de l'ADN par les RI peuvent conduire à différents types de lésions, parmi lesquelles les lésions de bases, les cassures simple brins (CSB) ou les cassures double brins (CDB) (144). Environ 10 000 dommages de base, 1000 cassures simple brins, et 40 cassures doubles brins sont induits dans une cellule par une dose de rayons X de 1 Gy (**figure 1.9**) (145).

	Domage au niveau d'une base	Cassure simple brin	Cassure double brin
Energie nécessaire	>1 eV/nm ³	>10 eV/nm ³	>100 eV/nm ³
Incidence /Gy/cellule	~ 10000	~ 1000	~ 40
Temps de réparation à 50%	5-10 min	10-20 min	>50 min

FIGURE 1.9 – Principaux dommages de l'ADN radio-induits et leurs spécifications physiques et biologiques (145) : le dépôt d'énergie minimal nécessaire pour la formation des cassures simple brin (CSB), cassures double brins (CDB) et dommages de bases, leur incidence par Gray de rayons X, leur demi-vie de réparation et la voie de réparation activée par ce type de dommage.

Ces différents types de dommages n'ont pas le même impact sur la cellule et ne seront pas reconnus et traités de la même manière. La plupart des lésions des bases et de CSB sont réparées fidèlement par un mécanisme d'excision-resynthèse, tandis que les CDB, bien que moins fréquentes, sont beaucoup plus

délétères pour le génome (146).

5.3.2 Détection et prise en charge des CDB

Les lésions de type CDB, qui sont les plus graves et les plus difficiles à réparer pour la cellule, sont classiquement considérées comme les principales lésions responsables de l'effet (cellulaire) léthal des radiations ionisantes.

Principe. Entre le moment où une CDB est induite et le moment où elle est réparée, plusieurs étapes impliquant de multiples protéines et enzymes de modifications existent. La première phase consiste à la **détection de la CDB** par des molécules dites *senseurs* (complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1)). Le complexe MRN est recruté au niveau du site de la cassure et recrute à son tour la **protéine kinase ATM** (pour *ataxia telangiectasia mutated*) (148).

Les protéines kinases possèdent un domaine catalytique qui leur permet de manière générale de transmettre des signaux à et dans la cellule. Leur mode d'action est la phosphorylation. Cela consiste à l'ajout d'un groupement phosphate sur des petites molécules ou sur des protéines, permettant ainsi de réguler leur action biologique.

ATM joue le rôle de *transducteur* et phosphoryle une variante de la famille des histones appelée H2AX des deux côtés de la CDB. La version phosphorylée de H2AX est alors appelée γ H2AX (149). ATM phosphoryle également des molécules dites *médiateurs* (BRAC1, 53BP1, MDC1) (150). Rapidement, cela entraîne une amplification de la phosphorylation H2AX jusqu'à des régions éloignées de la cassure (149), formant alors des "**foyers**" γ H2AX (*foci*).

Les transducteurs et médiateurs transmettent et amplifient ainsi l'information.

Finalement l'issue ultime de la réponse à l'altération de l'ADN est déterminée par l'action de multiples molécules appelées *effecteurs*; les principales conséquences étant l'arrêt du cycle, la réparation des dommages et la mort cellulaire. Le système de réponse de la cellule à une CDB est illustré **figure 1.10**.

Point méthodologique. Les *foci* γ H2AX sont typiquement utilisés comme marqueurs biologiques pour mesurer de manière indirecte la formation et la réparation des cassures double brins de l'ADN. Techniquement, les *foci* γ H2AX peuvent être détectés par immunofluorescence : un anticorps primaire est utilisé pour cibler spécifiquement la protéine d'intérêt, puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et dirigé contre l'anticorps primaire est utilisé.

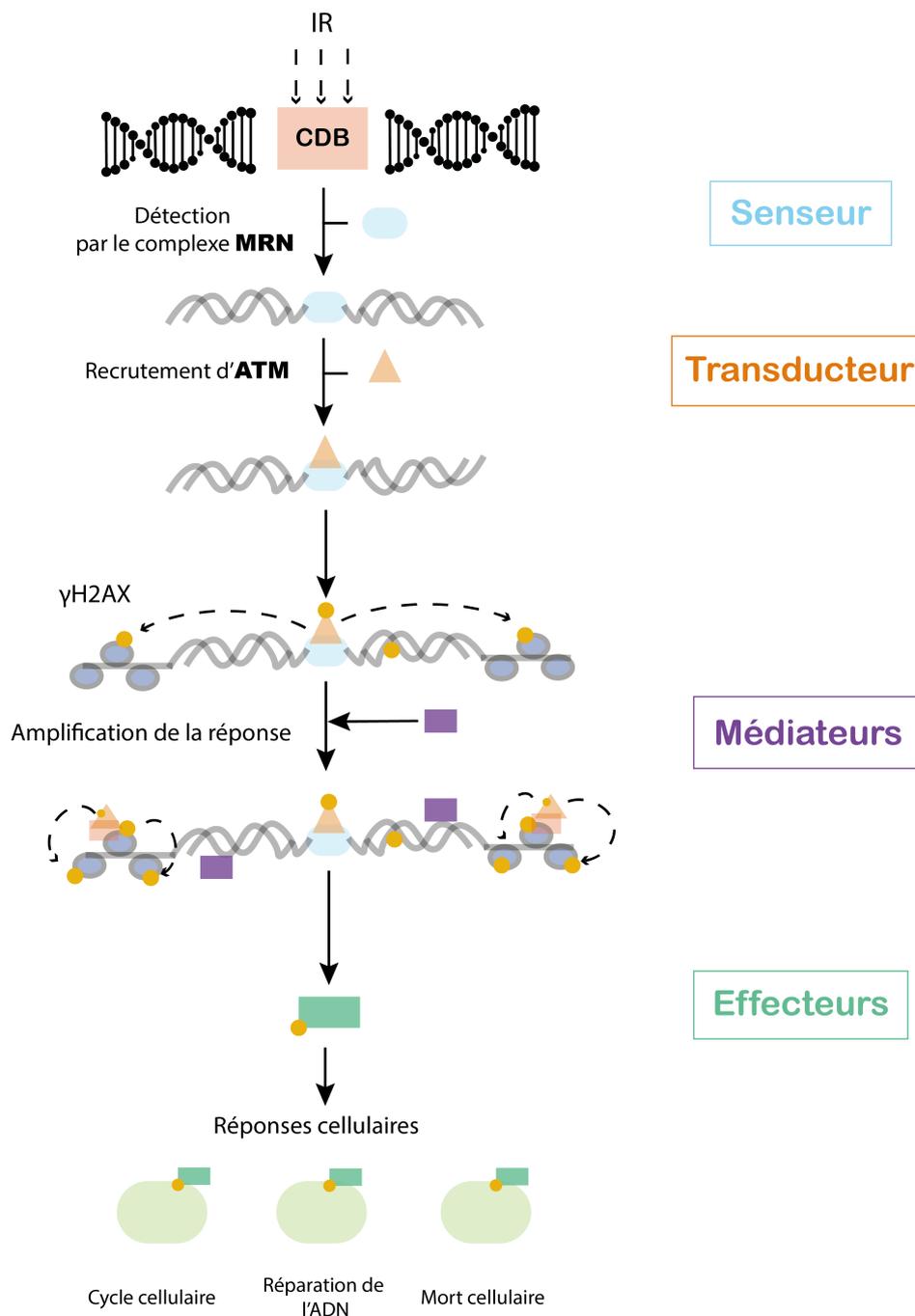


FIGURE 1.10 – Système de réponse au niveau cellulaire de CDB de l'ADN radio-induits. Réponse aux dommages de l'ADN induite par les cassures double brin (CDB). Les complexes senseurs MRN détectent les CDB et recrutent les protéines ATM. Le complexe ATM phosphoryle l'histone variant H2A, formant γ H2AX. γ H2AX entraîne une cascade de signalisation et la réponse s'amplifie. Une variété de protéines effectrices impliquées dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et la mort cellulaire s'active. *Figure inspirée de (53, 147).*

La microscopie à fluorescence permet ensuite de localiser et de dénombrer les *foci*.

Une autre technique, la cytométrie en flux permet également de quantifier les *foci*, par estimation d'une intensité globale dans un noyau. Cette méthode permet l'analyse rapide d'une grande quantité de cellules.

Le principe est le suivant : les cellules passent une par une à travers un laser ; en réponse un signal de fluorescence dont l'intensité est proportionnel au nombre de *foci* γ H2AX est réémis puis détecté. Elle offre l'avantage de mesurer les variations d'intensité de fluorescence γ H2AX en fonction de la position d'une cellule dans le cycle cellulaire. La méthode sera détaillée dans le chapitre 4.

5.3.3 Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire représente l'ensemble des étapes qui composent la vie d'une cellule. Si les cellules ne sont pas en division cellulaire, elles sont dans un état appelé quiescent, qui constitue la phase G0 (ou Gap 0) du cycle cellulaire. Lorsqu'elles rentrent dans un processus de division cellulaire, on distingue alors quatre phases successives (**figure 1.11**) (151) :

- La **phase G1** durant laquelle la cellule augmente en taille et augmente le volume de protéine et d'organelles ;
- La **phase S** (*Synthèse*) durant laquelle la cellule réplique son matériel génétique ;
- La **phase G2** durant laquelle la cellule organise les chromosomes pour rentrer en mitose ;
- La **phase M** (*Mitose*) durant laquelle la cellule se divise en deux cellules filles.

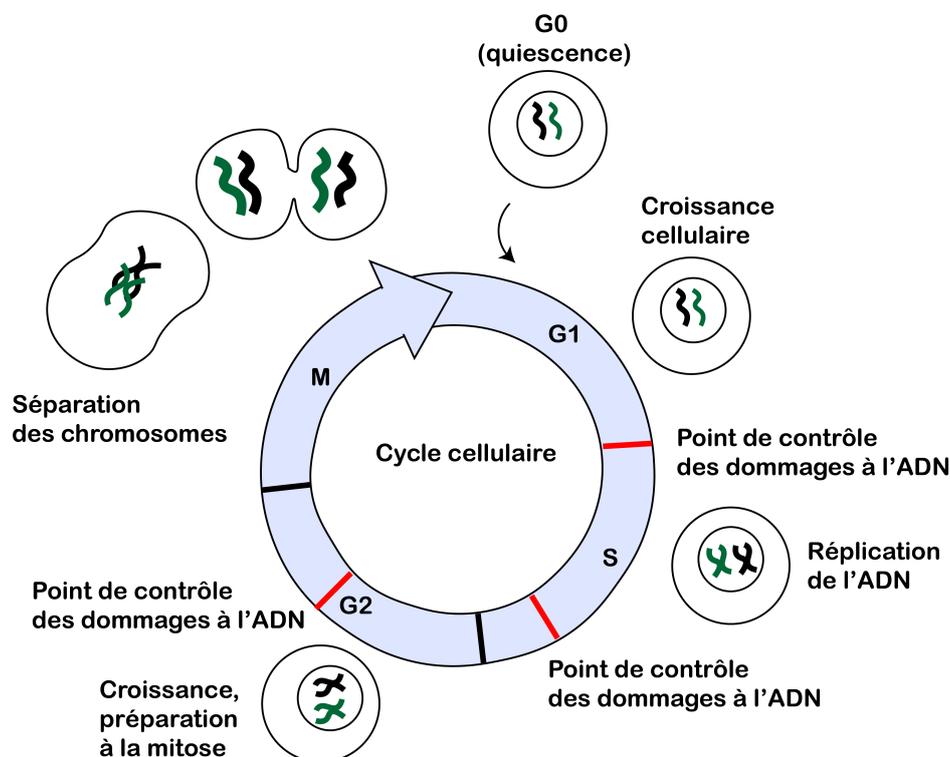


FIGURE 1.11 – Cycle cellulaire. La phase G1 est une phase de croissance cellulaire où la cellule accroît sa taille ; la phase S est une phase de duplication de l'ADN ; lors de la phase G2, la cellule finalise la duplication de l'ADN et la croissance cellulaire ; dans la dernière phase du cycle cellulaire, la phase M, la division cellulaire se produit (mitose), générant deux cellules filles. La progression du cycle cellulaire est suivie en continu *via* plusieurs points de contrôle.

La cellule durant l'interphase (G1, S et G2) présente l'ADN sous forme décondensée et sous forme de chromosomes condensés lors de la mitose. C'est la conformation de la chromatine, structure qui renferme l'ADN, qui définit ces états condensés (hétérochromatine) ou décondensés (euchromatine).

Afin que le processus de division cellulaire se déroule correctement, la cellule utilise des points de contrôle au travers du cycle, chacun ayant leurs propres rôles : vérification de la présence de conditions environnementales favorables (phase G1), de l'intégrité du génome (phases G1 et G2), du déroulement de la réplication (phase S) et de l'alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique (phase M). Les deux points de contrôle principaux se situent en G1/S et G2/M. Suite à une CDB, ces points de contrôle sont activés; la progression de la cellule lésée est bloquée ou retardée afin de permettre la réparation des dommages (152).

Régulation du cycle cellulaire suite aux dommages à l'ADN. L'arrêt du cycle cellulaire est régulé par l'activité d'une famille de protéines, la **kinase cycline-dépendante (CDK)**. Comme leur nom le suggère, les CDK ne sont actives qu'en présence de protéines cyclines. C'est le complexe cycline / CDK qui va agir en déclenchant différentes réactions.

Selon la nature des dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle est effectué selon une voie rapide ou lente. Selon, la voie rapide, l'activité CDK est inhibée par le complexe formé par ATM et les **protéines kinases effectrices CHK1 et CHK2**, induisant un arrêt cellulaire en G1 et/ou G2. La voie lente implique la **protéine p53**. Le complexe formé par ATM, CHK1 et CHK2 active p53 (153, 154). La protéine p53 régule la transcription de **p21, une protéine inhibitrice des CDK**, permettant un arrêt du cycle en G1 et/ou G2.

Mécanismes de réparation. La réparation des CDB repose sur deux mécanismes (149, 155) : la **suture** (en anglais Non-Homologous End-Joining ou NHEJ) et la **recombinaison homologue** (HR); *homologue* faisant référence aux deux brins d'ADN. Ces deux mécanismes sont régulés de façon distincte selon la phase du cycle cellulaire.

La recombinaison homologue est un mécanisme précis de réparation qui utilise une séquence homologue comme matrice de réparation. Ce mode se limite donc à la phase S et G2.

Le mode suture, quant à lui, est moins précis mais il ne nécessite pas de séquence homologue pour réparer une lésion de l'ADN. Il peut être utilisé pour réparer les cassures double brin à n'importe quel moment du cycle cellulaire. Cette voie est toutefois essentiellement utilisée lors de la phase G1 (148).

Point méthodologique. Pour connaître la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, l'ADN peut être marqué avec une sonde fluorescente (*e.g.*, iodure de propidium (IP) ou le 7-AAD). Le

contenu en ADN de chaque cellule est mesuré par cytométrie en flux.

Le profil de cycle cellulaire typiquement obtenu est montré **figure 1.12**. La majorité des cellules est en G0/G1, car c'est l'étape la plus longue formant ainsi un pic bien distinct. Les cellules en phase S ont une quantité variable d'ADN, ce qui explique leur distribution étalée. En phases G2 et M, l'ADN a doublé, se traduisant par une formation d'un second pic au double de la valeur de G1.

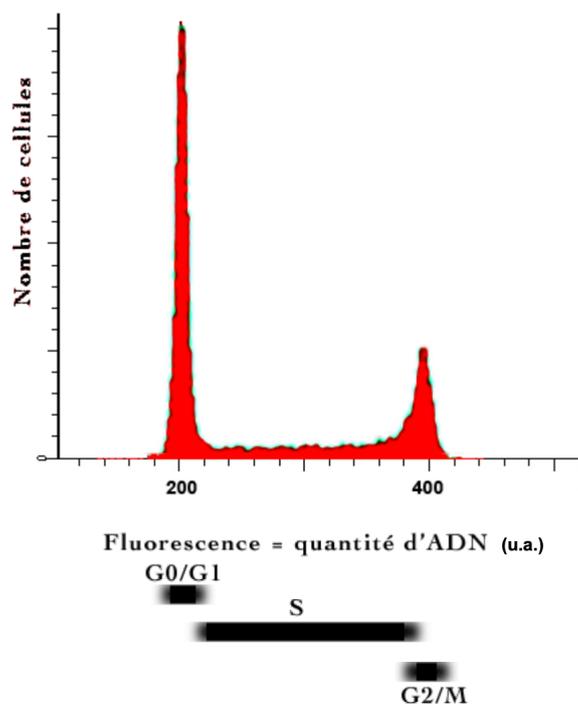


FIGURE 1.12 – Distribution typique des cellules dans les différentes phases obtenue par cytométrie en flux.

5.4 Devenir des cellules suite aux dommages à l'ADN

Si la nature et le taux des dommages sont compatibles avec une réparation fidèle, la cellule peut restaurer l'intégrité de son génome. Lorsque la nature et le taux de dommages radio-induits dépassent les capacités de réparation, la cellule s'oriente vers la mort cellulaire (effet déterministe). Une réparation infidèle peut permettre la survie mais être à l'origine de mutations ou de remaniements pouvant entraîner une mort différée (mort mitotique) ou pouvant évoluer à long terme vers des cancers radio-induits (effet stochastique).

Ainsi, trois principales conséquences sont possibles pour la cellule :

- Réparation fidèle et complète des dommages à l'ADN et poursuite des cellules dans leur cycle cellulaire,
- Réparation fautive et poursuite des cellules dans le cycle, influençant la fonctionnalité de la cellule et/ou celle de ses descendants (mutations),
- Réparation fautive et mort cellulaire.

Ces différentes issues (illustrées dans la **figure 1.13**) sont discutées dans les paragraphes suivants.

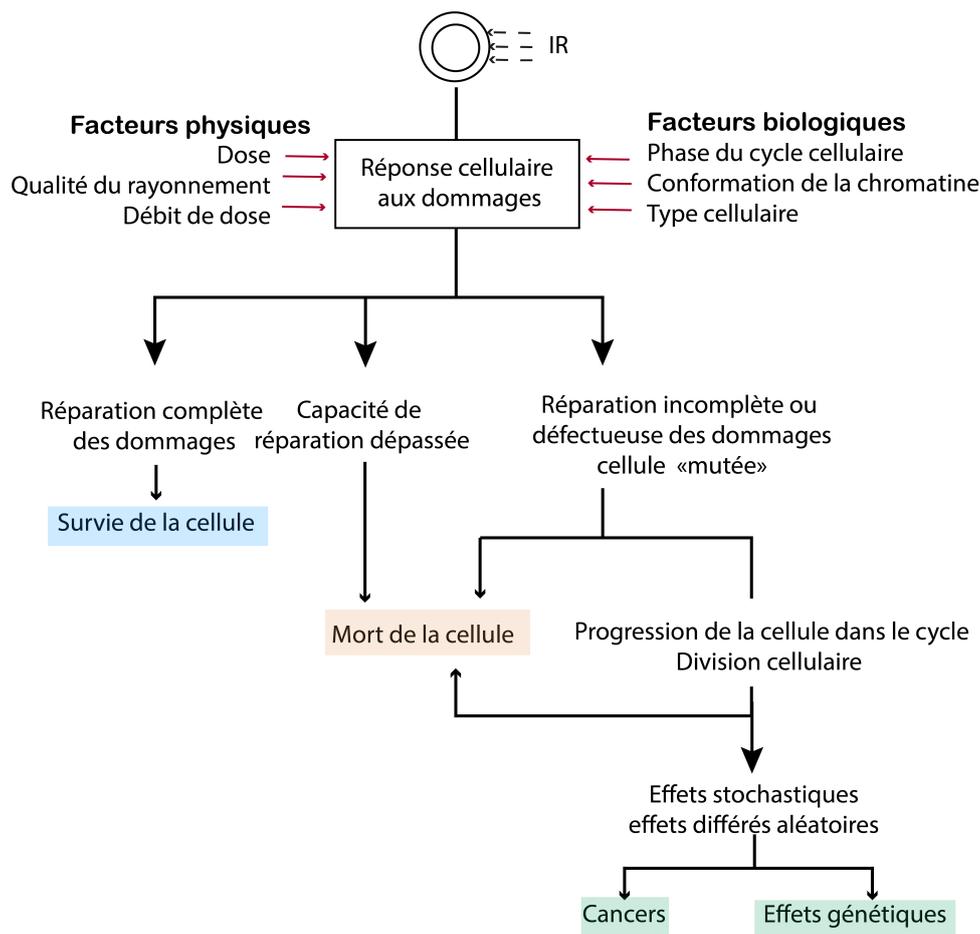


FIGURE 1.13 – Devenir d’une cellule lésée suite à une irradiation. Les facteurs physiques et biologiques influençant la réponse cellulaire sont indiqués.

5.4.1 Les principaux mécanismes de mort cellulaire radio-induits

En radiobiologie, la mort d’une cellule est définie par la perte irréversible de sa capacité à se diviser. Ainsi, une cellule apparemment intacte et encore capable de synthétiser des protéines ou de l’ADN, voire d’effectuer un petit nombre de mitoses, peut être toutefois radiobiologiquement morte.

La **mort mitotique** est considérée comme le type de mort radio-induit le plus répandu, et particulièrement pour les cellules tumorales déficientes en p53 (156). Elle résulte de l’induction prématurée de la mitose avant achèvement de la phase S et G2, dépendant d’un mécanisme complexe de la cascade de la signalisation, moins bien compris que l’apoptose et la sénescence. La mitose produit une ségrégation atypique du chromosome et division cellulaire causant la formation de micronoyaux.

D'autres formes de mort radio-induite ont été décrites. L'**apoptose** est une mort dite "programmée" déclenchée par une CDB non réparée (157). Contrairement à la mort mitotique, l'apoptose se produit le plus souvent en interphase (G1, G2). Elle se traduit, d'un point de vue morphologique, par un rétrécissement des cellules, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire et une proéminence de la membrane cellulaire (appelée *bleb*) (152). Deux voies de signalisations activent l'apoptose. Une voie est dépendante de la protéine p53 (158) et une voie est mise en oeuvre par les protéases appelées caspases. La mort par apoptose est plus fréquente chez les cellules hématopoïétiques et les cellules gastro-intestinales (143).

L'**arrêt irréversible en phase G1** est considéré également comme une forme de mort radiobiologique ; il est prédominant chez les fibroblastes normaux (159). Ce type de mort est comparé à une forme de vieillissement appelé **sénescence**. Les cellules en sénescence arrêtent de manière définitive de proliférer mais restent métaboliquement actives. Elles conservent aussi une activité sécrétoire impliquant une possible action sur les cellules voisines.

L'apoptose, l'arrêt irréversible en G1 et la mort mitotique participent ensemble à la mort radiobiologique.

Point méthodologique. La survie des cellules au sens radiobiologique est mesurée expérimentalement par un test de clonogénicité. Cette mesure reflète la capacité d'une cellule irradiée, et de ses descendantes, à réaliser des divisions après l'exposition, en nombre suffisant, pour former une colonie cellulaire. En pratique, des cellules en petites quantités sont mises en culture et le nombre de colonies formé est énuméré après une dizaine de jours.

5.4.2 Effets stochastiques

Des lésions non réparées n'entraînent pas forcément la mort cellulaire. Certains défauts peuvent être transmis aux cellules descendantes et entraîner des mutations, une instabilité génomique et éventuellement le développement d'un cancer (3).

Une **mutation génétique** est produite par une réparations fautive de l'ADN, sans modification de la structure chromosomique. Une mutation peut être "neutre" ou provoquer des anomalies dans la fonction cellulaire.

Une réparation fautive de CDB peut entraîner la formation d'aberration chromosomique. La formation d'une **aberration chromosomique** requiert que 2 CDB soient formées simultanément et proches l'une de l'autre.

La principale cause de la formation des aberrations chromosomiques est une mauvaise suture des deux morceaux de chromosomes *via* la voie de réparation NHEJ. Des données expérimentales en faveur d'un lien causal entre les CDB et l'induction de mutations génétiques, aberrations chromosomiques et transformation cellulaire ont été publiées (160).

Pour conduire à un **cancer**, la cellule doit aussi échapper au contrôle micro-tissulaire par les cellules voisines, puis au contrôle immunitaire de l'organisme. La destruction finale de la cellule étant beaucoup plus probable que sa survie. La probabilité d'induction d'un cancer augmente avec la dose reçue mais il n'y a pas de dose minimale connue correspondant à l'apparition d'un cancer.

5.4.3 Facteurs influençant la réponse cellulaire

Paramètres physiques. La dose absorbée n'est pas le seul paramètre physique influant sur la réponse biologique des cellules. La nature, le nombre et la complexité des dommages à l'ADN dépendent aussi de la **qualité du rayonnement**.

Pour les rayonnements à haut TEL (supérieurs à 10 keV/ μm), seulement trois à quatre trajectoires denses d'ionisations vont traverser chaque noyau par Gy d'énergie déposée, contre un millier de trajectoires environ dans un noyau par Gy pour les rayonnements à faible TEL (γ , X, β) (143). Du fait de cette très forte densité d'ionisation, les rayonnements à haut TEL induisent des dommages plus complexes au niveau de l'ADN et donc plus difficilement réparables.

Les différences d'effets biologiques selon la nature du rayonnement sont bien décrites à travers la notion d'EBR (effet biologique relatif). L'EBR est défini comme le rapport entre la dose d'un rayonnement de référence et du rayonnement étudié nécessaire pour induire le même effet biologique.

Le **débit de dose** est un autre paramètre physique influant la réponse biologique aux RI. En principe, plus l'irradiation est concentrée dans le temps, moins les cellules ont le temps de réparer les lésions radio-induites. Ainsi, un haut débit de dose entraîne en général un effet biologique plus important. Toutefois, un phénomène d'effet de débit de dose inverse (hyper-radiosensibilité) a été mis en évidence pour certains types de cellules, en condition d'irradiation externe à faible dose (161, 162) et dans le cas d'incorporation de radionucléides (163). Un défaut dans la détection de faibles taux de cassures d'ADN et la synchronisation de cellules à une phase du cycle radiosensible sont deux hypothèses proposées pour expliquer ce phénomène.

Paramètres biologiques. La réponse d'une cellule aux RI peut varier selon sa position dans le **cycle cellulaire** au moment de l'irradiation ; la radiosensibilité est maximale en fin de phase G2 et lors de la mitose M et minimale en S. Aussi, de nombreuses études ont montré que l'induction de CDB par des RI était influencée par la **structure de la chromatine**, reliant notamment l'augmentation du nombre de CDB à la relaxation de la chromatine (164, 165, 166).

La radiosensibilité des cellules souches et cellules différenciées est intrinsèquement différente. Les cellules souches adultes ont une radiosensibilité très variable : elles peuvent présenter à la fois une grande résistance à la mort cellulaire, possiblement pour prévenir l'apoptose incontrôlée qui peut compromettre la structure au niveau tissulaire, et en même temps une radiosensibilité suffisante pour éviter l'induction d'une instabilité génétique si les mutations formées ne sont pas bien réparées. Les cellules différenciées, sont, quant à elles, relativement radorésistantes, avec une phase en G1 plus longue (167).

5.4.4 Parallèle avec l'irradiation externe

L'étude des effets biologiques radio-induits aux cellules suite à l'incorporation d'un radionucléide est complexe en raison de l'hétérogénéité des paramètres physiques associés à l'irradiation : le débit de dose varie au cours de l'irradiation, la distribution de l'activité et l'irradiation peuvent être hétérogènes à l'échelle cellulaire, l'irradiation implique généralement plusieurs types de rayonnements (**figure 1.14**). En comparaison, lors d'une irradiation externe, le débit de dose est constant, la dose délivrée aux cellules est précisément contrôlée et les cellules sont irradiées de façon homogène.

Ces deux modes d'irradiation impliquent des mécanismes radiobiologiques bien distincts, ce qui rend inadéquat l'extrapolation directe des données issues de l'irradiation externe dans un contexte d'irradiation interne.

Pour cela, les modèles *in vitro* sont essentiels pour fournir de nouvelles données et améliorer la compréhension des effets biologiques radio-induits.

5.5 Modélisation de la survie cellulaire

L'état des connaissances de la réponse biologique aux radiations évolue en partie grâce à l'élaboration de concepts radiobiologiques, basés sur le développement de modèles mathématiques. Actuellement, les modèles prédictifs reposent essentiellement sur la relation entre la survie cellulaire et la dose absorbée. Ces modèles prédictifs permettent l'analyse et la comparaison des différentes données acquises *in vitro* et *in vivo* de la réponse aux RI.

Le test de clonogénicité a été développé par Puck et Markus (168) en 1956 pour mesurer la capacité des cellules de mammifères à former des colonies. Les cellules ont été irradiées par des rayons X puis incubées pendant différents temps. Les colonies de plus de 50 cellules ont été comptées et la fraction

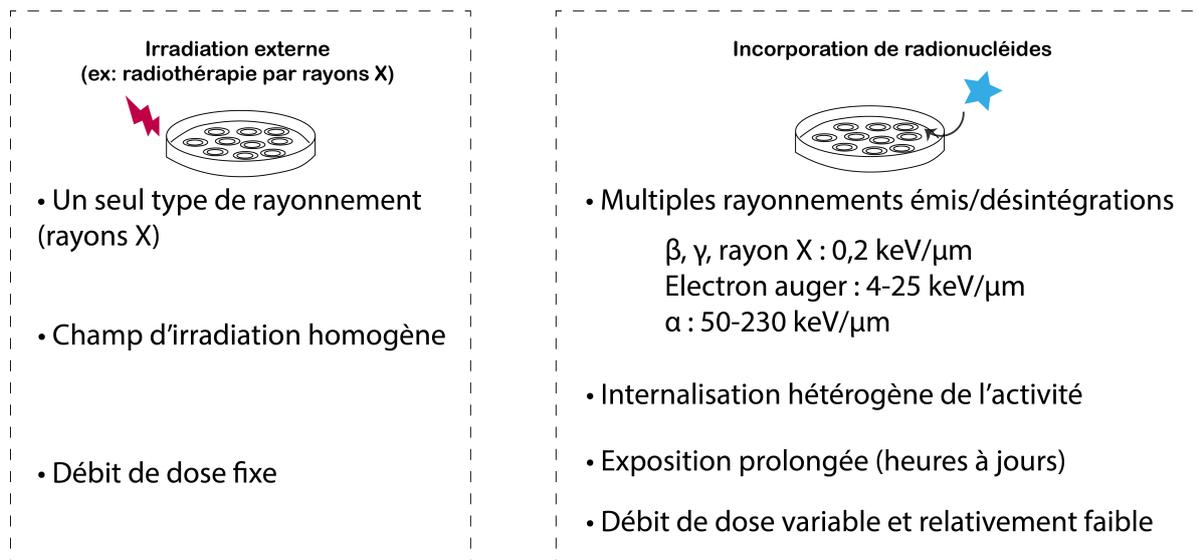


FIGURE 1.14 – Comparaison entre le mode d'irradiation externe (rayons X dans cet exemple) et le mode d'irradiation interne après incorporation d'un radionucléide.

survivante a été déterminée. Ils ont tracé ainsi les premières courbes de survie après irradiation pour les cellules de mammifères. Les courbes de survie obtenues ont permis de déterminer la radiosensibilité des cellules tumorales et des cellules saines. Un exemple de courbe de survie obtenu par Puck *et al.* (168) représentant graphiquement la capacité de reproduction des cellules HeLa en fonction de la dose de rayons (D) est donnée **figure 1.15**.

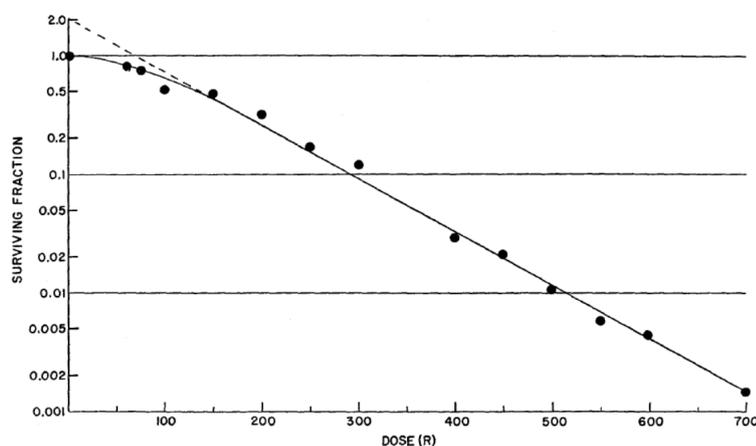


FIGURE 1.15 – Survie de la capacité de reproduction des cellules HeLa en fonction de la dose de rayons X. Source : Puck *et al.* (168)

La forme des courbes de survie en échelle logarithmique, avec un épaulement puis une forme d'exponentielle inverse, peut être décrite mathématiquement par un polynôme de second degré, avec une origine constante, de manière à ce que la fraction survivante à 0 Gy soit de 1. C'est le modèle linéaire quadratique (LQ), proposé en 1972 par Kellerer et Rossi (169). Il s'agit du modèle le plus couramment utilisé pour ajus-

ter les données de survie mesurée expérimentalement. Il est régulièrement utilisé par les radiothérapeutes et radiobiologistes pour interpréter les phénomènes radio-induits.

D'après le modèle LQ, l'équation de fraction de survie cellulaire S après une irradiation instantanée de dose absorbée D est (170) :

$$S(D) = \exp^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (1.7)$$

où α et β sont des paramètres ajustables qui caractérisent la radiosensibilité de la lignée cellulaire considérée respectivement en Gy^{-1} et Gy^{-2} .

L'interprétation qui en est faite est la suivante : la composante linéaire αD , (tangente à l'origine) correspond aux lésions létales irréparables (CDB) et la composante βD^2 correspond à l'accumulation de multiples lésions sublétales, réparables (CSB). Dans un graphe semi-logarithmique, celles-ci sont respectivement linéairement et quadratiquement dépendantes de la dose absorbée D . La dose à laquelle les deux composantes s'équilibrent correspond au rapport α/β (figure 1.16A). Plus α est grand, plus les cellules sont radiosensibles (figure 1.16B). Le paramètre β illustre plutôt l'épaule de la courbe de survie : les cellules radio-résistantes sont donc caractérisées par un α faible et un β faible ; les cellules hyper-radiosensibles sont caractérisées par un α fort et un β faible ; les cellules de radiosensibilité intermédiaire sont caractérisées par un α moyen et un β très élevé (1.16C) (170). Le paramètre α dépend fortement du type de

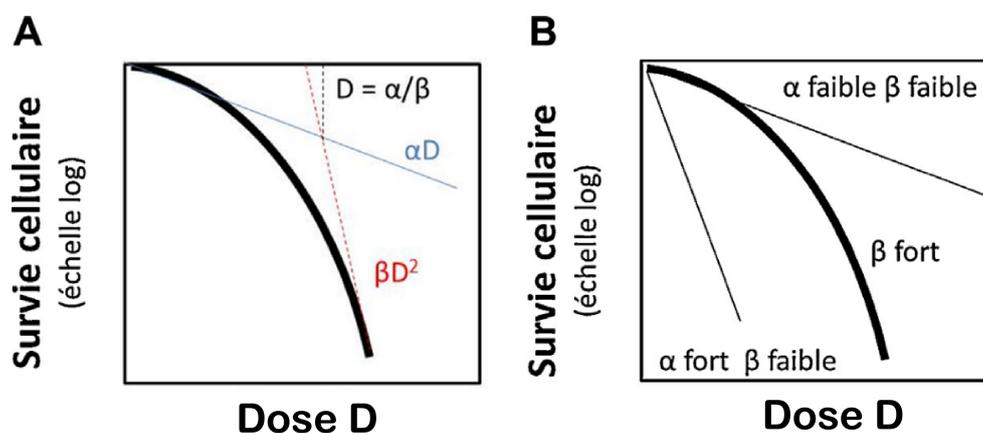


FIGURE 1.16 – Illustration du modèle linéaire-quadratique. La fraction de survie cellulaire est représentée avec une échelle semi-logarithmique. (A) différentes contributions des composants linéaires αD et quadratique βD^2 . (B) Influence des paramètres α et β sur la survie. *Source : Bodgi et al. (170).*

rayonnement. Pour un rayonnement à haut TEL, la probabilité de CDB sera plus élevée et la composante α aura alors plus d'importance que la composante β . Le paramètre β , qui est lié au taux de mortalité par CSB, dépendra davantage du débit de dose.

Lorsqu'une dose est délivrée de manière prolongée sur une période T (ce qui est généralement le cas lors d'une exposition à un radionucléide), les mécanismes de réparation de lésions sub-léthales peuvent avoir le temps d'être initiés; la réparation des dommages entre alors en compétition avec l'apparition de nouveaux dommages. Dans le modèle LQ étendu, la composante quadratique du modèle LQ a été modifiée pour prendre en compte la réparation des dommages subléthaux. Un facteur correctif G(T) (facteur Lea-Catcheside) est introduit dans l'équation 1.7 (171), tel que :

$$S(D) = \exp(-\alpha D - G(T)\beta D^2) \quad (1.8)$$

Le facteur G, compris entre 0 et 1, peut se développer ainsi :

$$G = \frac{2}{D^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \dot{D}(t) dt \int_{-\infty}^t \dot{D}'(t') e^{-\mu(t-t')} dt' \quad (1.9)$$

où μ est la constante de réparation de l'ADN.

Le second terme d'intégration sur t' représente la première des deux CDB nécessaire à la mort cellulaire. Le terme exponentiel représente le processus de réparation diminuant ce second terme; l'intégration sur t , reflète la recombinaison possible de la seconde CDB avec une première CDB non réparée et conduisant à la mort cellulaire.

Dans le cas d'un débit de dose décroissant avec le temps, le facteur G devient :

$$G(T) = \frac{2}{\lambda - \mu} \left(\frac{\lambda}{1 - e^{-\lambda T}} \right)^2 \left[\frac{1 - e^{-(\lambda + \mu)T}}{\lambda + \mu} - \frac{1 - e^{-2\lambda T}}{2\lambda} \right] \quad (1.10)$$

Lorsque la durée T est significativement plus longue que la période de réparation de l'ADN T_{rep} , le facteur G ne dépend plus que de la constante de décroissance effective du radionucléide λ et de la constante de réparation μ , tel que :

$$G(T \gg T_{rep}) = \frac{\lambda}{\lambda + \mu} \quad (1.11)$$

Pour une lignée cellulaire, les paramètres radiobiologiques α et β utilisés sont encore généralement dérivés de données de survie après irradiation externe.

L'établissement de courbes de survie expérimentales en fonction de la dose absorbée et non de l'activité - et ce, pour chaque combinaison de vecteur - radionucléide - type cellulaire est cruciale pour déterminer de nouveaux paramètres de références radiobiologiques (3).

5.6 Études *in vitro* de la relation dose-effet

La grande majorité des données radiobiologiques en irradiation interne avec des radiopharmaceutiques proviennent du marquage de cellules avec des émetteurs utilisés en RIV, c'est-à-dire des émetteurs β^- (^{177}Lu , ^{131}I , ^{90}Y , etc.), α , et Auger pour quelque unes (**tableau 1.7**). Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'études précliniques *in vitro* visant à évaluer l'efficacité d'un traitement ou comparer l'efficacité de plusieurs traitements à partir des courbes de fraction de survie en fonction de la dose absorbée (106, 103, 118, 172, 173, 174).

Plus rarement, d'autres paramètres radiobiologiques sont étudiés. Maucksch *et al.* (175) ont par exemple comparé le nombre de *foci* γH2AX induit par les radiopharmaceutiques $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$, $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ et $^{99m}\text{Tc-pertechnetate}$ en fonction de la dose absorbée pour une lignée de cellules de thyroïde de rat (FRTL-5). Certains auteurs ont aussi estimé la probabilité de contrôle tumoral (TCP pour Tumor Control Probability en anglais) à partir du calcul de la dose absorbée, pour des émetteurs Auger ($^{111}\text{In-EGF}$) (176) et β^- (^{131}I) (177).

Parmi les rares études portant sur l'évaluation de la cytotoxicité de radiotraceurs pour l'imagerie en fonction de la dose délivrée aux cellules, on peut citer celle de Zanzonico *et al.* (90). Ils ont développé un modèle dosimétrique pour estimer la dose absorbée aux noyaux de lymphocytes T lors du radiomarquage au ^{131}I -FIAU, puis ont établi une corrélation aux effets immunotoxiques.

6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré l'importance de la dosimétrie liée à l'utilisation des radiopharmaceutiques qui permet l'établissement d'un référentiel essentiel pour la comparaison entre différentes configurations d'irradiation et à l'évaluation des effets biologiques radio-induits. Par ailleurs plus particulièrement, dans le contexte d'un suivi de la biodistribution *in vivo* de cellules radiomarquées, il apparaît également que l'évaluation préalable de la relation dose-effet est primordiale pour caractériser la cytotoxicité du radiotraceur utilisé et ainsi sélectionner des paramètres de marquage qui optimisent l'imagerie et garantissent une sécurité d'utilisation.

Les chapitres suivants 2 et 3 seront dédiés au développement et à l'optimisation d'outils de calculs de dose à l'échelle cellulaire. Dans le chapitre 2, un modèle dosimétrique sera développé afin d'étudier l'influence systématique de différents paramètres de marquage (densité cellulaire, efficacité de marquage) sur la dose absorbée pour différents radionucléides émetteurs β^+ .

Tableau 1.7 – Liste non-exhaustive d'études sur la relation *in vitro* dose-effet pour : évaluer la radiotoxicité de radiopharmaceutiques (RT) ou l'efficacité thérapeutique de radiopharmaceutiques (ET), ou étudier l'impact de paramètres dosimétriques sur les effets (exp). ⁽¹⁾ Lignée cellulaire de cancer du sein. ⁽²⁾ Lignée cellulaire de la thyroïde.

Contexte	Cellule	Radionucléide	Approche dosimétrique	Paramètre biologique	Ref
exp.	MDA-MB 231 ⁽¹⁾	¹³¹ I	Monte-Carlo	SF	(135)
ET	CA20948	¹³¹ I	Monte-Carlo	SF	2004 (173)
exp	MDA-MB-468 ⁽¹⁾	¹¹¹ In-EGF	Monte-Carlo	SF, TCP	(9)
RT	MCF7/HER2-18 ⁽¹⁾	⁶⁴ Cu	Monte-Carlo	SF	(112)
ET	U2OS	¹⁷⁷ Lu	Monte-Carlo	SF	(103)
ET	Lymphoblastoïde B (Ramos)	¹⁷⁷ Lu	Analytique, Monte-Carlo	SF	(118)
RT	FRTL-5 ⁽²⁾	^{99m} Tc-pertechnetate, ^{99m} Tc-HMPAO, ^{99m} Tc-MIBI	Monte-Carlo	SF, γ H2AX	(175)
RT	PC Cl3 ⁽²⁾	^{99m} Tc, ¹²³ I	Monte-Carlo	SF	(178)
RT	PC Cl3	^{99m} Tc-pertechnetate, ¹⁸⁸ Re	Monte-Carlo	SF	(174)
ET	HT29, SW480, HCT116,	⁹⁰ YCl ₃	Monte-Carlo	SF	(172)
RT	Capan-2	¹⁷⁷ Lu-DOTATOC, ²¹³ Bi-DOTATOC	Analytique (MIRD)	SF	(179)
RT	K562-SST2	¹⁷⁷ Lu-DOTATOC, ²¹³ Bi-DOTATOC	MIRDCell	SF	(180)
RT	Lymphocytes T	¹³¹ I-FIAU	Analytique	Immunotoxicité	(90)

Dans le chapitre 3, un nouveau formalisme pour le calcul de la dose absorbée à l'échelle multi-cellulaire basé sur l'utilisation de fonctions de distribution sera proposé afin d'optimiser le temps de calcul. L'utilisation d'un outil de dynamique moléculaire permettra d'étudier l'impact de la configuration géométrique dans le calcul de la dose.

Les concepts de radiobiologie présentés en dernière partie de ce chapitre serviront à l'étude portant sur la relation dose-effet de cellules radiomarquées au ¹⁸F-FDG présentée dans le chapitre 4.

Chapitre 2.

Dosimétrie multi-cellulaire des émetteurs

β^+ : étude paramétrique

1 Introduction

La dosimétrie *in vitro* des émetteurs β s'inscrit généralement dans un contexte de développement thérapeutique, avec des modèles de cellules en monocouche 2D pour modéliser un test de clonogénicité ou des clusters de cellules compacts en 3D pour évaluer la réponse tumorale à différents traitements (127, 103, 112, 114). Dans ces configurations, le nombre de cellules impliquées est relativement limité.

Dans le cas d'un radiomarquage, les cellules peuvent être suspendues en très grand nombre dans la solution radioactive. Le calcul du tir croisé, prenant en compte la contribution de l'activité distribuée dans l'ensemble des cellules autour d'une cellule cible, jusqu'à une distance de l'ordre du parcours du β (quelques mm) peut ainsi être chronophage.

Les données de facteurs S d'auto-absorption calculés pour différentes configurations source/cible, dimensions cellulaires et radionucléides sont disponibles dans de nombreuses publications, notamment dans le pamphlet du MIRD n°38.

Les données de facteurs S relatifs au calcul du tir croisé sont en revanche moins nombreuses. Le logiciel MIRDcell permet entre autre de générer des facteurs S (auto-absorption et tir croisé) dans des géométries 1, 2 et 3D (127). Cependant, l'utilisation du logiciel est adaptée pour des tailles de clusters relativement faibles.

Ainsi, le travail présenté dans ce chapitre a porté sur le développement d'un modèle dosimétrique adapté aux géométries impliquant un grand nombre de cellules et reposant sur une approche générique associant des simulations Monte-Carlo et des calculs analytiques.

Une étude systématique des effets sur la dose absorbée de deux paramètres de marquage, la densité cellulaire et l'efficacité de marquage, a été réalisée pour trois radiopharmaceutiques β^+ d'intérêt pour le marquage et le suivi de cellules : le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM et le ^{68}Ga -DOTA peptide.

De plus, une étude comparative des doses calculées avec la dosimétrie cellulaire et une approche conventionnelle a ensuite été réalisée afin d'étudier les conditions limites de la dosimétrie conventionnelle en fonction de la densité cellulaire et de l'efficacité de marquage.

En effet, étant donné le parcours relativement grand des β par rapport à la taille des cellules, il se peut que, dans certaines conditions, l'utilisation d'une approche conventionnelle, supposant une activité uniforme dans tout le volume d'étude, et impliquant donc des calculs plus simples, soit suffisante pour estimer la dose absorbée aux cellules.

Finalement, une étude comparative de différentes études de radiomarquage au ^{18}F -FDG a été réalisée.

Pour cela, des calculs de la dose absorbée à partir des paramètres de marquage (activité volumique, densité cellulaire, efficacité de marquage, temps d'incubation, etc...) utilisés dans différentes publications de la littérature ont été effectués.

2 Méthode pour la dosimétrie multi-cellulaire : formalisme et applications

2.1 Principales caractéristiques des radiopharmaceutiques d'intérêt

Trois radiopharmaceutiques d'intérêt pour l'imagerie TEP ont été considérés pour notre étude : le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM, le ^{68}Ga -DOTA peptide. En termes d'émissions électroniques, le radionucléide ^{18}F émet à 96,86% des β^+ . Le ^{68}Ga émet en majorité des β^+ (>88%) à une énergie moyenne relativement élevée (836 keV) et également des électrons Auger/CI à une faible fréquence (5%). Contrairement aux deux autres radionucléides, le ^{64}Cu émet à la fois des β^+ et des β^- . La somme de leur fréquence d'émission ne dépasse toutefois pas 56%. Des électrons Auger et de conversion interne (CI) sont également émis à 80,52%.

Les localisations sub-cellulaires des trois sources dépendent du site de liaison des ligands associés :

- Le ^{18}F -FDG est métabolisé et piégé dans le cytoplasme (65, 181) ;
- Le ^{68}Ga -DOTA peptide se lie à des récepteurs présents au niveau de la membrane cellulaire (182, 183, 184) ;
- Le complexe ^{64}Cu -PTSM est préférentiellement internalisé dans le noyau cellulaire (6, 67).

Les caractéristiques d'émission et les localisations sub-cellulaires sont résumées dans le **tableau 2.1**.

2.2 Dosimétrie appliquée au marquage de cellules avec des émetteurs β^+

Le principe de la dosimétrie interne à l'échelle cellulaire a été présenté dans le chapitre 1.

Rappelons toutefois le schéma du MIRD, utilisé pour calculer la dose absorbée moyenne dans une région cible r_T (en Gy) provenant d'une activité distribuée dans une région source r_S , quelle que soit la géométrie ou la taille des régions (98) :

$$D_{r_T} = \tilde{A}_{r_S} \times S_{r_T \leftarrow r_S} \quad (2.1)$$

où \tilde{A}_{r_S} est l'activité cumulée dans la région source (Bq.s) et $S_{r_T \leftarrow r_S}$ est la dose absorbée moyenne délivrée dans la région cible r_T par unité d'activité cumulée dans la région source r_S (Gy/Bq.s⁻¹).

Tableau 2.1 – Principales caractéristiques des trois radiopharmaceutiques étudiés : le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM et le ^{68}Ga -DOTA peptide. La période physique, les principales émissions électroniques et photoniques ainsi que les localisations sub-cellulaires sont indiquées. (*) (185). Moy/Max : Valeur moyenne/Valeur maximale. Les caractéristiques des rayons X et des deux γ émis suite à la désintégration β^+ ne sont pas indiquées dans le tableau.

	^{18}F -FDG	^{64}Cu -PTSM	^{68}Ga -DOTA peptide
Période (min)	109,73	762,02	67,83
Emissions caractéristiques	β^+ (96,86%) : 249,3 keV (moy) 633,5 keV (max) ϵ (3,14%) : 1655,9 (max)	β^+ (17,52%) : 278,21 keV (moy) 653,1 keV (max) β^- (38,48%) : 190,7 keV (moy) 579,4 keV (max) Auger electrons/CI : 0,6–0,9 keV (57.9%) 6,3–8,3 keV (22.62%)	β^+ (1,20%) : 352,6 keV (moy) 821,7 keV (max) β^+ (87,68%) : 836 keV (moy) 1899,1 keV (max) Auger electrons/CI : 7,2–9,7 (5,05%) 0,732-0,997 (13,98%)
Parcours des β^+ dans l'eau(*) (mm)	0,64 (moy) 2,4 (max)	0,6 (moy) 2,9 (max)	2,9 (moy) 8,2 (max)
Localisation sub-cellulaire	Cytoplasme (Cy)	Noyau (N)	Surface cellulaire (Sc)

Le modèle géométrique considéré pour notre étude est représenté de manière schématique dans la **figure 2.1**. Celui-ci se compose de cellules en suspension distribuées dans un milieu, lui-même délimité par un volume de géométrie cubique. Nous nous intéressons à la dose délivrée aux cellules. Plus précisément, la région cible r_T est le noyau cellulaire, qui est considéré comme le site le plus radiosensible de la cellule (186).

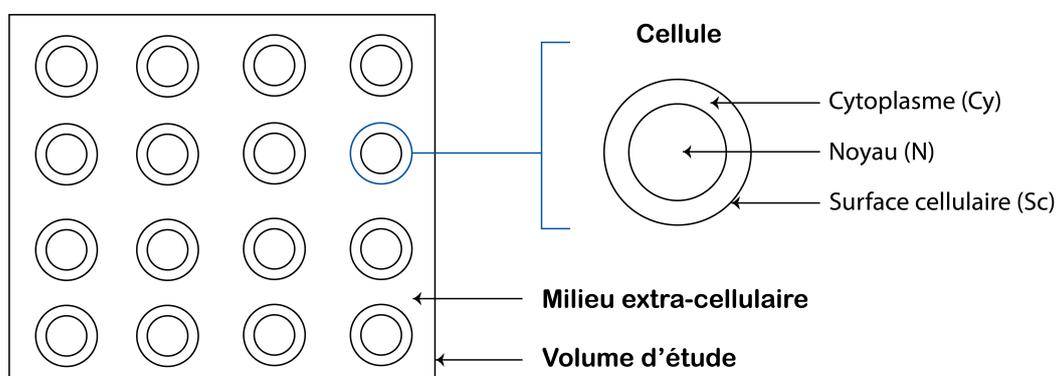


FIGURE 2.1 – Représentation du modèle cellulaire et multi-cellulaire considéré pour notre étude.

2.2.1 Dosimétrie conventionnelle

Pour calculer la dose délivrée au noyau d'une cellule, une dosimétrie conventionnelle peut être appliquée en première approximation. La dosimétrie conventionnelle repose sur l'hypothèse que l'activité est distribuée de manière homogène dans tout le volume d'étude. Dans notre configuration géométrique, cela signifie qu'il n'y a plus de distinction entre les cellules et le milieu extra-cellulaire. La dose absorbée est donc la même en tout point du volume, tel que :

$$D_{conv} = \tilde{A}_{V_t} \times S_{V_t} \quad (2.2)$$

avec V_t le volume d'étude et S_{V_t} la dose absorbée dans le volume d'étude par unité d'activité cumulée.

Il s'agit d'une méthode simplifiée et rapide qui ne nécessite pas de modéliser l'ensemble des cellules. Malgré cet atout, il est toutefois primordial d'évaluer les conditions limites pour lesquelles ce modèle n'est plus satisfaisant en termes de précision de calcul, et donc pour lesquelles l'utilisation de la dosimétrie cellulaire est requise. Le modèle dosimétrique à l'échelle cellulaire est présenté dans le paragraphe suivant.

2.2.2 Dosimétrie cellulaire

La dose absorbée au noyau d'une cellule cible t (D_N^t) est la somme de trois contributions :

$$D_N^t = D_N^{auto} + D_N^{croisé} + D_m \quad (2.3)$$

où D_N^{auto} est la dose auto-absorbée provenant de l'activité distribuée dans la cellule cible elle-même, $D_N^{croisé}$ le tir croisé provenant de l'activité distribuée dans toutes les autres cellules et D_m la dose moyenne absorbée provenant de l'activité dans le milieu extra-cellulaire. L'expression des composantes à partir de l'équation 2.1 peut être développée ainsi :

$$D_N^t = \tilde{A}_{r_s}^t S_{N \leftarrow r_s}^t + \sum_s \tilde{A}_{r_s}^s S_{N \leftarrow r_s}^s(d_s) + D_m \quad (2.4)$$

où $\tilde{A}_{r_s}^t$ est l'activité cumulée distribuée dans la région source r_s (N, Cy ou Cs) de la cellule cible t et $\tilde{A}_{r_s}^s$ l'activité cumulée distribuée dans la région source r_s des cellules sources s .

$S_{N \leftarrow r_s}^t$ est la dose auto-absorbée au noyau par unité d'activité cumulée et $S_{N \leftarrow r_s}^s$ est le tir croisé délivré au noyau de la cellule cible par unité d'activité cumulée provenant de la s -ième cellule source placée à une distance d_s .

La dose absorbée moyenne provenant de l'activité distribuée dans le milieu extra-cellulaire D_m correspond à la dose non-spécifique délivrée dans le volume d'étude par unité d'activité cumulée soustraite des

contributions de l'auto-absorption et du tir croisé.

Pour notre étude, une incorporation uniforme de l'activité a été considérée, ce qui signifie que chaque cellule contient la même activité. Par conséquent, l'équation 2.4 peut être simplifiée comme ci :

$$D_N = \tilde{A}_{r_s} S_{N \leftarrow r_s}^{auto} + \tilde{A}_{r_s} \sum_{c_s} S_{N \leftarrow r_s}^{croisé} + D_m \quad (2.5)$$

où c_s signifie cellule source, $\sum_{c_s} S_{N \leftarrow r_s}^{croisé} = S_{N \leftarrow r_s}^{croisé}$ est la somme des tirs croisés au noyau par unité d'activité cumulée provenant des cellules sources et $S_{N \leftarrow r_s}^{auto}$ est l'auto-absorption par unité d'activité cumulée. Le tir croisé a été calculé pour chaque cellule composant la distribution cellulaire puis moyenné sur l'ensemble des cellules.

Les facteurs S ont été obtenus *via* des simulations Monte-Carlo, à l'aide du code MCNP6. La section suivante présente le code et développe les caractéristiques nécessaires pour le calcul de la dose absorbée dans le cadre de notre étude.

2.3 Code MCNP6

Le code MCNP6 est la dernière version du code Monte-Carlo MCNP développé depuis 1994 par le LANL (Los Alamos National Laboratory, New Mexico, Etats-Unis) qui est utilisé dans de nombreux domaines de la physique nucléaire. Il combine la plupart des performances des codes MCNP5 et MCNPX, en incluant une extension des sections efficaces des photons et électrons pour les énergies plus faibles, permettant alors de simuler des électrons à partir d'une énergie minimale de 10 eV et les photons à partir d'une énergie de 1 eV. L'énergie de coupure pour l'électron reste toutefois par défaut à 1 keV. La version utilisée pour notre étude est MCNP6 v1.0, sortie en 2013 (187).

Le fichier d'entrée du code de calcul MCNP6 permet de décrire l'ensemble des caractéristiques de la simulation Monte-Carlo à l'aide de différentes « cartes » portant sur le transport des particules, la géométrie, les matériaux et sections efficaces, la source, les résultats souhaités et les paramètres de la simulation. Ces différents aspects sont développés dans les paragraphes suivants.

2.3.1 Géométrie

MCNP6 considère une géométrie comme un ensemble de volumes, appelés cellules, définis par intersection, union et complément de régions limitées par des surfaces. Certaines géométries simples, appelées *macrobodies*, sont prédéfinies, par exemple un parallélépipède rectangle (RPP) ou une sphère (SPH).

MCNP6 offre un format spécifique pour la modélisation de structures répétées permettant de ne définir qu'une seule fois les différentes cellules apparaissant plusieurs fois dans la géométrie.

Une unité composée de une ou plusieurs cellules que l'on souhaite répéter dans l'espace est associée à un "univers". Deux modes de répétition (définis par des cartes) existent :

- La carte *like* permet de reproduire une unité en modifiant la position (TRCL) et l'orientation (TR) et/ou la nature de l'univers associé,
- La carte *LAT* (pour *lattice*) permet de définir un réseau infini hexagonal ou cubique. Celui-ci est rempli par l'unité élémentaire. Le réseau est ensuite inclus dans un volume fini.

2.3.2 Matériaux et sections efficaces

Un matériau d'une certaine composition et densité est assigné à chaque cellule créée.

Ainsi, une fois la géométrie définie, la carte des matériaux (MAT) de MCNP6 permet de spécifier la composition des matériaux remplissant les cellules ainsi que les sections efficaces à utiliser.

2.3.3 Source

La forme et la localisation d'une source ainsi que le type de particules émises, leurs énergies et leurs probabilités d'émission sont définis dans le fichier d'entrée à l'aide de la carte SDEF. Dans le cas d'une source distribuée uniformément dans un volume, l'utilisateur doit définir les bornes du volume en plus de spécifier le numéro de cellule auquel il correspond.

Par ailleurs, le code permet de simuler différents types de particules dans un même problème. Pour chaque particule déclarée, une énergie (ERG) ou une distribution d'énergies avec les probabilités d'émission associées sont définies. Les distributions d'énergie sont définies sous la forme d'un histogramme (par défaut) ou sous forme d'émissions discrètes.

2.3.4 Transport des rayonnements

Comme présentés dans le **tableau 2.1**, les rayonnements d'intérêts pour nos calculs sont les électrons/positons et les photons.

L'histoire d'une particule est typiquement créée à une énergie et une position assignée selon les spécifications du problème source, puis le transport de la particule basé sur des modes d'interactions prédéfinis et leurs sections efficaces est activé, générant des particules secondaires, déposant de l'énergie, jusqu'à ce que la particule quitte la géométrie ou ait déposé toute son énergie. Le code MCNP6 considère qu'un électron ou un photon est absorbé localement lorsqu'il a atteint l'énergie de coupure (1 keV par défaut).

Transport des électrons/positons. Les électrons déposent leur énergie principalement par des pertes collisionnelles impliquant l'excitation et l'ionisation d'atomes dans la matière. Ils interagissent principalement avec les électrons des atomes, de masse équivalente. Cela induit une trajectoire tortueuse avec de grands angles de déviations.

Pour les électrons de très grande énergie (plusieurs MeV) traversant un milieu dense, l'interaction avec les noyaux des atomes est également possible. L'électron incident est dévié dans le champ coulombien de l'atome cible et ce changement de trajectoire s'accompagne de l'émission d'un rayonnement X dit rayonnement de freinage ou *Bremsstrahlung*.

Les positons (β^+) quant à eux partagent les mêmes caractéristiques physiques que les β^- (TEL, parcours, gamme d'énergie) exceptée la charge. La charge positive du positon le conduit, en fin de parcours, à s'associer à un électron de la matière pour former un état lié, le positronium. Un processus de dématérialisation se produit et deux photons γ sont alors émis dans deux directions opposées avec une énergie de 511 keV chacun.

Dans MCNP6, le transport des positons se fait de la même manière que pour les électrons. Historiquement, le positon est déclaré en tant qu'électron (type e dans MCNP6) et les deux photons à 511 keV sont explicitement déclarés également.

Le nombre d'interactions des électrons avec la matière étant considérable, le transport de ces particules n'est pas traité événement par événement mais par une méthode d'histoire condensée. Il s'agit ainsi d'un code de classe I d'après la classification de Berger (188).

L'histoire de chaque électron est alors divisée en plusieurs étapes ; l'énergie perdue au cours de chaque étape étant calculée à partir du pouvoir de ralentissement total et le changement de direction étant échantillonné suivant une méthode de diffusion multiple (189).

Les étapes divisant le trajet d'un électron regroupent l'effet cumulé de nombreuses collisions aléatoires. De ce fait, une fluctuation de perte d'énergie peut survenir. Le calcul des fluctuations de perte d'énergie repose sur les théories de Landau (190) et de Blunck-Leisegang (191). Il a été démontré que l'algorithme d'échantillonnage par défaut pouvait amener des erreurs non négligeables dans le calcul de distributions de dose autour de sources β selon les conditions (192). Un autre algorithme appelé ITS (pour *Integrated TIGER series*) peut être activé en paramétrant la 18ème entrée de la carte physique *dbcn* à 1 (192). L'utilisation de cet algorithme ITS par rapport à l'option par défaut pour la dosimétrie interne a été étudiée dans la thèse de Sophie Chiavassa ; il a été montré que l'emploi de l'algorithme ITS était moins coûteux en temps de calcul et permettait une meilleure précision (189). Nous l'avons donc sélectionné pour nos calculs.

Transport des photons. Les photons incluent les rayonnements γ , les rayons X issus du rayonnement de freinage selon un spectre continu (rayons de *bremsstrahlung*) ou issus de la désexcitation atomique (photons de fluorescence).

Les photons transmettent la totalité ou une partie de leur énergie aux électrons du milieu selon trois effets (193) :

- Effet photoélectrique (prédominant à basse énergie) : transfert de la totalité de l'énergie du photon incident à un électron qui est alors expulsé de l'atome.
- Effet Compton : collision avec un électron faiblement lié à un atome entraînant l'éjection de l'électron. Le photon est alors diffusé.
- Création de paires ($>1,02$ MeV dans l'eau) : le photon de haute énergie interagit au voisinage du noyau et produit une paire de particules, un électron et son antiparticule, un positon.

Les photons subissant un nombre restreint d'interactions dans la matière, leur transport est traité *événement par événement* par MCNP6. Celui-ci tient compte de la diffusion élastique et non-élastique, de la possibilité de l'émission de photons de fluorescence après absorption photoélectrique, de l'absorption dans la production de paires avec émission locale de rayonnements issus de l'annihilation et les rayons de *bremsstrahlung*.

Pour la génération et le traitement des électrons secondaires, le mode *p e* permet de stocker et de transporter tous les électrons secondaires créés au cours de la simulation.

2.3.5 Nombre d'histoires et résultats souhaités

Le nombre d'histoires à suivre au cours de la simulation est défini à l'aide de la carte NPS et les résultats souhaités à l'issue de la simulation sont spécifiés à l'aide d'un *tally* permettant de définir la grandeur d'intérêt et la région où celle-ci doit être calculée. Pour notre application, le tally *F8 a été utilisé. Celui-ci permet de calculer le dépôt d'énergie (en MeV) et est normalisé par le nombre de particules sources envoyées.

2.4 Calcul de la dose auto-absorbée

Pour calculer le facteur S d'auto-absorption S^{auto} , le modèle standard sphérique de la cellule a été considéré.

Dans le fichier MCNP6, trois sphères concentriques de densité 1 g.cm^{-3} ont été modélisées, représentant le noyau, le cytoplasme et la membrane (**figure 2.1**). La taille du noyau a été fixée à $R_N=4 \mu\text{m}$ et la taille de la cellule à $R_c=5,1 \mu\text{m}$ incluant la surface cellulaire d'une épaisseur de $0,1 \mu\text{m}$.

Une source volumique répartie uniformément dans l'un des trois compartiments cellulaires a été créée,

dans le noyau pour le ^{64}Cu , dans le cytoplasme pour le ^{18}F et dans la membrane pour le ^{68}Ga (cf. **tableau 2.1**). Les spectres d'énergie des trois sources incluant les β , électrons Auger et de CI et les photons issus de la CIPR 38 ont été implémentés (194). Les photons regroupent les photons X et γ .

Pour chaque type de particule, une probabilité d'émission par désintégration et une distribution d'énergie ont été attribuées. La distribution d'énergie des β a été définie sous forme d'histogramme tandis que celles des électrons Auger, rayons X et γ ont été définies de manière discrète.

$2 \cdot 10^7$ histoires ont été simulées afin d'assurer une incertitude statistique sur le résultat inférieure à 1%. Le noyau a été choisi comme région cible et l'énergie déposée en MeV par particule envoyée a été calculée via le tally *F8. La dose absorbée par désintégration en $\text{Gy}/(\text{Bq}\cdot\text{s})^{-1}$ a finalement été obtenue en rapportant le résultat à la masse du noyau des cellules et en effectuant les conversions d'unités appropriées.

Comme dit précédemment, il est possible de transporter les électrons jusqu'à une énergie minimale de 10 eV. Néanmoins, au-dessous de 1 keV, l'énergie de coupure choisie doit être explicitée via la carte CUT.

Un calcul de facteur S d'auto-absorption a été réalisé avec la source ^{64}Cu en fixant l'énergie de coupure à 10 eV puis le résultat a été comparé à celui obtenu pour l'énergie de coupure de 1 keV (défaut). Le temps de calcul a fortement augmenté en diminuant l'énergie de coupure tandis que le gain de précision s'est avéré négligeable.

L'énergie de coupure par défaut à 1 keV a donc finalement été gardé pour tous les calculs.

Par ailleurs, des calculs préliminaires ont été réalisés afin d'évaluer la contribution des différents types de particules émis par les trois radionucléides dans le facteur d'auto-absorption. Les résultats montrant une contribution photonique dans la dose absorbée minime (<2%), les photons n'ont pas été pris en compte dans les calculs du facteur S^{auto} . En effet, dans le cas du ^{64}Cu , les électrons Auger/CI sont les principaux contributeurs du facteur S pour l'auto-absorption $S_{N \leftarrow N}^{auto}$ (76%), suivis des particules β (23%) et les photons (<1%). Les facteurs $S_{N \leftarrow Cy}^{auto}$ pour le ^{18}F et $S_{N \leftarrow Cs}^{auto}$ pour le ^{68}Ga présentent une contribution des β qui est prépondérante (92,5-99,1%). La contribution des électrons Auger/CI pour le ^{68}Ga est de 6,2% et celui des photons de 1,4% seulement (cf. Annexe 1, **tableau A1**).

2.5 Calcul du tir croisé moyen

Pour calculer le tir croisé moyen, qui dépend essentiellement de la configuration spatiale des cellules, deux approches, brièvement introduites dans le chapitre 1 (§ 5.5), peuvent être envisagées :

- Une simulation Monte-Carlo en modélisant la distribution cellulaire et en calculant le dépôt d'énergie

dans cette géométrie directement,

- Un calcul de facteurs S de paires puis une somme analytique des contributions selon l'équation 2.5.

Dans un premier temps, les deux méthodes ont été testées afin d'en dégager les avantages et les inconvénients et sélectionner la plus adaptée pour notre étude.

2.5.1 Monte-Carlo direct

La modélisation des distributions cellulaires selon un réseau cubique ou hexagonal avec la code MCNP6 est facilitée par l'emploi du mode LAT (cf. § 2.3.1). Une cellule est modélisée dans un parallélépipède rectangle (structure "RPP") et celui-ci est répété dans l'espace. Comme dit précédemment, le format des structures répétées permet de construire des géométries composées d'une infinité d'éléments à partir de la définition d'une seule unité élémentaire.

La génération d'une distribution de N cellules réparties de manière aléatoire dans un volume est aussi possible par plusieurs méthodes : la première consiste à modéliser une cellule puis à la répéter N fois par translation avec l'option *TCRL* en lui assignant une position générée aléatoirement. Cependant, le nombre de cellules affectées par une transformation TRCL ne peut dépasser 999, ce qui limite cette méthode à la description de petites distributions cellulaires.

Une solution alternative est de créer une distribution pseudo-aléatoire à partir de la description d'un réseau de cellules. Il s'agit alors de générer N indices *ijk*, puis de calculer le tir croisé en plaçant les sources et les *tallies* sur les cellules placées aux indices générés.

La comparaison du facteur S pour une distribution aléatoire de N=999 cellules dans un volume cubique modélisé en utilisant cette approche ou avec le mode TRCL comme décrit précédemment a montré que le biais introduit par la discrétisation de l'espace était négligeable.

Toutefois, dès lors que le volume d'étude délimitant le réseau de cellules est plus complexe qu'un simple cube (RPP), la connaissance des indices limites *ijk* et donc la génération de ces indices *ijk* pour le positionnement des sources devient complexe.

Enfin, quelle que soit la configuration géométrique choisie, le placement de sources et de *tallies* dans les N cellules constitue une limite majeure. Nous avons observé, en effet, qu'à partir d'un certain nombre de cellules (environ $8 \cdot 10^6$ cellules), une erreur MCNP liée à l'allocation de mémoire avait lieu.

En conclusion, l'utilisation exclusive du code MCNP6 pour le calcul du tir croisé moyen est pratique dans le cas d'une distribution de cellules selon un réseau, mais est peu optimal pour la description de distribution aléatoire de cellules et limitée à un nombre de cellules de l'ordre du million de cellules.

2.5.2 Méthode hybride

L'autre approche correspond à l'implémentation explicite de l'équation 2.5. Plusieurs études de la littérature ont utilisé cette approche pour le calcul du tir croisé pour des géométries en réseau ou aléatoires (118, 99, 195).

Elle s'applique en deux temps : (i) détermination de facteurs S de paires pour différentes distances cellule-cellule, puis (ii) somme analytique des contributions de chaque cellule source.

Contrairement à l'approche directe par simulation Monte-Carlo, cette méthode hybride a le gros avantage de ne pas limiter le nombre de cellules impliquées. On peut qualifier l'approche de générique dans le sens où elle n'est pas spécifique à une situation et peut être appliquée à tout type de distribution et de radionucléide.

Dans cette étude, nous avons fait le choix d'implémenter cette approche pour calculer le tir croisé moyen par désintégration $\bar{S}^{croisé}$. Le code MCNP6 a été utilisé pour déterminer les facteurs S de paires pour différentes distances cellule-cellule, puis un programme a été développé en Python¹ pour la partie analytique.

1. Génération des facteurs S de paires. Les particules β émises par les trois radionucléides ont un parcours maximum dans l'eau allant de 2,4 mm à 8,2 mm (cf. **tableau 2.1**). Ainsi, les facteurs S de paires pour des distances cellule-cellule ont été simulés jusqu'à ces distances pour pouvoir prendre en compte toutes les contributions potentielles à la dose.

L'approche la plus précise pour calculer les facteurs S de paires est la simulation directe par Monte-Carlo pour un couple de cellule cible et source, puisqu'elle permet de prendre en compte la contribution de tous les électrons secondaires. Pour de très grandes distances par rapport à la dimension d'une cellule, la convergence de la simulation est plus lente voire impossible en deçà d'un certain angle solide.

Nous avons donc utilisé deux approches pour le calcul des facteurs S : une approche par simulation Monte-Carlo directe et une approche indirecte à partir de dose-points kernels DPKs.

L'approche directe à l'aide du code MCNP6 a consisté à modéliser deux cellules (une cellule source et une cellule cible) séparées d'une distance d comme montré dans la **figure 2.2**. La source a été distribuée uniformément dans un des compartiments de la cellule et la dose absorbée par désintégration a été calculée dans le noyau de la cellule cible. Les mêmes paramètres physiques et de simulation que ceux utilisés pour le facteur S d'auto-absorption ont été définis. Les calculs ont été réalisés pour des valeurs discrètes de distances entre $2 \times R_c$, jusqu'à $30 \times R_c$.

1. <https://www.python.org/>

Au-delà, les facteurs S de paires ont été estimés à partir de DPKs calculés avec le code MCNP6.

L'énergie déposée dans une couronne sphérique d'épaisseur $2 \times R_c$ autour d'une source ponctuelle a été calculée. La valeur en MeV par particule envoyée a été convertie en Gy/Bq.s^{-1} considérant la masse totale de la couronne. Dans ce cas, la cellule source et la cellule cible sont considérées comme étant ponctuelles. La validation de cette approximation a été vérifiée sur les premières distances lointaines, par comparaison avec des valeurs de facteurs S obtenues *via* les DPKs et celles obtenues par simulation Monte-Carlo directe.

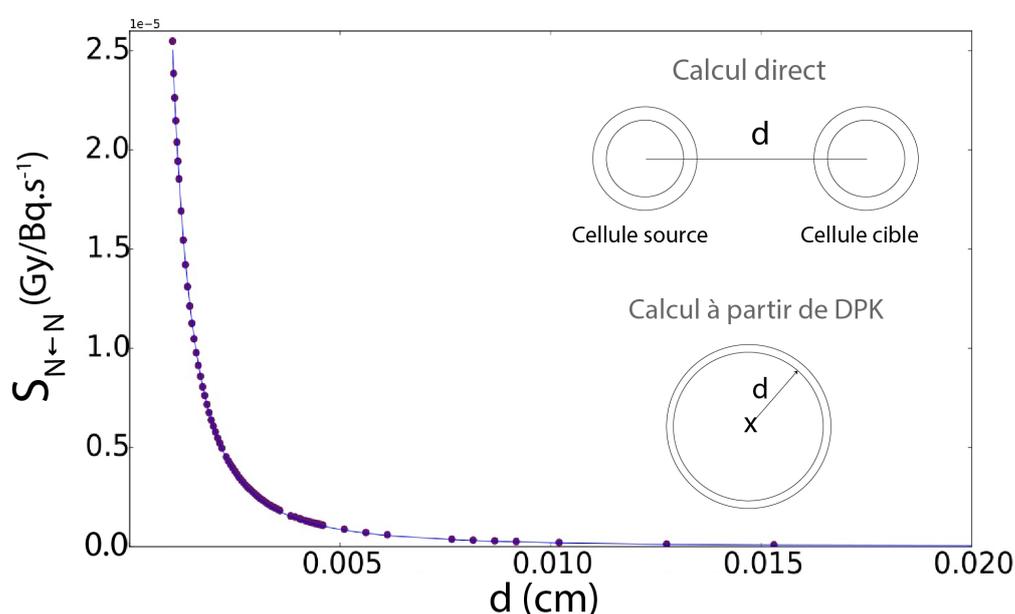


FIGURE 2.2 – Courbe des facteurs S de paires obtenue par simulation Monte-Carlo avec le code MCNP6 (exemple du ^{64}Cu). Pour les grandes distances, les facteurs S ont été estimés à partir de DPKs.

L'estimation de facteurs S de paires avec une méthode Monte-Carlo directe pour les courtes distances puis à partir de DPKs sur les grandes distances avait été précédemment employée par Marcatili *et al.* (118) pour les grandes distances avec la source ^{177}Lu .

Au total, de 1.10^6 à 1.10^8 particules ont été envoyées pour atteindre une incertitude de calcul inférieure à 1%.

Une courbe des facteurs S de paires a ainsi pu être construite en fonction de la distance. Un pas de distance plus faible a été considéré sur les faibles distances cellule source-cellule cible afin d'améliorer la précision dans la région la plus abrupte de la courbe.

2. Description de la distribution cellulaire et calcul du tir croisé. Un facteur S de paires représente la contribution de dose d'une cellule source seule délivrée à une cellule cible placée à une certaine distance de la cellule source. Dans une distribution de N cellules radiomarquées (*i.e.*, contenant de l'activité), le tir croisé à une cellule est obtenu en sommant toutes les contributions des N-1 cellules sources. Afin de calculer cette composante, la description de l'arrangement spatial de la distribution des cellules est essentielle, pour déterminer les distances relatives et donc les contributions S à intégrer.

Un programme a été implémenté en Python (v3.4) pour (i) générer la distribution spatiale des cellules, et (ii) calculer le tir croisé par unité d'activité cumulée $S^{croisé}$ pour une cellule cible à partir de l'équation 2.4. Le tir croisé moyen $\bar{S}^{croisé}$ a finalement été obtenu en faisant la moyenne des $S^{croisé}$ pour chaque cellule de la distribution.

Les étapes d'implémentation sont les suivantes (**figure 2.3**) :

1. Les coordonnées X, Y et Z des cellules sont générées en prenant comme paramètre d'entrée la distance minimale entre deux cellules et le nombre de cellules ;
2. Pour une cellule prise comme cellule cible t , les distances entre la cellule cible et toutes les autres cellules sont calculées ;
3. Les facteurs S associés sont déterminés par interpolation linéaire des données de facteurs S de paires obtenues à partir des simulations Monte-Carlo directes et des DPKs ;
4. Les facteurs S sont sommés afin d'obtenir le tir croisé total au noyau de la cellule cible par unité d'activité cumulée $S^{croisé}$;
5. Les étapes 2 et 3 sont répétées pour chaque cellule de la distribution et les tirs croisés sont moyennés.

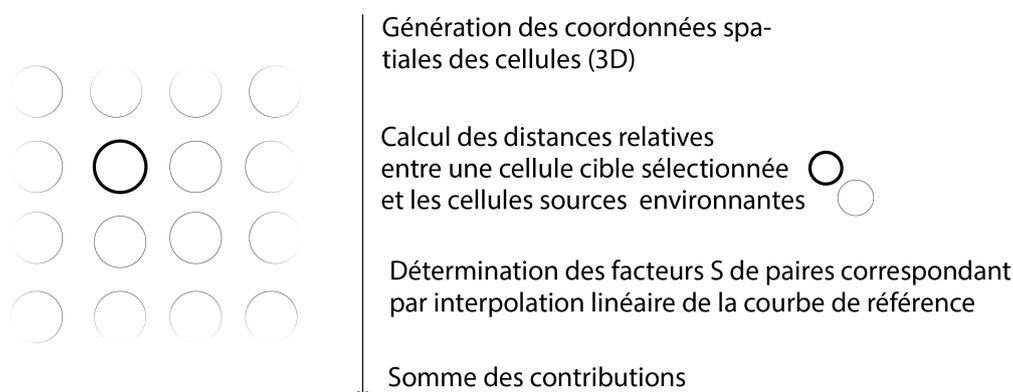


FIGURE 2.3 – Méthodologie employée pour le calcul du tir croisé.

Dans le cas spécifique d'un arrangement des cellules selon un réseau et d'une activité uniforme, l'existence de symétries au sein de la structure font que certaines cellules reçoivent exactement la même dose ab-

sorbée. Dans ce cas, nous avons donc pris en compte ces symétries afin de réduire le nombre de cellules prises comme cellule source et ainsi de réduire le temps de calcul.

Le paquet pyTables a été utilisé afin de gérer de grandes matrices, en optimisant la mémoire et le temps de calcul.

Par ailleurs, comme pour l'auto-absorption, les contributions des particules β , des photons (γ , X), des électrons Auger/CI des trois sources ^{18}F , ^{64}Cu et ^{68}Ga au tir croisé pour un réseau compact de cellules ont été évaluées au préalable (cf. Annexe 1, **tableau A2**). Pour les trois radonucléides, la contribution la plus importante provient des particules β (87,4-98,2%), quelle que soit la localisation sub-cellulaire de la source et celle des photons est très faible (autour de 2% maximum).

Ainsi, pour les études présentées en 2.7 et pour tous les radionucléides, les photons n'ont pas été inclus dans les calculs.

2.6 Calcul de la dose non-spécifique

Pour calculer la dose non-spécifique, c'est-à-dire provenant de l'activité distribuée dans le milieu extra-cellulaire, nous avons pris l'hypothèse que l'activité était distribuée de manière homogène dans tout le milieu. Dnas un premier temps, le facteur S^{milieu} a été calculé à l'aide de MCNP6. Une géométrie cubique de dimension égale au volume d'étude, sans les cellules, a été modélisée et une source uniformément distribuée dans tout le volume a été définie. Les mêmes paramètres de source et paramètres physiques utilisés pour le calcul des facteurs S de paires et le facteur d'auto-absorption ont été adoptés pour ce calcul. La source a été distribuée uniformément dans tout le volume et l'énergie déposée dans le volume a été calculée. Le facteur S obtenu S^{milieu} est équivalent au facteur S déterminé selon le modèle conventionnel ($S^{milieu} = S^{conv}$).

Pour obtenir la dose absorbée aux cellules provenant du milieu extra-cellulaire, les contributions du tir croisé et de la dose auto-absorbée pour la même concentration d'activité ont ensuite été retirées. Il s'agit de la même approche que celle utilisée dans l'étude de Makrigiorgos *et al.* (195).

2.7 Étude paramétrique

Les méthodes de calculs présentées ci-dessus ont été appliquées à l'étude systématique de l'influence de la densité cellulaire et de l'efficacité de marquage sur la dose absorbée moyenne aux cellules, considérant le noyau comme la région cible, pour le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM et le ^{68}Ga -DOTA peptide.

Pour cela, nous avons fixé un certain nombre de paramètres et fait varier successivement les paramètres d'intérêts.

Pour tous les calculs, une distribution de cellules sphériques de taille constante dans un réseau cubique et délimitée par un volume d'étude de forme cubique a été considérée. Un résumé des études effectuées pour l'analyse paramétrique est illustré **figure 2.4**.

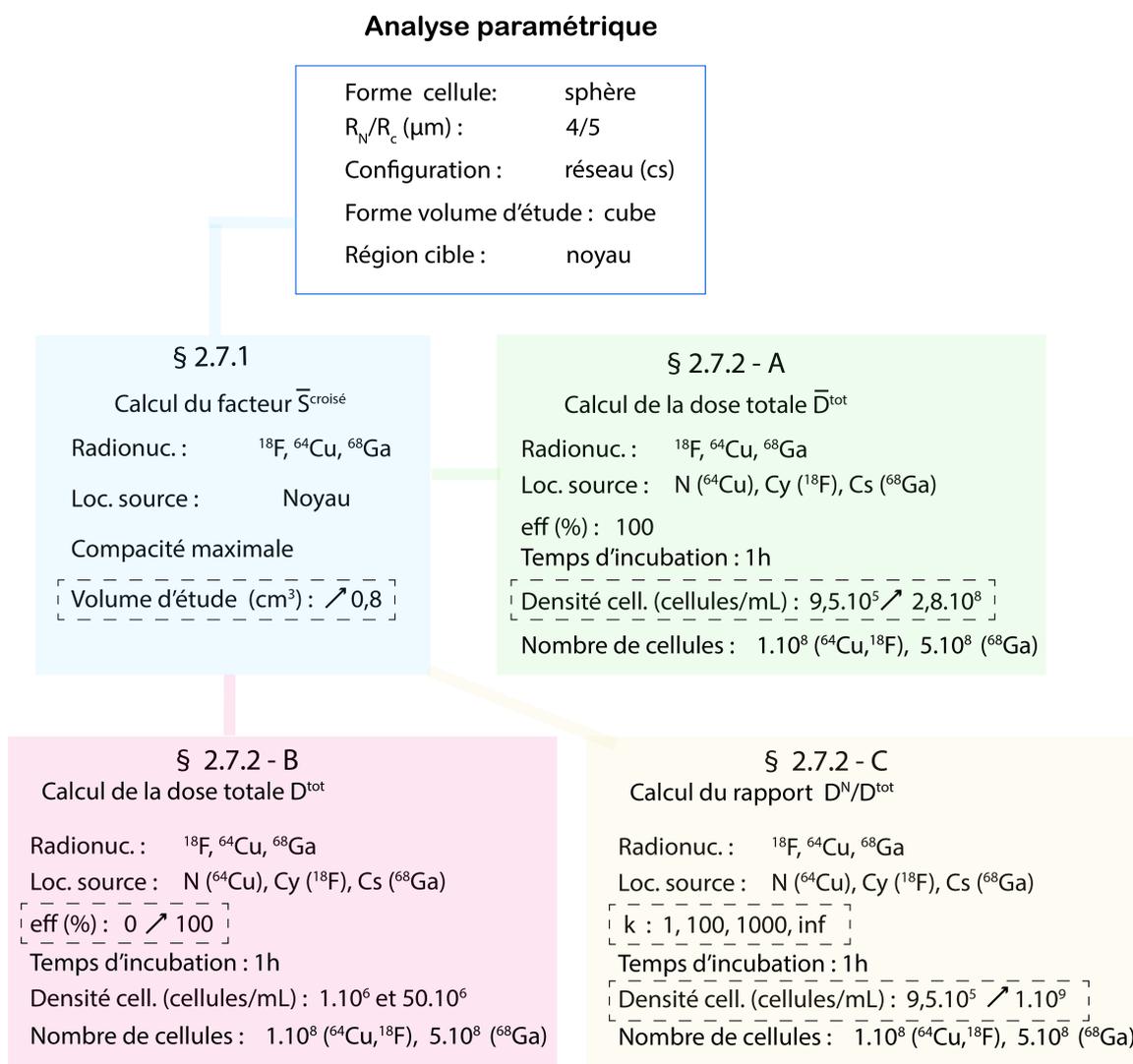


FIGURE 2.4 – Résumé schématique des calculs réalisés pour l'analyse paramétrique. Les paramètres qui varient sont encadrés en pointillés. (§2.7.1) Calcul du facteur $\bar{S}_{\text{croisé}}$ pour différents volumes d'étude et nombre de cellules. (§2.7.2 A) Calcul de la dose absorbée moyenne au noyau en fonction de la densité cellulaire. (§2.7.2. B) Calcul de la dose absorbée moyenne aux noyaux en fonction de l'efficacité de marquage. (§2.7.2 C) Calcul du rapport D_N/D_{conv} en fonction du paramètre k et de la densité cellulaire. Radionuc = radionucléide; loc.source = localisation sub-cellulaire des sources; densité cell = densité cellulaire; Eff (%) = efficacité de marquage; k = rapport des activités volumiques dans les cellules et dans le milieu extra-cellulaire.

2.7.1 Tir croisé moyen en fonction de la taille du volume d'étude

Pour réaliser l'étude systématique, nous avons cherché dans un premier temps à déterminer le volume d'étude limite ou le nombre de cellules à intégrer dans le modèle permettant de calculer une dose ab-

sorbée moyenne pertinente prenant bien compte de toutes les contributions sources. Nous nous sommes donc intéressés au tir croisé moyen qui dépend principalement du parcours des β des radionucléides.

Le tir croisé moyen par désintégration $\bar{S}^{croisé}$ a été calculé pour une distribution de cellules compactées, c'est-à-dire pour une distance minimale entre deux cellules fixées à $2 \times R_c$.

Pour cette étude spécifique, les sources de ^{64}Cu , ^{18}F et ^{68}Ga ont été distribuées dans le noyau des cellules. Les différentes localisations identifiées dans le **tableau 2.1** selon le radiopharmaceutique n'ont pas été prises en compte, ce paramètre ayant un impact négligeable sur le tir croisé (113, 106).

Différentes tailles de volume d'étude ont été considérées en augmentant progressivement le nombre de cellules dans le modèle, jusqu'à ce que la valeur moyenne de $S^{croisé}$ converge. Nous avons supposé que la convergence était atteinte lorsque la différence relative entre deux valeurs successives de $S^{croisé}$ devenait inférieure à 3%.

Il est cependant apparu que le temps de calcul augmentait considérablement avec le nombre de cellules impliquées dans le modèle. Pour donner un ordre d'idée, le temps de calcul du tir croisé pour un volume composé de 1.10^8 cellules est d'environ 3 jours.

Les caractéristiques de l'ordinateur utilisé pour réaliser les calculs Python sont les suivantes : Intel Pentium CPU G645 @ 2,96 GHz, 8 GB RAM.

2.7.2 Étude systématique de l'effet de la densité cellulaire et de l'efficacité de marquage sur la dose moyenne absorbée au noyau

A. et B. La dose moyenne absorbée au noyau D_N a été calculée en faisant varier deux paramètres : la densité cellulaire et l'efficacité de marquage, c'est-à-dire le pourcentage de l'activité totale incorporée dans les cellules.

Un autre paramètre, introduit par Makrigiorgos *et al.* (195), reflétant la différence de niveau d'activité dans les cellules et le milieu extra-cellulaire est le paramètre k . Ce paramètre correspond au rapport des concentrations de l'activité cumulée dans les cellules $[\tilde{A}_{cel}]$ et de l'activité cumulée dans le milieu extra-cellulaire $[\tilde{A}_m]$. En supposant une incorporation homogène de l'activité dans les cellules, le paramètre k peut s'exprimer en fonction de l'efficacité de marquage (eff%) et le nombre de cellules (N_{cel}) tel que :

$$k = \frac{[\tilde{A}_{cel}]}{[\tilde{A}_m]} = \frac{(eff(\%) \times \tilde{A}_{tot}/N_{cel})/V_{cel}}{[\tilde{A}_m/V_m]} \quad (2.6)$$

où \tilde{A}_{tot} est l'activité cumulée totale et V_{cel} , V_m le volume en cm^3 respectivement d'une cellule et du milieu extra-cellulaire.

Premièrement, la dose absorbée a été calculée en faisant varier la densité cellulaire pour une distribution d'activité donnée (efficacité de marquage à 100% ou $k=+\infty$). Nous avons choisi de garder constant le nombre de cellules pour chaque densité cellulaire. Ainsi, lorsque la densité cellulaire augmente, le volume d'étude considéré augmente également.

Ensuite, la dose absorbée a été calculée pour deux densités : $1 \cdot 10^6$ cellules/mL ("faible" densité cellulaire) et $50 \cdot 10^6$ cellules/mL ("forte" densité cellulaire), en fonction de l'efficacité de marquage et du paramètre k .

C. Enfin, une comparaison de la dose moyenne absorbée aux cellules et de la dose conventionnelle a été réalisée en fonction de la densité cellulaire et pour quatre valeurs de k typiques : 1, 10, 100 et $+\infty$. Pour une valeur de k donnée, l'activité globale incorporée dans les cellules et la concentration d'activité dans le milieu extra-cellulaire ont été maintenues constantes pour toutes les densités. Ainsi, l'activité globale dans le milieu extra-cellulaire diminue à mesure que le volume d'étude diminue et que la densité cellulaire augmente. Le principe est illustré sur la **figure 2.5**.

Pour tous les calculs, le nombre de cellules impliqué a été sélectionné de telle sorte que le facteur $\bar{S}^{croisé}$ converge. Ainsi, $1 \cdot 10^8$ cellules ont été considérées pour le ^{64}Cu et le ^{18}F , et $5 \cdot 10^8$ cellules ont été considérées pour le ^{68}Ga . De plus, pour comparer les résultats en dose (Gy), l'activité cumulée a été calculée en supposant une concentration d'activité initiale de 0,01 MBq/mL et un temps d'incubation à 1h pour tous les radionucléides.

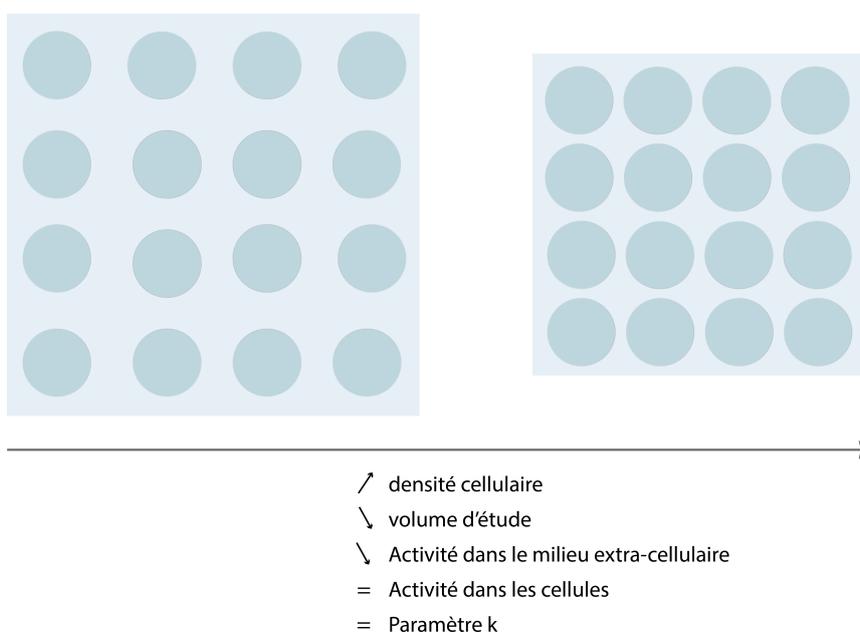


FIGURE 2.5 – Variation des paramètres de modélisation pour le calcul du tir croisé, pour un paramètre k fixe. 1 couleur = 1 valeur de concentration d'activité.

2.8 Calculs de la dose absorbée moyenne délivrée au noyau d'une cellule lors du radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG à partir des données de la littérature

Le modèle dosimétrique a finalement été appliqué pour estimer la dose absorbée aux cellules au cours de la phase d'incubation *in vitro* du radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG en intégrant des paramètres de marquage réalistes, issus de huit publications de la littérature.

Les paramètres utilisés pour les calculs ont été les suivants : l'activité volumique (MBq/mL), la densité cellulaire (cellules/mL), le temps d'incubation (min) et l'efficacité de marquage (%).

Les valeurs de ces paramètres pour chaque article sont récapitulées dans le **tableau 2.2** qui sera présenté dans la partie résultat.

Dans deux des publications impliquant des leucocytes (92, 26), la densité cellulaire n'étant pas explicitement indiquée, nous l'avons estimée à partir de la concentration moyenne de leucocytes dans le sang à 7.10^6 leucocytes/mL (196). Le paramètre k a ainsi pu être déduit à partir de la densité cellulaire et l'efficacité de marquage (cf. **équation 2.6**). Les valeurs d'activité par cellule (Bq/cellule) ont également été intégrées dans le **tableau 2.2**. Certaines valeurs sont explicitement données, d'autres sont déduites en divisant l'activité volumique par la densité cellulaire puis en multipliant par l'efficacité de marquage.

L'activité cumulée totale dans les cellules a ainsi été obtenue par intégration de l'activité entre 0 et le temps d'incubation t_{incub} , tel que $A_{cel} = \text{eff}(\%) \times A(t_{incub})$; $A(t_{incub})$ étant corrigée de la décroissance radioactive. Pour ce calcul, afin de tenir compte du fait que l'activité n'est pas immédiatement internalisée dans les cellules, nous avons considéré une incorporation linéaire de l'activité en fonction du temps (197).

3 Résultats

3.1 Étude de la convergence du facteur $\bar{S}^{croisé}$ en fonction du volume d'étude et du nombre de cellules

La **figure 2.6** montre pour les trois radionucléides considérés, la variation du facteur $\bar{S}^{croisé}$ moyen en fonction du volume d'étude (en cm^3) et du nombre de cellules dans le cas d'un réseau cubique compact.

On observe que le tir croisé moyen augmente avec le volume et le nombre de cellules puis converge. Pour le ^{64}Cu , le facteur $\bar{S}^{croisé}$ atteint $0,015 \text{ Gy}/(\text{Bq}\cdot\text{s})^{-1}$ à partir d'un volume de $0,035 \text{ cm}^3$. Le facteur S pour le ^{18}F converge à un volume un peu plus élevé ($0,013 \text{ cm}^3$) vers $0,036 \text{ Gy}\cdot(\text{Bq}\cdot\text{s})^{-1}$. Enfin, le ^{68}Ga présente les valeurs de $\bar{S}^{croisé}$ les plus élevées, environ 2 à 5 fois supérieures à celles du ^{18}F et ^{64}Cu avec une convergence plus lente. Le facteur $\bar{S}^{croisé}$ converge en effet à partir d'un volume de $0,545 \text{ cm}^3$, impliquant

plus de $500 \cdot 10^6$ cellules.

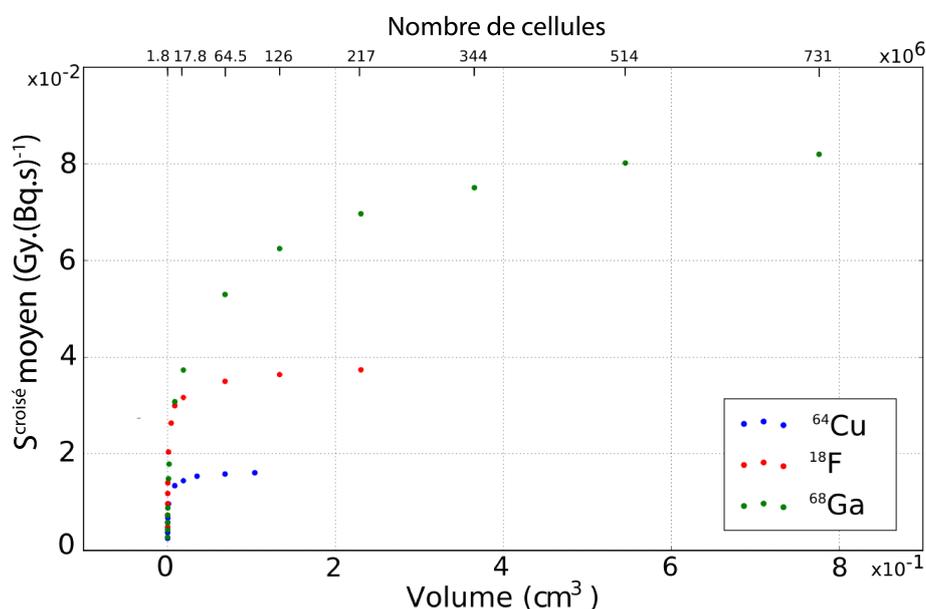


FIGURE 2.6 – Effet de la taille du volume d'étude sur le facteur $S^{croisé}$ moyen pour une distribution de cellules dans un réseau cubique compact. Pour les trois radionucléides, la source a été placée dans le noyau.

3.2 Effet de la densité cellulaire sur la dose absorbée moyenne au noyau

La **figure 2.7** montre la dose absorbée moyenne délivrée au noyau d'une cellule D_N en fonction de la densité cellulaire variant entre $9,5 \cdot 10^5$ cellules/mL et $3 \cdot 10^8$ cellules/mL. Dans cet exemple, nous avons considéré que 100% de l'activité totale était internalisée dans les cellules ou en surface, ce qui correspond à une valeur de $k=+\infty$. La localisation des sources est précisée entre parenthèses pour chaque radionucléide.

Une augmentation linéaire de la dose absorbée en fonction de la densité cellulaire est observée. Celle-ci est attribuée au tir croisé puisque l'auto-absorption est indépendante de la configuration géométrique. La courbe de dose du ^{68}Ga présente la valeur de pente la plus importante ($p = 5,33$). Elle est 2,6 et 5 fois plus élevée que celle obtenue pour respectivement le ^{18}F ($p = 2,06$) et le ^{64}Cu ($p = 1,04$). Ce résultat est lié à l'énergie des particules β émises contribuant majoritairement au tir croisé.

Pour la densité la plus faible ($9,5 \cdot 10^5$ cellules/mL), les doses absorbées sont respectivement de 1,01 Gy, 0,05 Gy et 0,12 Gy pour ^{64}Cu , ^{68}Ga et ^{18}F . Ces valeurs tendent vers la dose auto-absorbée. En effet, le pourcentage de contribution de la dose auto-absorbée représente à cette densité 97%, 96% et 83% dans le cas du ^{64}Cu , du ^{18}F et du ^{68}Ga , respectivement. La dose auto-absorbée est principalement due aux

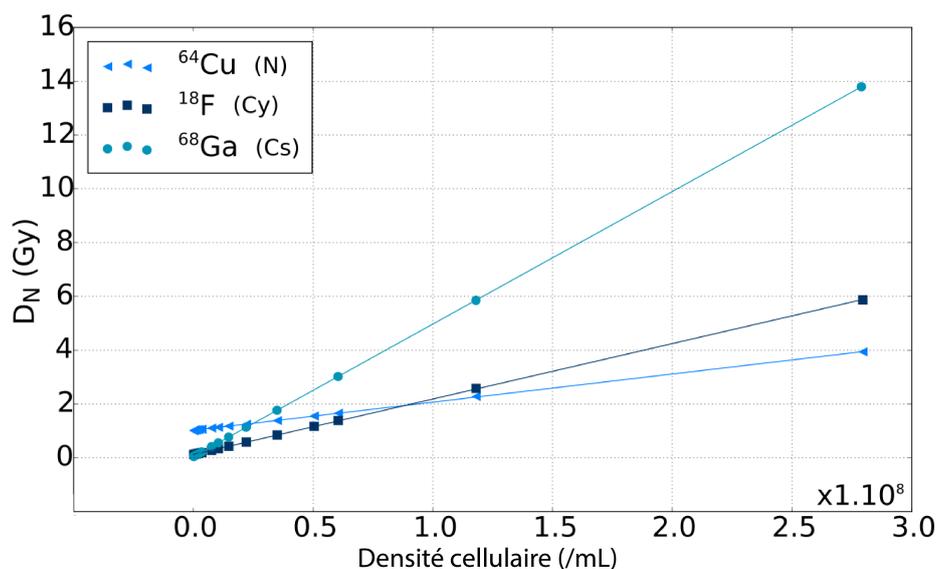


FIGURE 2.7 – Effet de la densité cellulaire sur les valeurs moyennes de $S_{croisé}$. La source a été distribuée dans le noyau (N) pour le ^{64}Cu , dans le cytoplasme (Cy) pour le ^{18}F et au niveau de la surface cellulaire (Cs) pour le ^{68}Ga .

électrons Auger (76,7%) pour le ^{64}Cu , ou aux particules β pour le ^{18}F et le ^{68}Ga (respectivement 99,1% et 92,5%) (cf. Annexe 1).

3.3 Effet de l'efficacité de marquage sur la dose absorbée moyenne au noyau

Sur la **figure 2.8**, la dose absorbée moyenne au noyau d'une cellule et ses trois contributions (auto-absorption, tir croisé, dose non-spécifique) sont représentées en fonction de l'efficacité de marquage (de 0 à 90%) et du paramètre k correspondant.

Les résultats sont présentés pour deux densités cellulaires : $1 \cdot 10^6$ cellules/mL (faible densité) et $50 \cdot 10^6$ cellules/mL (haute densité). Globalement, une augmentation linéaire de la dose absorbée totale a été observée en fonction de l'efficacité, en conséquence de l'équilibre entre l'augmentation linéaire de l'auto-absorption et du tir croisé et la diminution de la dose non-spécifique provenant de l'activité dans le milieu extra-cellulaire. Nous observons que les valeurs de doses absorbées en fonction de l'efficacité de marquage et du paramètre k varient significativement selon la densité cellulaire et le radionucléide.

À $1 \cdot 10^6$ cellules/mL, la dose absorbée provient essentiellement de la dose auto-absorbée pour le ^{64}Cu ; les deux courbes se superposent quasiment. À une densité plus élevée ($50 \cdot 10^6$ cellules/mL), le tir croisé devient prédominant mais la dose auto-absorbée du ^{64}Cu reste importante.

Les résultats pour le ^{18}F montrent que la dose auto-absorbée devient prédominante dès 20% d'efficacité à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL, et représente plus de 80% de la dose totale à 90% d'efficacité.

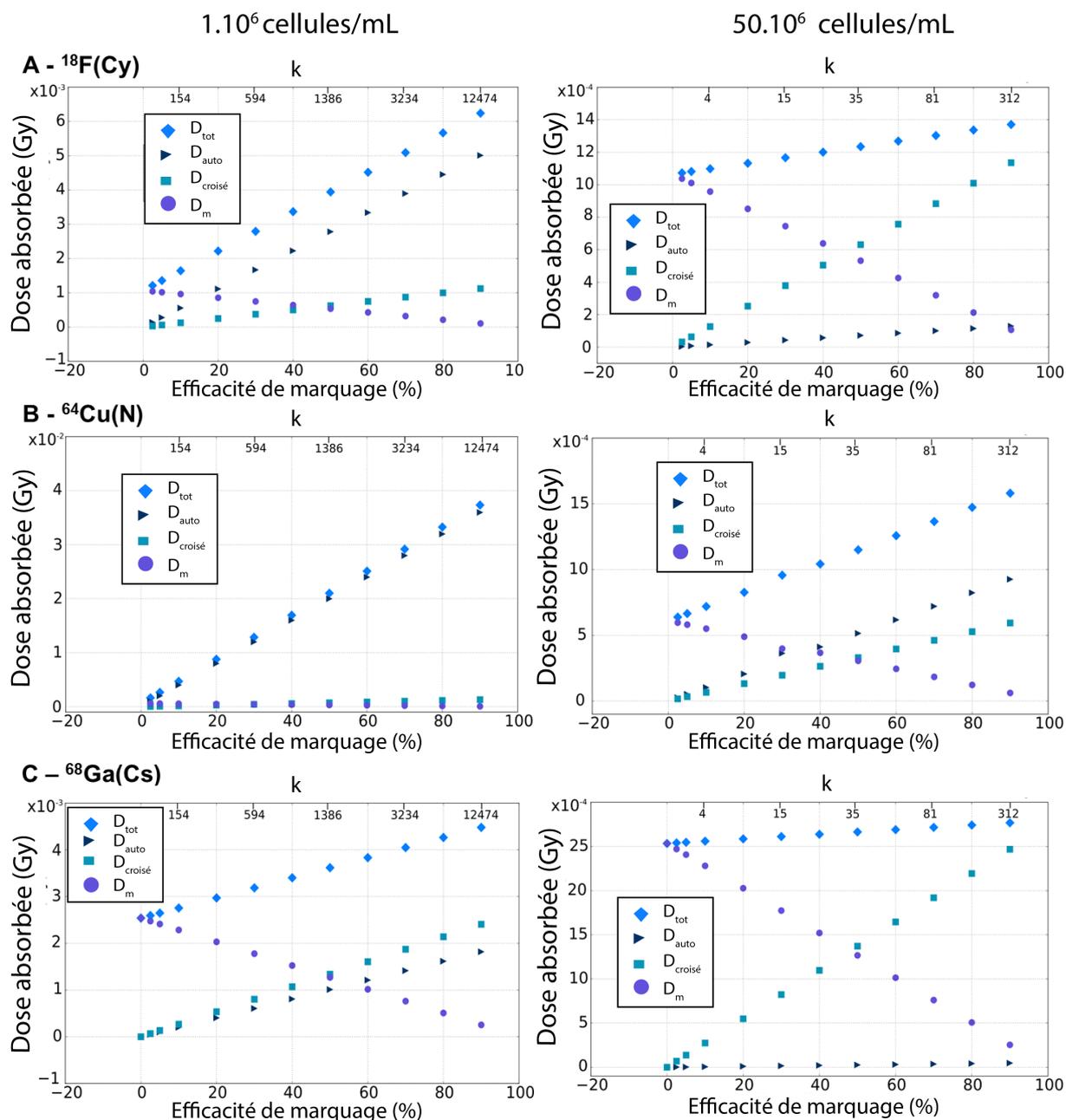


FIGURE 2.8 – Pour le ^{18}F (A), ^{64}Cu (B) et ^{68}Ga (C) : courbe de la dose moyenne absorbée totale aux cellules et de ses trois contributions (auto-absorption, tir croisé et dose non-spécifique) en fonction de l'efficacité de marquage et du paramètre k correspondant, pour une densité cellulaire de 1.10^6 cellules/mL (gauche) et 50.10^6 cellules/mL (droite).

Le tir croisé reste une contribution mineure quelle que soit l'efficacité à 1.10^6 cellules/mL. À 50.10^6 cellules/mL, en revanche, le tir croisé est prédominant dans la dose absorbée, et de manière plus prononcée que pour le ^{64}Cu .

En contraste, pour le ^{68}Ga , malgré une faible densité cellulaire (1.10^6 cellules/mL), la dose auto-absorbée est systématiquement plus faible que le tir croisé quelle que soit l'efficacité de marquage. À 50.10^6 cel-

lules/mL, l'écart entre la dose auto-absorbée et le tir croisé devient encore plus important.

Pour le ^{68}Ga et le ^{18}F , le point de croisement entre le tir croisé et la dose non-spécifique est à 50% d'efficacité de marquage pour les deux valeurs de densité cellulaire, ce qui correspond à une valeur de k de 1386 à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL contre 35 seulement à $50 \cdot 10^6$ cellules/mL.

3.4 Effets de la densité cellulaire et du paramètre k sur les écarts entre D_{cel} et D_{conv}

La dernière étude de cette analyse paramétrique a consisté à évaluer les conditions limites pour lesquelles la dosimétrie cellulaire apporte une précision de calcul significative par rapport à la dosimétrie conventionnelle.

Le rapport D_N/D_{conv} pour les trois radionucléides est présenté **figure 2.9** à gauche en fonction de la densité cellulaire et pour quatre valeurs de k (1, 100, 1000, et $+\infty$). Pour les trois radionucléides, les résultats montrent une influence du paramètre k sur l'écart entre la dose cellulaire et la dose conventionnelle à faible densité. Une différence plus marquée est observée lorsque $k=\infty$, c'est-à-dire lorsque toute l'activité a été internalisée dans les cellules ou en surface.

Cette différence reflète une sous-estimation de la dose absorbée aux cellules calculée par l'approche conventionnelle, reposant sur l'hypothèse que l'activité est répartie de manière uniforme dans tout le volume d'étude. Les écarts sont les plus importants pour le ^{64}Cu , le rapport D_N/D_{conv} atteignant 77 à une densité de $9,5 \cdot 10^5$ cellules/mL. En contraste, à cette densité cellulaire, le rapport est de 8,3 respectivement pour le ^{18}F et 2,2 pour le ^{68}Ga , soit 9 et 35 fois plus faible.

Les écarts obtenus diminuent lorsque k diminue également c'est-à-dire lorsque la concentration d'activité s'équilibre entre les cellules et le milieu extra-cellulaire.

Pour le ^{64}Cu , à $9,5 \cdot 10^5$ cellules/mL, le rapport D_N/D_{conv} diminue à une valeur de 26 lorsque $k=1000$ puis à une valeur de 6 lorsque $k=100$. Pour le ^{18}F et le ^{68}Ga , le rapport diminue respectivement à 3,5 et 1,4 lorsque $k=1000$, puis 1,4 et 1 lorsque $k=100$.

L'hypothèse d'uniformité de l'activité dans tout le volume correspond au cas où $k=1$; à cette valeur nous avons bien obtenu un rapport D_N/D_{conv} égal à 1, quelle que soit la densité cellulaire et le radionucléide. Finalement, pour le ^{18}F et le ^{68}Ga , les résultats indiquent que la densité cellulaire a peu d'impact sur la différence entre les doses calculées avec le modèle cellulaire ou le modèle conventionnel pour une valeur de k en dessous de 100, le rapport D_N/D_{conv} approchant 1.

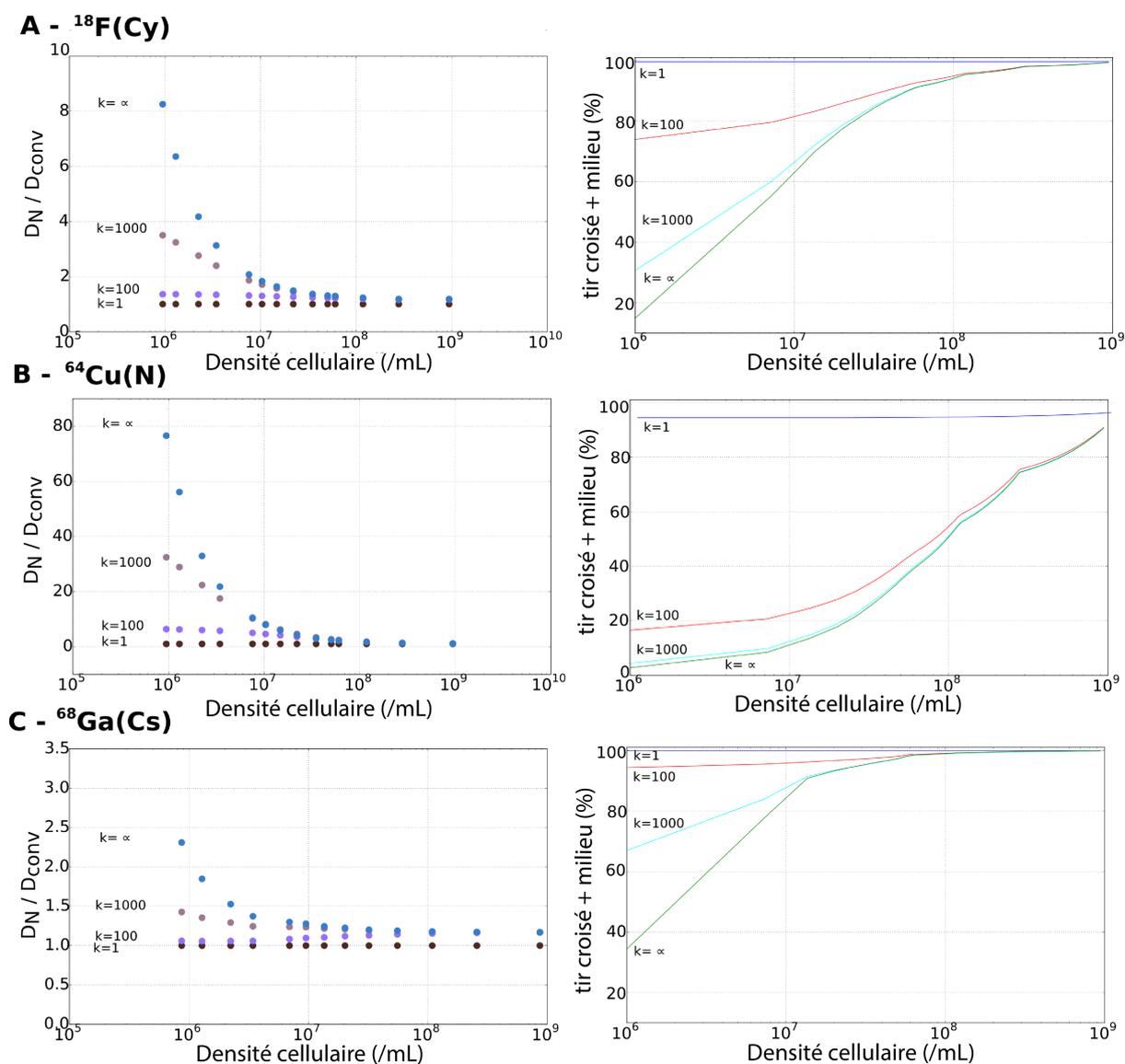


FIGURE 2.9 – Pour le ^{18}F (A), ^{64}Cu (B) et ^{68}Ga (C) : **(gauche)** courbe du rapport de la dose absorbée moyenne au noyau calculée avec le modèle cellulaire et de la dose conventionnelle D_N/D_{conv} en fonction de la densité cellulaire, pour quatre valeurs de k (1, 100, 1000, $+\infty$). **(droite)** somme des contributions du tir croisé et du milieu extra-cellulaire (dose non-spécifique) à la dose absorbée totale en fonction de la densité cellulaire, pour quatre valeurs de k (1, 100, 1000, $+\infty$).

Les courbes présentées **figure 2.9** à droite montrent le pourcentage de dose provenant du tir croisé et de la dose non-spécifique. À $k=+\infty$, les valeurs tracées correspondent à la contribution du tir croisé seul puisque qu'il s'agit du cas où l'activité est entièrement dans les cellules ou en surface (*i.e.*, l'activité est nulle dans le milieu extra-cellulaire). On peut noter que les valeurs du rapport D_N/D_{conv} sont d'autant plus importantes que la contribution du milieu et du tir croisé sont faibles, donc lorsque la densité cellulaire diminue et lorsque k augmente.

Quand $k=1$, la dose absorbée provient essentiellement du tir croisé et de la dose non-spécifique pour les trois radionucléides. Pour le ^{18}F et le ^{68}Ga , la somme de ces deux contributions augmente rapidement avec la densité cellulaire, au détriment de l'auto-absorption et converge vers les 100% de contribution à haute densité.

À $9,5 \cdot 10^6$ cellules/mL, la densité cellulaire la plus faible étudiée ici, les contributions du tir croisé et du milieu atteignent 94,3%, 66,5% et 33,2% pour le ^{68}Ga , contre 73,8%, 29,8% et 13,7% pour le ^{18}F à respectivement $k=100, 1000$ et $+\infty$. Ainsi, pour le ^{68}Ga , les contributions du tir croisé et du milieu sont prédominants pour toutes les densités cellulaires représentées, sauf en dessous de $1,5 \cdot 10^6$ cellules/mL lorsque $k=+\infty$. Une différence marquée dans la tendance de ces courbes est observée pour le ^{64}Cu . À $9,5 \cdot 10^5$ cellules/mL, la contribution de l'auto-absorption est supérieure à 80% pour toutes les valeurs de k et devient minoritaire à partir de $1 \cdot 10^8$ cellules/mL environ.

3.5 Dosimétrie du radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG à partir de données de la littérature

Comme déjà indiqué, les calculs dosimétriques ont été réalisés dans des conditions réalistes de radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG. La dose délivrée pendant la phase d'incubation du radiomarquage a été estimée à partir des différents paramètres de marquages utilisés dans huit publications impliquant des leucocytes, des lymphocytes ou granulocytes seuls et des cellules souches. Les résultats sont présentés dans le **tableau 2.2**.

La grande disparité des paramètres de marquage utilisés est ici mise en évidence. On observe notamment une activité volumique variant entre 9,3 MBq/mL et 440 MBq/mL, et un écart entre les valeurs de densité cellulaire pouvant atteindre un facteur supérieure à 100. La dose moyenne absorbée aux cellules D_N et le rapport des doses D_N/D_{conv} ont été calculés à partir des paramètres de marquage et sont présentés dans les deux dernières colonnes du **tableau 2.2**.

Les doses absorbées obtenues varient considérablement, de 0,97 pour Botti *et al.* (87) à 252 Gy pour Meier *et al.* (65). Il est montré également que des valeurs d'activité par cellule proches, par exemple 1,89 MBq/cellule dans Rini *et al.* (92), 1,71 MBq/cellule dans Miñana *et al.* (84) et 2,03 MBq/cellule dans Osman *et al.* (21) peuvent entraîner des doses absorbées significativement différentes, atteignant une différence d'un facteur 8 entre les doses obtenues pour les données de Rini *et al.* (92) (29,7 Gy) et celles d'Osman *et al.* (21) (3,68 Gy).

De plus, on remarque que l'activité volumique a eu un impact très important sur la dose absorbée mais sans que l'on observe nécessairement une relation proportionnelle entre les deux quantités. Par exemple, l'activité volumique de 9,9 MBq/mL utilisée par Elhami *et al.* (86) a induit une dose de 4,6 Gy, deux fois plus

Tableau 2.2 – Calcul de la dose absorbée moyenne aux cellules délivrée au cours de l'incubation de cellules avec le ^{18}F -FDG réalisé à partir des paramètres de marquages utilisés dans différentes publications et comparaison avec la dose conventionnelle. Leuco. et lympho. signifient respectivement leucocytes et lymphocytes. CSA = Cellules souches adipeuses. ρ représente la densité cellulaire ; *Eff* désigne l'efficacité de marquage ; *Act. vol.* désigne l'activité volumique ; T_{incub} désigne le temps d'incubation.

Cellule	Ref.	ρ (cellules/mL)	Act. vol. (MBq/mL)	Eff (%)	k	T_{incub} (min)	Act/cellule (MBq)	D_N	D_N/D_{conv}
Lympho.	Botti <i>et al.</i> (87)	$5 \cdot 10^7$	9,3	64	14,3	30	0,15	0,97	1,06
CSA	Elhami <i>et al.</i> (86)	$2 \cdot 10^5$	9,9	15	531	90	7,40	4,6	3,13
Leuco.	Rini <i>et al.</i> (92)	$2 \cdot 10^8$	440	72	3,9	30	1,89	29,7	0,99
Leuco.	Miñana <i>et al.</i> (84)	$1 \cdot 10^8$	40,6	59,3	6,4	25	1,71	2,4	1,01
Granulo.	Osman <i>et al.</i> (21)	$1 \cdot 10^7$	27	80	92	30	2,03	3,68	1,29
Leuco.	Meier <i>et al.</i> (65)	$5 \cdot 10^5$	170	72	1141	120	272	252	5,25
Leuco.	Pellegrino <i>et al.</i> (25)	$1 \cdot 10^8$	148	64	7,3	20	0,42	7,3	0,95
Leuco.	Dumarey <i>et al.</i> (26)	$2 \cdot 10^8$	296	80	5	30	1,21	20,4	0,99

élevée que celle obtenue dans le cas de l'étude d'Osman *et al.* (21) pour une activité de 27 MBq/mL. Dans cinq des huit études rapportées, la différence relative entre la dose conventionnelle et la dose absorbée moyenne au noyau des cellules est inférieure à 5% ; pour les trois autres, une sous-estimation significative de la dose conventionnelle par rapport à la dose absorbée moyenne réellement délivrée aux cellules a pu être mise en évidence, le rapport D_N/D_{conv} atteignant 5,25 (21, 86, 65).

4 Discussion

4.1 Développement d'une méthode de calcul hybride

Nous nous sommes intéressés à la dosimétrie de trois émetteurs β^+ d'intérêt pour le suivi de cellules par imagerie TEP : le ^{18}F -FDG, le ^{68}Ga -DOTA peptide et le ^{64}Cu -PTSM.

Le calcul de la contribution du tir croisé à une cellule cible a représenté un défi car impliquant un nombre très important de cellules (jusqu'à plus de 1.10^8 cellules).

À cette fin, une approche hybride a été utilisée, consistant à implémenter un programme pour générer la distribution spatiale de cellules puis sommer les contributions selon les distances relatives entre les cellules, à partir de facteurs S pré-déterminés. Les facteurs S de paires peuvent être calculés par des méthodes analytiques, des simulations Monte-Carlo (118) ou dérivés de point dose kernels DPK.

Dans cette étude, des simulations Monte-Carlo MCNP6 ont été réalisées pour calculer les facteurs S et un programme sous Python a été implémenté pour la partie analytique. Pour les trois radionucléides étudiés, des calculs du tir croisé moyen ont d'abord été effectués en faisant varier le volume d'étude et donc le nombre de cellules pour un réseau de cellules compact, afin de déterminer le nombre minimal de cellules à intégrer dans le modèle pour le calcul de la dose moyenne absorbée et l'étude paramétrique qui a suivi.

Les résultats ont montré que le tir croisé moyen convergait à partir d'un certain volume. Cet effet de convergence est apparu lorsque l'addition des cellules à des distances très éloignées ne contribue plus à la dose, du fait du parcours limité des particules β^+ . La même tendance a été observée pour le ^{64}Cu par Cai *et al.* (112) qui ont calculé les facteurs $S^{\text{croisé}}$ pour différentes tailles de clusters de cellules sphériques selon un réseau hexagonal. Par ailleurs, Goddu *et al.* (99) ont estimé des rapports de facteurs d'auto-absorption sur tir croisé au noyau cellulaire pour différentes tailles de volumes (jusqu'à $400 \mu\text{m}$) pour des émetteurs β , Auger, α . Ils ont également montré que pour les émetteurs β , le tir croisé augmentait avec la taille du volume d'étude.

4.2 Influence de la densité cellulaire et de l'efficacité de marquage sur la dose absorbée

L'augmentation linéaire du tir croisé en fonction de la densité cellulaire (**figure 2.7**) vient de l'augmentation proportionnelle du nombre de cellules marquées avec la densité cellulaire, à toute distance relative d'une cellule cible. Quand la densité cellulaire diminue, les cellules s'éloignent les unes des autres, ce qui fait baisser la contribution du tir croisé au bénéfice de celle induite par l'auto-absorption. L'internalisation du

^{64}Cu -PTSM dans le noyau cellulaire conduit à une dose auto-absorbée bien plus grande que celle du ^{68}Ga et du ^{18}F en raison des électrons Auger qui déposent toute leur énergie à proximité du noyau.

L'augmentation de l'efficacité de marquage entraîne conjointement l'augmentation de la dose auto-absorbée et du tir croisé et par la même la diminution de la dose non-spécifique. Les trois contributions relatives en fonction de l'efficacité varient fortement selon la densité cellulaire et le radionucléide considéré. Dans le cas du ^{64}Cu , la dose totale absorbée est essentiellement due à la dose auto-absorbée à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL et à $50 \cdot 10^6$ cellules/mL en raison du faible parcours de ses électrons Auger. Dans le cas du ^{18}F , le tir croisé prédomine largement à $50 \cdot 10^6$ cellules/mL. Cet effet est encore plus prononcé dans le cas du ^{68}Ga pour lequel le tir croisé reste prépondérant par rapport à l'auto-absorption pour les deux valeurs de densité cellulaire, en raison de l'émission d'un β d'énergie moyenne plus élevée. Pour le ^{18}F et pour le ^{68}Ga , la même valeur de tir croisé pour les deux densités a été atteinte pour une activité intra-cellulaire plus faible à $50 \cdot 10^6$ cellules/mL dû au facteur $S^{\text{croisé}}$ associé plus important.

Pour tous les radionucléides, nous avons supposé une activité totale de 1 MBq et nous avons fixé le temps d'incubation à 1h afin de comparer les valeurs en termes de dose absorbée en Gy. Notons cependant, qu'en pratique, le temps d'incubation varie selon le radionucléide et dépend de multiples facteurs : la cinétique d'absorption du ligand, le type cellulaire et la période physique du radionucléide.

Pour le ^{18}F et le ^{68}Ga de courtes périodes physiques, le temps d'incubation n'excède pas 1h. Cependant, pour le ^{64}Cu , suivant différentes études (6, 89, 67), le temps d'incubation peut aller de 1h à 5h. Dans ce cas, des doses absorbées significativement plus grandes que celles présentées dans notre étude systématique auraient alors été obtenues.

4.3 Dose conventionnelle *versus* Dose cellulaire

Nous avons ensuite déterminé les conditions pour lesquelles la dosimétrie conventionnelle sous-estime ou sur-estime la dose absorbée à la cellule.

Le parcours relativement long des particules β permet de contrebalancer dans une certaine mesure les effets de l'hétérogénéité dans la distribution d'activité à petite échelle. Cet aspect est beaucoup discuté dans la littérature et particulièrement pour l' ^{131}I utilisé en radioimmunothérapie (198, 102, 199, 200, 115, 109). Une variation de la réponse biologique a été observée par plusieurs auteurs (117, 201), qui serait liée à la fois à la distribution de l'activité mais également à la variation des réponses cellulaires induites par la dose auto-absorbée et le tir croisé.

4.3.1 Effets de la densité cellulaire et du paramètre k

Dans notre modèle cellulaire, l'hypothèse selon laquelle le radionucléide est uniformément distribué dans le volume d'étude, comme défini dans le modèle conventionnel correspond au cas où $k=1$, quels que soient la densité cellulaire et le radionucléide. Quand $k>1$, la distribution d'activité est hétérogène et la concentration d'activité est supérieure dans les cellules par rapport au milieu extra-cellulaire. Les écart obtenus entre D_N et D_{conv} deviennent alors dépendants de la densité cellulaire et du radionucléide.

Globalement, les résultats ont montré que le rapport D_N/D_{conv} était plus grand à faible densité cellulaire et diminuait rapidement avec la densité cellulaire pour chaque k et radionucléide, jusqu'à ce que le rapport approche 1 dans le cas d'une distribution compacte des cellules. Ce résultat est une conséquence de l'homogénéisation de l'activité dans le volume global résultant du rapprochement des cellules entre elles. L'augmentation de la densité cellulaire implique l'augmentation du nombre de cellules contribuant au tir croisé pour un volume donné. Quand les cellules sont en configuration compacte, il subsiste toutefois une sous-estimation de la dose absorbée aux cellules induite par le modèle conventionnel, en raison de l'espace non occupé par les cellules.

L'augmentation de D_N/D_{conv} a aussi lieu lorsque k augmente, c'est-à-dire lorsque l'activité diminue dans le milieu extra-cellulaire et augmente dans les cellules. Dans ce cas, la contribution non-spécifique de la dose diminue aux dépens de la contribution auto-absorbée. En considérant les mêmes paramètres de radiomarquage, le rapport D_N/D_{conv} varie significativement selon le radionucléide utilisé. Les valeurs dépendent en grande partie du type et de l'énergie des émissions électroniques associés. Ici, la proportion de contribution de l'auto-absorption et du tir croisé est importante pour l'interprétation des différences D_N/D_{conv} entre les radionucléides.

4.4 Effet du radionucléide

Pour les trois radionucléides, les contributions venant du tir croisé et du milieu extra-cellulaire proviennent principalement des particules β émises, celles-ci déposant leur énergie sur une plage de quelques millimètres. La majorité de l'énergie des β est alors délivrée aux cellules voisines ou dans le milieu extra-cellulaire.

Dans le cas d'un tir croisé important, l'impact de l'hétérogénéité de la distribution de l'activité sur la dose absorbée est atténuée. Par conséquent, la différence entre la dose cellulaire et la dose conventionnelle est réduite, et ce d'autant plus lorsque l'énergie des β est élevée. Ceci explique le faible rapport D_N/D_{conv} pour le ^{18}F et encore plus pour le ^{68}Ga qui émet le β de plus grande énergie.

Par contraste, les différences relatives ont été particulièrement importantes pour le ^{64}Cu comparé aux deux autres radionucléides. À faible densité cellulaire, les valeurs relativement élevées du rapport D_N/D_{conv} sont davantage liées à l'émission des électrons Auger à une fréquence importante (>80%) qu'à celle de particules β de plus petites énergies. Leur parcours assez court combiné à une distribution de l'activité hétérogène entraînent un dépôt hétérogène de la dose à l'échelle cellulaire qui peut résulter en une différence significative de la dose réellement délivrée aux cellules avec celle obtenue avec le modèle conventionnel. Il est admis que la dose auto-absorbée est fortement dépendante de la localisation sub-cellulaire de l'activité, d'autant plus lorsque la région d'émission et la région cible sont proches (99, 176). Ainsi, le fait que le ^{64}Cu ait été distribué dans le noyau a été un facteur déterminant dans l'augmentation de l'auto-absorption et ainsi dans l'augmentation des écarts entre D_N et D_{conv} . Une augmentation plus lente des contributions de tir croisé et du milieu pour le ^{64}Cu a été observée lorsque la densité cellulaire augmente. De plus, les rapports D_N/D_{conv} ont été significativement plus élevés que pour les deux autres radionucléides lorsque l'auto-absorption est prédominante.

Des tendances similaires ont été trouvées par Makrigiorgos *et al.* (195) pour des émetteurs Auger (^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In). Les différences sont néanmoins moins marquées pour le ^{64}Cu que pour ces radionucléides, étant donné l'émission des β .

Au-delà de l'aspect dosimétrique pur, il faut souligner que le rapport variable de la contribution auto-absorption/tir croisé peut entraîner des différences significatives dans la réponse biologique des cellules. La distinction entre ces deux contributions est donc importante. Il a été montré par exemple que la dose auto-absorbée était trois fois plus létale que le tir croisé, pour une source d' ^{131}I internalisée dans le noyau de cellules, du fait des électrons Auger (199). Dans le contexte de notre étude, on peut donc s'attendre à ce que l'internalisation du ^{64}Cu -PTSM dans le noyau entraîne des effets cytotoxiques relativement sévères par rapport aux deux autres radionucléides, pour une même dose.

En conclusion, la dosimétrie conventionnelle peut sous-estimer considérablement la dose délivrée aux noyaux des cellules lorsque la dose provient majoritairement de l'auto-absorption qui dépend d'un ensemble de facteurs : la distribution de l'activité, la densité cellulaire et le type de radionucléide. Les principales conditions de marquage entraînant un rapport D_N/D_{conv} élevé sont ainsi : (i) une diminution de la densité cellulaire, responsable d'une diminution du tir croisé, (ii) une augmentation du paramètre k qui diminue la contribution non-spécifique et (iii) l'émission d'électrons Auger à partir du noyau, qui augmente l'auto-absorption.

4.5 Doses absorbées dans le contexte d'une radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction de ce chapitre, les études portant sur l'impact du radiomarquage sur les cellules évaluent souvent les effets biologiques en fonction de l'activité ou une activité par cellule, désignée alors comme "la dose de marquage" (49). Pour évaluer les biais induits par l'utilisation de ce référentiel, nous avons estimé puis comparer la dose absorbée délivrée au cours de l'incubation du radiomarquage à partir de conditions de marquage issues d'un recueil de publications. Il s'agit d'études dans lesquelles le radiomarquage de cellules a été effectuée pour une utilisation chez l'homme.

Les résultats ont montré que des valeurs d'activité par cellule similaires pouvaient correspondre à des valeurs de doses absorbées significativement différentes, allant de 0,58 Gy à plus d'une centaine de Gy (144 Gy). Cette observation confirme la nécessité de comparer les effets biologiques observés à la dose absorbée aux cellules et non à l'activité pour mener des études radiobiologiques pertinentes et comparer les procédures de radiomarquage, surtout lorsque les conditions *in vitro* varient beaucoup.

De plus, les écarts significatifs entre la dose D_N et la dose conventionnelle D_{conv} observés pour certaines conditions (jusqu'à un facteur 4,7) soulignent l'importance de l'utilisation d'une dosimétrie cellulaire pour l'évaluation de la dose absorbée aux cellules dans un contexte de radiomarquage cellulaire avec des émetteurs β^+ . Etant donné l'ordre de grandeur des doses absorbées calculées (plusieurs Gy), un écart d'un facteur 2 peut déjà entraîner un biais important si on compare des configurations d'irradiation ou si on compare des effets, se traduisant par exemple par une sous-estimation ou sur-estimation de la mortalité des cellules.

De plus, en accord avec les résultats de l'étude systématique, nous retrouvons bien des écarts plus important entre la dose absorbée au noyau et la dose conventionnelle dans des conditions de faible densité cellulaire ($2 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$ cellules/mL) et/ou de forte efficacité de marquage (70-75%).

4.6 Limitations du modèle

Dans notre modèle dosimétrique, des hypothèses de modélisation ont été fixées avec l'objectif de réaliser des analyses comparées. Si l'on souhaitait améliorer la précision de la dose absorbée estimée, des variables non prises en compte ici pourraient être importantes à considérer selon les conditions de l'étude.

La taille des cellules est par exemple un paramètre d'influence de la dose absorbée. Dans notre étude, une taille de cellule fixe ($R_N = 4 \mu\text{m}$, $R_C = 5 \mu\text{m}$) a été considérée pour tous les calculs. La prise en compte de la variabilité de ce paramètre pourrait induire des changements dans les valeurs de dose absorbée obtenues

dans le **tableau 2.2**, d'autant plus que différents types de cellules sont concernés.

De plus, dans le cas du marquage de leucocytes, le modèle suppose une incorporation identique pour toutes les cellules (lymphocytes, polynucléaires). Cependant, il a été mis en évidence que les polynucléaires captent plus le ^{18}F -FDG que les lymphocytes (78,5% du ^{18}F -FDG incorporé concentré dans les granulocytes (202)). Ces différences d'incorporation, pouvant entraîner des différences dans la dose absorbée et dans la réponse biologique globale des cellules, devraient alors être considérées.

Par ailleurs, notre étude s'est appuyée sur le calcul de la dose absorbée moyennée sur l'ensemble des cellules en considérant une activité par cellule constante. L'hypothèse d'une distribution hétérogène de l'activité dans les cellules avec un modèle lognormal par exemple aurait eu peu d'impact sur le résultat car l'activité moyenne par cellule reste la même. Toutefois il faut souligner que, dans des conditions où la dose individuelle des cellules varie beaucoup, la dose absorbée moyenne peut ne plus être pertinente et affecter significativement la réponse biologique. Dans un objectif de prédiction d'un paramètre biologique, il est alors nécessaire de modéliser l'hétérogénéité de distribution de l'activité au sein de la population de cellules et de prendre en compte la dose reçue pour chaque cellule. Dans le cas de géométries cellulaires de tailles limitées, le MIRDCell est d'ailleurs un bon outil pour évaluer l'impact de cette variable sur les courbes de survie (127), à travers l'implémentation d'un modèle log-normal de distribution de l'activité. Enfin, concernant la configuration géométrique, nous avons pris en compte une distribution de cellules selon une structure en réseau, représentant, de manière générale, le modèle le plus utilisé pour le calcul de tir croisé dans des clusters de cellules (106, 127, 112, 103).

Dans le contexte du marquage de cellules en suspension, une distribution aléatoire uniforme serait plus représentative de la procédure, où les cellules sont généralement mélangées en suspension avec la solution radioactive pendant un temps d'incubation donné. La génération de multiples configurations aléatoires permettrait d'établir une dose absorbée moyenne qui ne dépend pas d'une configuration géométrique spécifique. De ce fait, il semble important d'évaluer l'impact de la configuration géométrique sur la dose absorbée afin de mesurer les éventuels biais introduits par cette variable et vérifier l'apport de configurations plus complexes que le réseau.

5 Conclusion

L'évaluation de la dose absorbée moyenne aux cellules pour le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM et le ^{68}Ga -DOTA peptide a permis de mieux comprendre l'influence individuelle et co-influence de paramètres clés du radio-marquage, à savoir l'efficacité de marquage et la densité cellulaire.

La comparaison entre la dosimétrie cellulaire et conventionnelle a confirmé des différences marquées

lorsque des électrons Auger sont émis à partir d'une source internalisée dans le noyau (le cas du ^{64}Cu dans notre étude). Les écarts sont plus faibles pour le ^{18}F -FDG et le ^{68}Ga -DOTA peptide mais restent significatifs à faible densité et/ou pour une efficacité de marquage élevée atteignant à $9,5 \cdot 10^5$ cellules/mL un facteur de respectivement 8 et 2.

Enfin, les calculs dosimétriques réalisés à partir de paramètres de marquage issus de données de la littérature, dans le contexte d'un radiomarquage cellulaire au ^{18}F -FDG, ont permis de souligner l'importance de corrélérer les effets biologiques à des doses absorbées précises.

Au-delà du cadre précis d'un radiomarquage de cellules pour les études de suivi cellulaire par imagerie, l'outil de calcul implémenté est générique et peut être appliqué à tous types d'émetteurs dans des conditions *in vitro* variées, notamment pour la modélisation de tests clonogéniques dédiés à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de radiopharmaceutiques émetteurs β^- .

Toutefois, une des limites de la méthode implémentée ici est le temps de calcul du tir croisé relativement important dans le cas d'un grand nombre de cellules à prendre en compte dans le modèle.

Cet écueil nous a conduit à explorer, dans le chapitre suivant, une autre méthode de calcul permettant d'optimiser la dosimétrie multi-cellulaire. Par ailleurs, comme évoqué dans la discussion, l'impact d'une configuration géométrique plus réaliste sur la dose absorbée doit être évalué. Cet aspect qui, à notre connaissance, n'a pas été traité dans la littérature, fera l'objet d'une partie exposée dans le chapitre 3.

Chapitre 3.

Optimisation du calcul du tir croisé à l'aide de fonctions de distribution radiale

1 Introduction

Comme montré dans le chapitre précédent, l'utilisation d'une approche de référence basée sur l'utilisation de facteurs S de paires présente l'avantage d'être générique et de s'appliquer à tout type de configuration géométrique, sans limite de taille pour le volume d'étude. De plus, une fois les facteurs S obtenus, cette approche constitue un moyen d'obtenir le tir croisé pour toute distribution cellulaire sans avoir à recalculer systématiquement les dépôts d'énergie. Toutefois, la méthode implémentée avec le code Python et utilisée dans le chapitre 2 nécessite le calcul des distances séparant la cellule cible des autres cellules de la distribution et de répéter l'opération pour toutes les cellules, ce qui apparaît très chronophage dans le cas de grandes distributions cellulaires.

Tout en conservant cette approche générique, nous proposons dans ce chapitre une nouvelle formulation du tir croisé, introduisant la notion de fonction de distribution radiale (rdf), un outil mathématique couramment utilisé dans le domaine des matériaux permettant de décrire la répartition d'entités dans l'espace. L'utilisation de cette fonction s'inscrit dans une visée d'optimisation du temps de calcul, et dans l'intérêt d'évaluer l'impact de la configuration des cellules sur le tir croisé.

Dans un premier temps, le nouveau formalisme adopté pour calculer le tir croisé sera présenté. Pour l'implémentation de celui-ci, un outil de dynamique moléculaire Large-scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator (LAMMPS) a été utilisé.

Pour valider la nouvelle approche, une comparaison a été réalisée avec le logiciel MIRDCell et la méthode décrite dans le chapitre précédent, que l'on nommera méthode de référence. Ensuite, des calculs de tir croisé moyen $\bar{S}^{croisé}$ considérant différentes configurations spatiales de cellules (aléatoire ou réseau) ont été effectués pour évaluer dans quelle mesure ce paramètre peut affecter la fonction rdf et ainsi le tir croisé. Une évaluation systématique a été réalisée, en fonction de la densité cellulaire et du volume d'étude.

Dans un deuxième temps, la méthode a été appliquée à une géométrie plus complexe dans un contexte réaliste de radiomarquage *in vitro*. Le radionucléide ^{18}F a été sélectionné pour réaliser tous ces calculs en prévision du chapitre 4 qui se focalise sur le radiomarquage des cellules avec le ^{18}F -FDG.

2 Méthode RDF : formalisme et applications

2.1 Fonction de distribution radiale : cadre théorique

2.1.1 Définition

La fonction de distributions radiale (*rdf*) est une quantité fondamentale permettant de décrire la manière dont sont distribuées spatialement des entités. De manière générale, elle est utilisée pour décrire quantitativement la structure interne de fluides donnant une information sur les propriétés thermodynamiques (203, 204). Elle est liée à la probabilité de trouver une particule dans une couronne sphérique d'épaisseur dr à une distance r d'une autre particule choisie comme référence (**figure 3.1**). Dans les trois dimensions, elle est conventionnellement reliée au nombre de particules $dN(r)$ comme suit :

$$dN(r) = 4\pi r^2 \rho dr \times g(r) \quad (3.1)$$

où ρ est la densité de particules en cm^{-3} et $4\pi r^2 dr$ est l'élément de volume sphérique. Ce facteur de normalisation entre $dN(r)$ et $g(r)$ représente le nombre de particules se trouvant à distance r dans le cas d'une distribution uniforme de particules sans interaction. Ainsi, concrètement, la fonction $g(r)$ moyenne est obtenue en créant un histogramme des distances pour chaque paire de particules, puis en divisant par le facteur de normalisation et par le nombre total de particules.

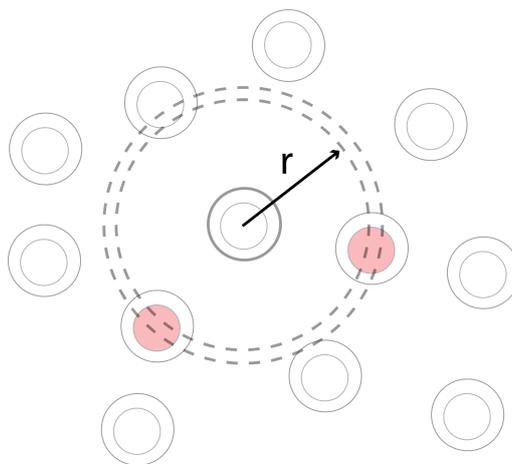


FIGURE 3.1 – Représentation schématique 2D d'une distribution de cellules. Les cellules dont les centres sont compris dans la coquille sphérique d'épaisseur dr à une distance r sont colorées en rouge.

2.1.2 Distribution idéale de particules sans interaction

Comme nous venons de l'évoquer, dans le cas d'une distribution de particules sans interaction réparties uniformément dans un milieu infini, le nombre de particules présentes à une distance r d'une particule dans une coquille sphérique d'épaisseur dr correspond au volume de la coquille multiplié par la densité soit $4\pi\rho r^2 dr$.

Ainsi, par convention, d'après l'équation 3.1, la *rdf* est égale à 1 dans un milieu infini (205). Cette distribution sera désignée dans la suite comme la **distribution idéale uniforme** et la *rdf* associée comme g_{ref} (figure 3.2).

2.1.3 Distribution de cellules avec interaction

Dans le cas d'une distribution de cellules non superposées, la *rdf* varie selon la configuration des cellules. Ici, deux types de configuration ont été considérés : une configuration selon un réseau (113, 112, 206) et une configuration aléatoire uniforme (9, 118).

Elles sont représentées figure 3.2 à gauche, accompagnées des *rdf* correspondantes à droite.

La *rdf* pour la configuration réseau présente un nombre infini de pics dont les positions sont caractéristiques de la structure en réseau.

Dans une configuration aléatoire, la *rdf* varie selon la densité cellulaire. Elle tend vers 1 quelle que soit la distance pour une faible densité cellulaire ($5 \cdot 10^5$ cellules/mL), tandis que pour une grande densité cellulaire ($3 \cdot 10^8$ cellules/mL), on observe un effet de structuration reflété par la fluctuation de la *rdf* aux petites distances.

Enfin, quel que soit le type de configuration, aux grandes distances, la *rdf* tend vers 1 car il n'y a plus de corrélation entre les cellules.

Contrairement à une distribution idéale uniforme où $g_{ref} = 1$, les *rdfs* pour les configurations des cellules en réseau ou aléatoires ne sont pas décrites analytiquement de manière simple. Elles peuvent être en revanche facilement calculées par simulation numérique. Les outils de dynamique moléculaire, comme LAMMPS, disposent de fonctionnalités permettant de calculer rapidement ce type de fonction.

2.2 Calcul du tir croisé : nouveau formalisme en fonction de la *rdf*

Dans cette étude, nous proposons une nouvelle formulation du tir croisé basée sur l'intégration des contributions de dose sur la distance r autour d'une cellule cible t :

$$D_t^{croisé} = \int_r \tilde{a}_r \cdot S(r) \quad (3.2)$$

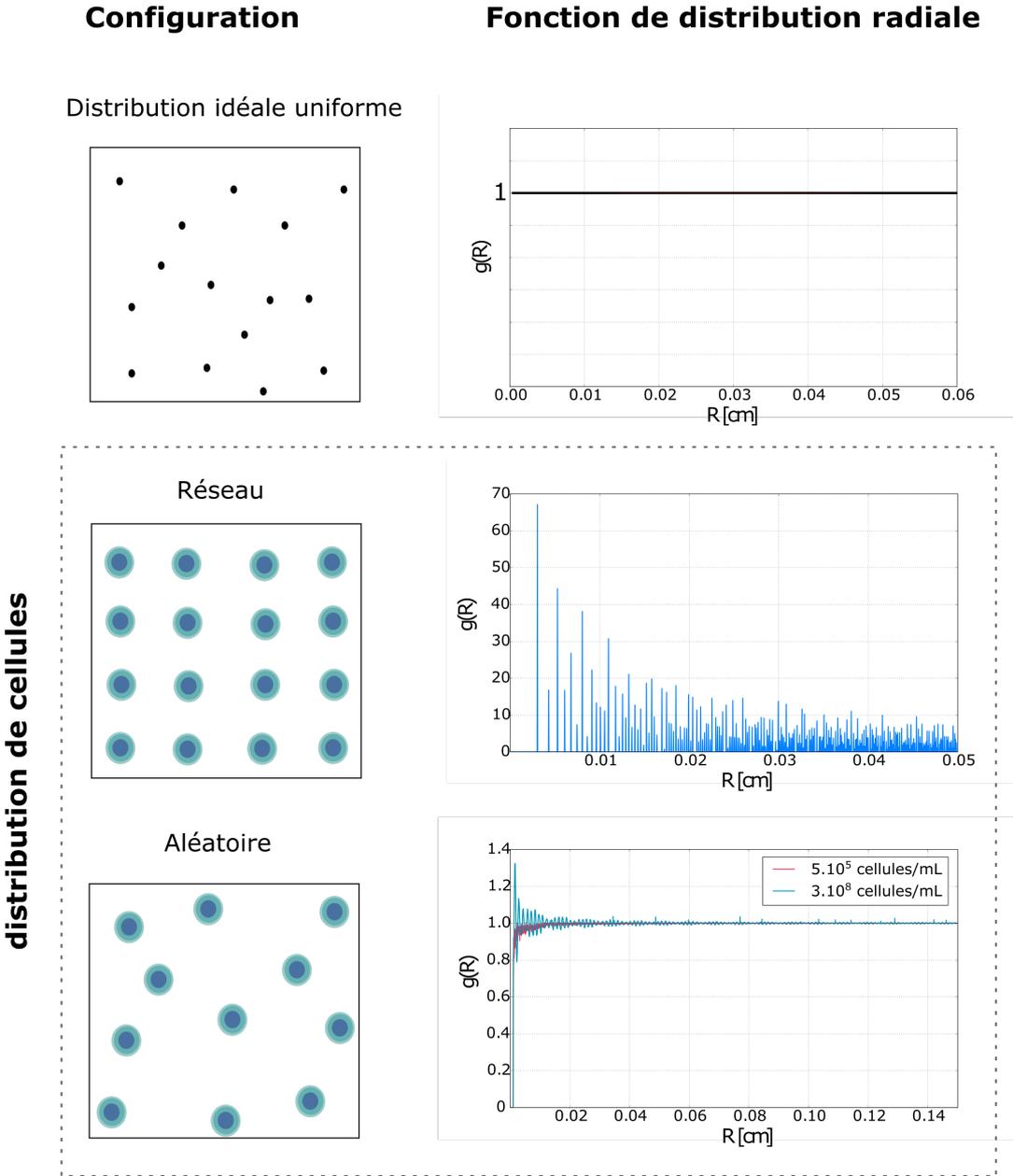


FIGURE 3.2 – Représentation de trois configurations spatiales (gauche) et leur fonction de distribution radiales correspondantes (droite). Une distribution idéale uniforme correspond à une distribution de points aléatoirement répartis dans un milieu infini se caractérisant par une *rdf* $g(R)=1$. La *rdf* pour une distribution de cellules selon un réseau se compose de pics à des positions périodiques. La *rdf* pour une distribution aléatoire de cellules est proche de 1 à faible densité cellulaire et oscille à faibles distances autour de 1 lorsque la densité cellulaire augmente.

où \tilde{a}_r est la somme des activités cumulées dans les cellules contenues entre r et $r+dr$ et $S(r)$ est le facteur S de paires pour une distance r .

Cette formulation générale s’applique à toute forme de distribution spatiale d’activité. Dans le cas spécifique d’une distribution uniforme de l’activité entre les cellules (même hypothèse que celle prise dans le chapitre

2), impliquant que chaque cellule contient la même activité dans son ou ses compartiments sources, l'activité cumulée \tilde{a}_r peut alors s'exprimer comme l'activité cumulée par cellule \tilde{a}_{cel} multipliée par le nombre de cellules $dN(r)$ entre r et $r+dr$.

En remplaçant $dN(r)$ par l'équation 3.1, le tir croisé peut s'écrire :

$$D_t^{croisé} = \tilde{a}_{cel} \cdot 4\pi \cdot \rho \int_r dr \cdot S(r) \cdot r^2 \cdot g(r) = \tilde{a}_{cel} \cdot S^{croisé} \quad (3.3)$$

où ρ représente la densité cellulaire et $g(r)$ la fonction de distribution radiale.

2.3 Implémentation de la méthode basée sur la *rdf*

L'approche générale utilisée pour le calcul du tir croisé avec la méthode basée sur la *rdf*, que l'on désignera **méthode RDF** dans la suite, est résumée sur la **figure 3.3** (207).

Elle est composée de quatre étapes principales :

1. La détermination des facteurs S de paires pour différentes distances cellule-cellule,
2. La génération de la configuration spatiale des cellules,
3. Le calcul de la *rdf*,
4. L'intégration des composantes de dose sur la distance radiale comme décrit dans l'équation 3.3.

Les méthodes pour implémenter ces différentes étapes sont présentées dans les paragraphes suivants.

2.3.1 Calcul des facteurs S de paires $S(r)$ (étape 1)

Les facteurs S de paires dépendent de la distance r séparant les deux cellules et varient selon la taille des cellules, la combinaison région source-région cible et le radionucléide.

Les facteurs S utilisés dans ce travail ont été calculés en utilisant soit le logiciel MIRDCell soit des simulations Monte-Carlo avec le code MCNP6. Les paramètres de simulations choisis seront précisés pour chaque étude dans la partie 2.4.

2.3.2 Modélisation de la distribution cellulaire et calcul de la *rdf* avec LAMMPS (étape 2 et 3)

Comme indiqué précédemment, le code de dynamique moléculaire (DM) LAMMPS a été utilisé pour générer des distributions cellulaires en 3D et pour calculer la *rdf* correspondante. Après une présentation du principe général de la DM et du code LAMMPS, les étapes empreintées pour réaliser ces deux actions dans le cadre de ce travail seront décrites.

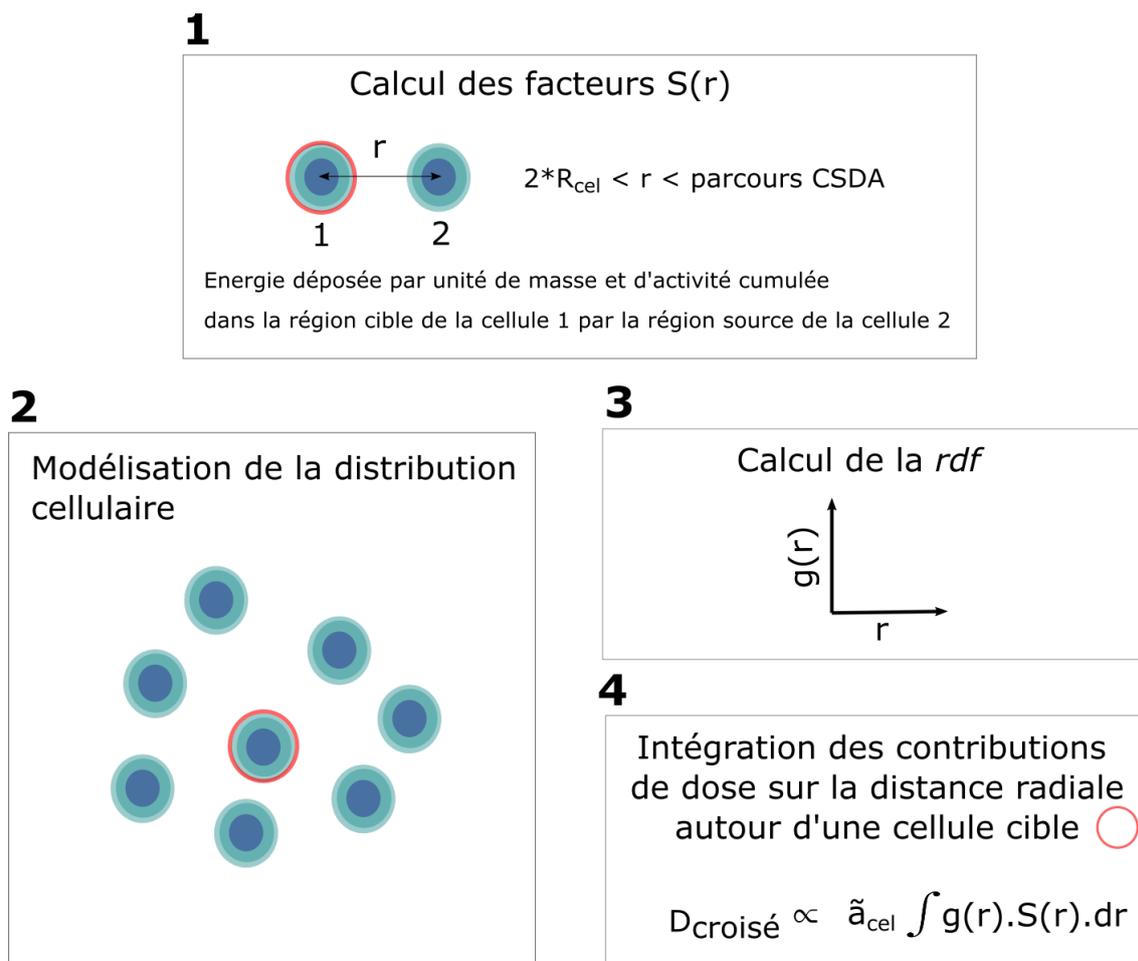


FIGURE 3.3 – Diagramme des étapes à implémenter pour le calcul du tir croisé avec la méthode RDF.

Historiquement, LAMMPS a été créé au milieu des années 1990 dans le cadre d'un accord coopératif de recherche et développement entre deux laboratoires (Sandia et LLNL) et trois entreprises (Cray, Bristol Myers Squibb, et Dupont) dans le but de développer un code source libre de DM classique à large échelle. Le principe est de modéliser l'évolution d'un système de particules au cours du temps, sous l'effet de champ de forces. Un champ de force correspond à un ensemble de potentiels et de paramètres permettant de décrire la structure de l'énergie potentielle d'un système de particules.

LAMMPS présente l'avantage de donner accès à une grande librairie de champs de force, ce qui permet de simuler un très grand nombre de systèmes incluant des molécules (208, 209), des polymères (210, 211), des matériaux (212, 213), etc. Une documentation complète sur l'utilisation du code est disponible en ligne¹.

Comme pour le code MCNP6, les simulations avec LAMMPS s'exécutent à partir d'un ensemble de commandes inscrites dans un fichier d'entrée.

1. <https://lammps.sandia.gov/>

Implémentation d'un fichier d'entrée LAMMPS. La première étape concerne l'initialisation de la simulation. Les principaux paramètres initiaux de la simulation incluent le type d'atome, les unités adoptées et la taille de la boîte de simulation.

Le type d'atome rassemble des propriétés spécifiques adaptées à la modélisation d'une variété de systèmes physico-biologiques : polymères, molécules organiques, métaux, matériaux granuleux, etc. Dans la suite, nous employerons le terme générique "entité".

Les entités sont créées dans la boîte de simulation, à partir d'un fichier externe de coordonnées ou selon un réseau avec l'option *lattice*.

Plusieurs options sont disponibles pour définir les conditions aux limites de la boîte de simulation. Des **conditions aux limites périodiques** peuvent être utilisées afin de simuler un système infini. Comme présenté sur la **figure 3.4**, la boîte de simulation est répliquée dans les trois dimensions de façon à ce que les entités interagissent à travers les bords. Le principe est que la position de la face de la boîte de simulation est fixée dans toutes les directions. Plus le volume de la boîte de simulation sera petit, plus la simulation sera rapide.

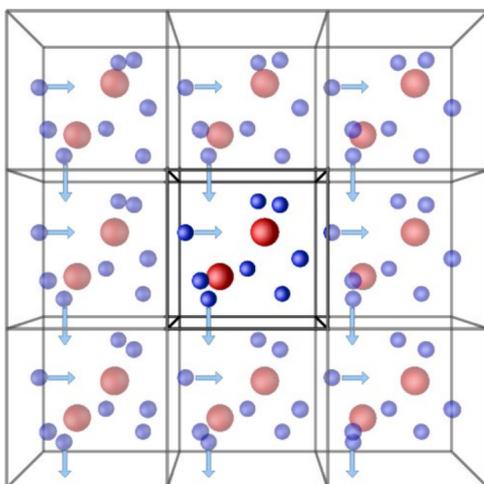


FIGURE 3.4 – Représentation des conditions aux limites périodiques : particules fantômes créées par réplique de la boîte de simulation dans une dimension. *Source : Thèse Stéphane Tesson (214)*

Les potentielles entités situées sur les bords de la boîte de simulation peuvent introduire un artefact dans le calcul de la *rdf* car celles-ci seront comptées de multiples fois par réplique de la boîte. Pour pallier ce problème, une région d'exclusion au niveau des bords peut être définie dans la boîte de simulation avant de créer les cellules.

D'autres modes permettent de fixer les bords de façon à ce que les entités ne puissent pas traverser d'un

côté et de l'autre de la boîte. Lors de son déplacement, si une entité quitte la boîte, elle sera supprimée au prochain pas de temps.

Une fois l'étape d'initialisation réalisée et les entités créées, de nombreuses options existent afin de paramétrer la simulation :

- Le choix des potentiels "inter-atomiques" c'est-à-dire des modèles d'énergie potentielle servant à décrire l'interaction entre atomes. Plus de 221 types d'interaction de paires inter-atomiques sont par exemple disponibles dans LAMMPS.
- La spécification des propriétés physiques à calculer durant la simulation : coordonnées des entités, température, pression, fonction de distribution radiale, etc.

Finalement, l'intervalle de temps choisi est spécifié et la simulation est exécutée.

Les entités sont assignées à une position et une vitesse à un temps t . À chaque pas de temps, une mise à jour des coordonnées et des vitesses est réalisée par intégration des équations du mouvement selon les interactions, potentiels et contraintes définis. LAMMPS permet de calculer à la fois des propriétés à l'équilibre du système (quantités thermodynamiques, corrélations structurales et dynamiques) mais également des processus hors équilibre, comme par exemple l'évolution de microstructures ou des processus de dislocations au sein d'un cristal.

Application. Dans notre étude, des distributions de cellules ont été modélisées afin de calculer les fonctions de distribution radiale rdf associées, suivant deux configurations : une configuration de cellules selon un réseau et une configuration de cellules distribuées de manière aléatoire et uniforme.

Pour cela, les cellules ont été considérées comme des sphères rigides. L'utilisation des conditions aux limites périodiques représente un choix avantageux en termes de gain de temps et de mémoire puisqu'il permet de créer un milieu pseudo-infini impliquant un grand nombre de cellules à partir d'une quantité limitée de cellules définie dans la boîte de simulation primaire.

La fonction de distribution radiale a alors été calculée pour chaque configuration de cellules sous la forme d'un histogramme des distances entre paires de cellules. Comme expliqué précédemment (§ 2.1.1), les valeurs sont ensuite normalisées en les divisant par le nombre de cellules dans le cas d'une distribution idéale uniforme, donc par le volume de coquilles sphériques d'épaisseur dr multiplié par la densité globale du système. Par défaut, les valeurs sont également moyennées sur l'ensemble des cellules.

La commande `compute rdf` est utilisée pour générer l'histogramme en spécifiant la distance maximale (distance de coupure) et le nombre de *bins*.

Les paramètres spécifiques de modélisation pour la génération de chacune des configurations sont main-

tenant présentés.

Distributions de cellules selon un réseau. Pour modéliser une distribution de cellules selon un réseau dans LAMMPS, la commande *lattice* a simplement été utilisée en précisant le type de réseau et le paramètre de réseau a . Le paramètre a est relié à la densité cellulaire ρ par :

$$a_{cfc}(cm) = (4/\rho)^{1/3} \quad (3.4)$$

$$a_{cs}(cm) = (1/\rho)^{1/3}$$

où *cfc* correspond à un réseau cubique face centrée et *cs* correspond à un réseau cubique simple. Ces deux types de réseau sont représentés **figure 3.5**.

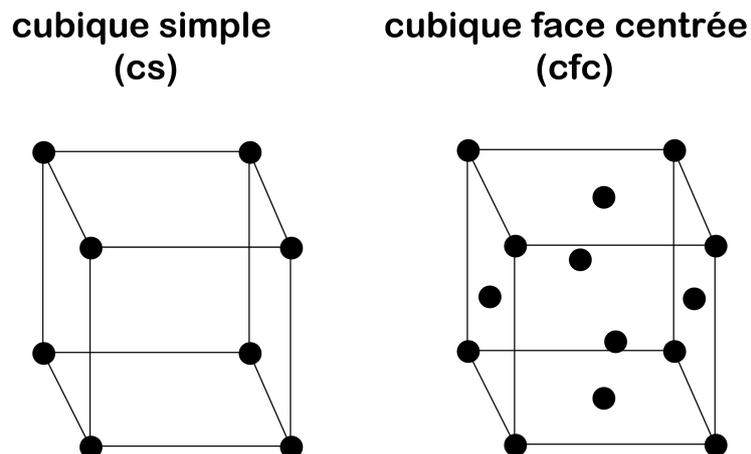


FIGURE 3.5 – Représentation d'une maille de réseau cubique simple et d'une maille de réseau de cubique face centrée.

Seule la partie initialisation de la simulation LAMMPS est utile pour générer ces distributions et l'approche dynamique n'est pas exploitée.

Distribution cellulaire aléatoire. Dans ce travail, pour générer des distributions aléatoires avec LAMMPS, une approche dite «directe» a été utilisée en utilisant la commande *random*.

Un nombre N_{cel} de cellules a été créé dans une boîte de simulation à des positions aléatoires sans imposer de contraintes spécifiques. Puis, les potentielles cellules en superposition, c'est-à-dire à des distances centre-à-centre inférieures au diamètre de cellule considéré, ont été ensuite supprimées avec la commande *delete atoms* en réglant la distance de coupure au diamètre de la cellule.

Un programme a été implémenté en Python pour vérifier que la densité cellulaire n'a pas été modifiée après

cette opération, auquel cas un ensemble de coordonnées est régénéré avec un nombre de cellules ajusté. Pour une densité cellulaire fixe, de multiples configurations aléatoires (N_{config}) ont été générées pour permettre le calcul d'un tir croisé moyen qui ne dépend pas d'une configuration géométrique spécifique. Le nombre de graines a été modifié pour chaque configuration pour s'assurer d'obtenir des coordonnées différentes.

2.3.3 Intégration des composantes de dose sur la distance (étape 4)

Après avoir calculé la fonction de distribution radiale, le tir croisé moyen peut être obtenu en intégrant les contributions de dose sur la distance, en suivant l'équation 3.3. Un programme Python a été implémenté pour réaliser cette opération. Pour chaque distance r , le facteur $S(r)$ correspondant est obtenu par interpolation linéaire des facteurs S de paires pré-déterminés.

2.3.4 Considération des effets de bords

Bien que l'utilisation de conditions limites périodiques soit très utile pour des systèmes à grande échelle, le fait d'ignorer la nature finie du problème peut affecter la *rdf* et ainsi potentiellement la dose absorbée. En effet, dans un volume d'étude contenant des cellules, le nombre de paires de cellules sur les bords sera sur-estimé.

Afin de prendre en compte les dimensions du volume d'étude sans avoir à simuler l'ensemble des cellules dans la boîte de simulation avec des conditions aux limites fixes, qui induiraient des temps de calculs prohibitifs, une fonction de correction analytique de la distance $F(r)$ a été appliquée à la *rdf* obtenue pour un milieu infini prenant en compte les effets de bords, tel que :

$$g = g^\infty \times F \quad (3.5)$$

où g^∞ est la fonction de distribution radiale dans un milieu infini et g la *rdf* corrigée.

Dans le cas d'une distribution idéale uniforme, puisque $g^\infty=1$, la fonction de correction, que nous nommons F_{ref} , correspond alors à la *rdf* pour un volume fini.

Cette fonction F_{ref} se calcule analytiquement en intégrant, pour chaque cellule, la probabilité de trouver deux particules séparées d'une distance r sur la surface d'une sphère de rayon r . Il faut noter que pour les cellules se trouvant sur les bords du volume, cette intégration est seulement réalisée sur la partie de surface se trouvant à l'intersection du volume d'étude sélectionné.

F_{ref} prend alors la forme d'une fonction intégrale qui dépend de la taille et de la forme du volume d'étude considéré.

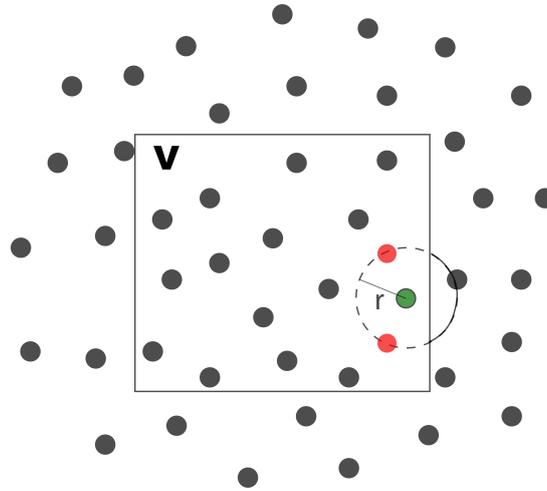


FIGURE 3.6 – Illustration de la prise en compte des effets de bords. Pour calculer le nombre de paires autour d'une particule à une distance r contenues dans un volume V défini, un facteur de correction F_{ref} est appliqué afin de n'intégrer les particules que sur la surface à l'intersection avec le volume d'étude.

Pour notre étude, la fonction de correction a été calculée pour un volume rectangulaire (F_{ref}^{rect}) ou une sphère (F_{ref}^{sphere}) à partir de deux solutions approximatives de l'intégrale tirées de Bell *et al.* (215) :

$$F_{ref}^{sphere} = \frac{4\pi.r^2}{4\pi.r^2(1 - r/2R)^2(1 + r/4R)}, 0 \leq r < 2R \quad (3.6)$$

où R est le rayon du volume d'étude.

$$F_{ref}^{rect} = \int_{-\infty}^{-\infty} dx dy dz . g(x, L) . g(y, W) . g(z, H) \quad (3.7)$$

$$g(x, L) = 1 - \frac{x}{L} \text{ quand } x \leq L$$

$$g(x, L) = 0 \text{ quand } x \geq L$$

où L , W , H sont respectivement la longueur, la largeur et la hauteur du rectangle. Les solutions ont été estimées par intégration numérique avec Python en utilisant la méthode des trapèzes.

Le facteur de correction F_{ref} calculé ici est équivalent au facteur géométrique $\psi_{r_t \leftarrow r_s}$ intervenant dans l'expression de la fraction absorbée ϕ et appliqué pour le calcul analytique du facteur S ou de dose-point kernels (cf. Chapitre 1, § 4.4.2).

Pour vérifier la validité du facteur de correction F_{ref} calculé pour les distributions de cellules selon un réseau

et en mode aléatoire, nous avons comparé, pour quelques volumes, le tir croisé moyen $\bar{S}^{croisé}$ calculé en considérant une *rdf* obtenue pour un milieu infini puis corrigé des effets de bords (g^{p*F}) versus une *rdf* obtenue pour un volume fini (g^f), où *p* et *f* font référence aux conditions limites spatiales utilisées dans LAMMPS.

Pour les deux types de configuration, les différences étaient très faibles, atteignant 2% au maximum pour une densité cellulaire de $5 \cdot 10^5$ cellules/mL dans le cas de la configuration réseau.

2.4 Comparaison de la méthode RDF à la méthode de référence et au MIRDCell

Pour valider la nouvelle approche de calcul et démontrer son utilité, une étude comparative a été réalisée entre les facteurs $\bar{S}^{croisé}$ calculés avec la méthode RDF et deux autres méthodes : la méthode de référence, décrite dans le chapitre 2, et le MIRDCell.

Le **tableau 3.1** présente les paramètres sélectionnés pour les calculs.

Tableau 3.1 – Paramètres de modèles pour le calcul du $\bar{S}^{croisé}$. *sc* = cubique simple.

Méthode	Géométrie	Configuration	Densité cellulaire (cellules/mL)	Gamme de volume (μm)
Méthode de référence	Sphère	Aléatoire / Réseau (sc)	$1 \cdot 10^8$	150 - 1300
MIRDCell	Sphère	Réseau (sc)	$1 \cdot 10^8$ (distance entre les cellules = $20 \mu\text{m}$)	50 - 1000

2.4.1 Méthode de référence

Selon la méthode de référence, les contributions de chaque cellule source au tir croisé sont sommées de manière explicite, *via* un programme Python dans notre cas.

Pour le calcul du tir croisé dans une distribution aléatoire de cellules, le programme prend comme paramètre d'entrée la densité cellulaire et la taille du volume et génère les coordonnées 3D des centres de cellules avec cette contrainte : si la nouvelle cellule générée ne se superpose pas avec celle précédemment créée alors les coordonnées sont sauvegardées. Dans le cas contraire, de nouvelles coordonnées sont générées jusqu'à ce que la condition soit satisfaite.

Les facteurs *S* de paires pour une taille fixe de cellules ($R_N = 4 \mu\text{m}$, $R_C = 5 \mu\text{m}$) ont été simulés avec le code MCNP6, en utilisant les mêmes paramètres de simulation que ceux définis dans le chapitre précédent (§ 2.3.3). Le spectre du ^{18}F provenant de la CIPR 38 a été implémenté (194). Un total de 10^8 particules a

été lancé pour chaque simulation afin d'obtenir une incertitude inférieure à 1%.

2.4.2 MIRDCell

Les onglets principaux du MIRDCell et les paramètres sélectionnés pour les calculs sont illustrés **figure 3.7**.

Dans l'onglet source, le spectre complet du ¹⁸F a été sélectionné pour nos calculs.

Concernant le modèle géométrique multi-cellulaire, le réseau cubique simple est la seule configuration disponible dans le logiciel. Toutes les cellules ont été considérées comme radiomarquées (100%) et la distribution de l'activité a été définie comme uniforme. En sortie, les facteurs S de paires sont générés et affichés pour des distances jusqu'au rayon du cluster, ainsi que la dose absorbée moyenne.

À noter que les contributions des rayons γ et rayons X ne sont pas incluses dans le calcul des facteurs S par le logiciel MIRDCell. La dose absorbée moyenne par activité cumulée a donc été obtenue en divisant la dose absorbée par 0,001 Bq (valeur de l'activité moyenne par cellule prise par défaut) et par 100h*3600 s/h (valeur du coefficient d'activité intégrée dans le temps prise par défaut). Enfin le facteur $\bar{S}^{croisé}$ a été déduit après soustraction du facteur S d'auto-absorption S^{auto} .

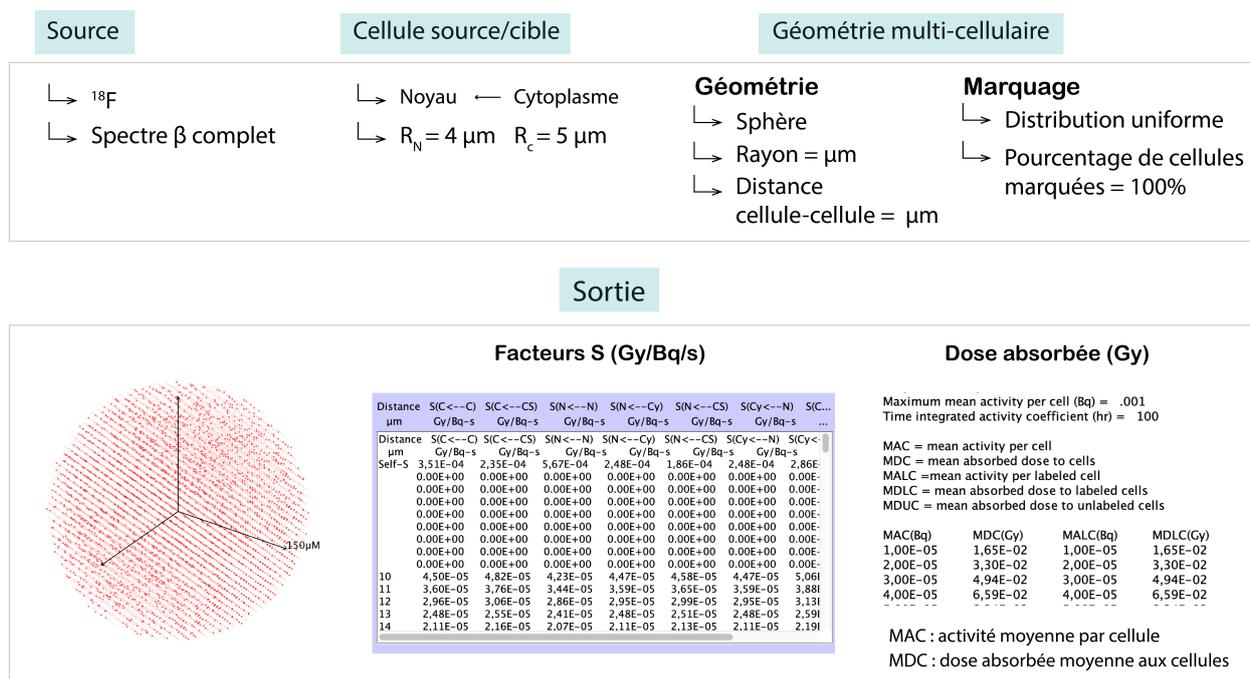


FIGURE 3.7 – Paramètres de simulation du MIRDCell. Les encadrés représentent les onglets du logiciel. Capture d'écran de la sortie du logiciel : Facteurs S pour différentes distances cellule-cellule et dose absorbée moyenne.

2.4.3 Méthode RDF

Des calculs du facteur $\bar{S}^{croisé}$ ont été effectués avec la méthode RDF à partir des mêmes paramètres (géométrie, taille des cellules, densité cellulaire, volumes) que ceux utilisés avec le MIRDCell et la méthode

de référence pour comparaison.

Pour cette étude comparative, la *rdf* périodique a été générée avec une distance de coupure de 0,25 cm et 10 000 bins. La fonction de correction a été calculée pour chaque volume considéré et appliquée à la *rdf*. L'ordinateur utilisé pour réaliser les calculs Python et LAMMPS est le même que celui utilisé pour les calculs dans le chapitre 2 (cf. chapitre 2, §2.7.1 pour les caractéristiques).

2.5 Etude de l'influence de la configuration géométrique sur le tir croisé moyen en fonction de la densité cellulaire et du volume d'étude

La méthode RDF a été appliquée à l'étude de l'influence de la configuration géométrique sur le tir croisé, en faisant varier la densité cellulaire ($5 \cdot 10^5$ cellules/mL à $5 \cdot 10^8$ cellules/mL) et les dimensions du volume d'étude.

Les calculs de $\bar{S}^{croisé}$ ont été effectués en considérant une distribution de cellules distribuées de manière aléatoire ou selon un réseau (*cfc* et *cs*) dans un volume cubique, en suivant les étapes décrites dans le paragraphe 2.3.2.

Des conditions aux limites périodiques ont été fixées et l'histogramme de la *rdf* a été calculée avec 10 000 bins en fixant la distance de coupure à 0,4 cm. La fonction de correction a été calculée pour chaque taille de volume considéré selon l'équation 3.7.

Dans le cas d'une distribution aléatoire de cellules, la *rdf* a été calculée et moyennée sur N configurations. Ce nombre N a été choisi de telle façon à obtenir une convergence du facteur $\bar{S}^{croisé}$.

Pour évaluer l'impact de la variation de la configuration sur le tir croisé, nous avons calculé les différences relatives entre les facteurs $\bar{S}^{croisé}$ obtenus pour une distribution aléatoire et une distribution en réseau et ceux obtenus pour une distribution idéale uniforme ($g_{ref}=1$).

Pour cette étude comparative, dans le cas d'une distribution idéale uniforme, les composantes de dose autour d'une cellule cible ont été intégrées à partir de la distance égale au diamètre de la cellule puisqu'en dessous de cette valeur la présence d'autres cellules est interdite.

2.6 Application de la méthode RDF à un modèle de culture cellulaire *in vitro*

Afin d'évaluer l'applicabilité de la méthode RDF et de l'outil LAMMPS dans le cas de géométries plus complexes, des calculs de dose pour une configuration géométrique présentant des hétérogénéités spatiales ont été réalisés.

Pour refléter le cas d'une incubation *in vitro* de cellules en suspension dans du ^{18}F -FDG, le modèle géométrique, illustré **figure 3.8**, a été réalisé contenant des cellules isolées et de petits clusters de cellules

créées par un phénomène d'agglomération naturelle de cellules qui peut être observé en culture (118). La géométrie peut être décomposée en trois distributions cellulaires de densités différentes :

- la distribution des clusters dans le volume d'étude de densité $\rho_{cluster} = 1.10^4$ (clusters/mL) ;
- la distribution des cellules isolées dans le volume d'étude de densité $\rho_{isolé} = 1.10^5$ (cellules/mL) ;
- la distribution des cellules au sein d'un cluster de densité $\rho_{in.cluster} = 1.10^8$ (cellules/mL).

Deux types de cellules cibles ont été considérées : les cellules appartenant aux clusters (type 1) et les cellules isolées (type 2), conduisant à la distinctions de cinq contributions de dose différentes, comme représentée sur la figure **figure 3.9**, telles que :

$$D_{tot}^{croisé} = D_{1\leftarrow 1}(TC) + D_{1\leftarrow 1}(SC) + D_{1\leftarrow 2} + D_{2\leftarrow 2} + D_{2\leftarrow 1} \quad (3.8)$$

où $D_{i\leftarrow j}$ correspond au tir croisé de la cellule de type i vers la cellule de type j , TC et SC indiquent l'appartenance de la cellule respectivement au cluster cible ou à un cluster voisin.

Les composantes $D_{1\leftarrow 2}$ et $D_{2\leftarrow 1}$ sont égales, considérant que la distance relative et l'activité par cellule sont les mêmes.

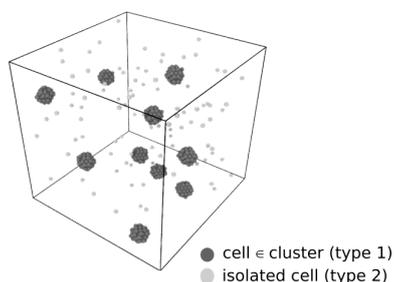


FIGURE 3.8 – Représentation 3D du système cellulaire composé de clusters (type 1) et cellules isolées (type 2) réparties de manière aléatoire dans un volume d'étude.

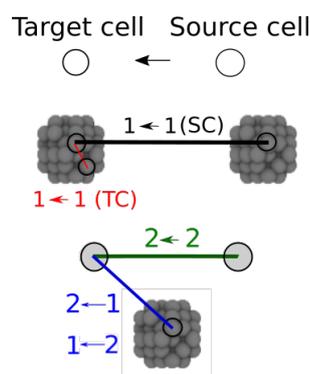


FIGURE 3.9 – Représentation schématique des cinq combinaisons cible←source possibles selon le type attribué à chaque cellule. SC se réfère aux clusters voisins, TC se réfère au cluster cible.

La dimension des cellules a été la même que celle considérée pour les calculs précédents soit respectivement 4 et 5 μm pour le rayon du noyau et de la cellule.

Dans cet exemple, nous avons considéré une activité volumique de 1 MBq/mL et une efficacité de marquage de 30%, dans la gamme de ce qui peut être mesuré pour le marquage au ^{18}F -FDG *in vitro*. Le temps d'incubation a été fixé à 1 heure et nous avons supposé une incorporation du radionucléide dans les cellules linéaire avec le temps.

La valeur du facteur S_{milieu} a été calculée avec MCNP6 en modélisant un volume rectangulaire composé d'eau et rempli uniformément de ^{18}F . Le facteur S d'auto-absorption pour la combinaison noyau←cytoplasme

a également été calculé avec MCNP6.

Pour le calcul du tir croisé, deux approches, présentées dans les paragraphes suivants, ont été utilisées.

2.6.1 Simulation directe avec LAMMPS

Dans cette approche dite directe, LAMMPS a été utilisé pour générer le modèle cellulaire *in silico*, et calculer les *rdfs*.

Brièvement, des structures aléatoires ont été considérées pour décrire les cellules isolées tandis qu'un arrangement en réseau (mode *cfv*) a été choisi pour modéliser les clusters de cellules. Les différents paramètres utilisés pour les calculs sont résumés dans le **tableau 3.2**. Les étapes détaillées de la modélisation et du calcul du *rdf* se trouvent dans l'annexe 2, §1.

Tableau 3.2 – Paramètres utilisés pour la simulation LAMMPS d'un modèle multi-cellulaire composé de clusters de cellules compacts et de cellules isolées.

Nom	Description	Valeur
V (cm ³)	Volume	1
R_{cell} (μm)	Rayon cellulaire	5
$R_{cluster}$ (cm)	Rayon d'un cluster	$3 \cdot 10^{-3}$
$\rho_{cluster}$ (/cm ³)	Densité des clusters	$1 \cdot 10^4$
$\rho_{cluster}^{in}$ (/cm ³)	Densité des cellules au sein d'un cluster	$1 \cdot 10^8$
N_{cells}^{in}	Nombre de cellules dans un cluster	12
$\rho_{isolé}$ (/cm ³)	Densité des cellules isolées	$1 \cdot 10^5$
N_{config}	Nombre de configurations	20
N_{bins}	Nombre de bins	5000
R_{max} (cm)	Distance de coupure	0,4

2.6.2 Approche idéale uniforme

Dans cette deuxième approche, chaque distribution de cellules (cellules isolées, clusters, cellules au sein d'un cluster) associée à une densité spécifique a été approximée par une distribution idéale uniforme ($g_{ref} = 1$). L'intérêt ici était de s'affranchir de l'étape de modélisation et de l'utilisation de LAMMPS et de quantifier l'impact de cette approximation sur la dose absorbée.

Sachant que dans notre exemple le rayon d'un cluster est très faible par rapport à la distance moyenne entre deux clusters, nous avons considéré que la dose délivrée par les cellules au sein d'un cluster à une cellule isolée ou une cellule appartenant à autre cluster ne dépendait que de la distance entre le centre du cluster et la cellule cible. Le facteur $S_{t \leftarrow cluster}^{croisé}$ peut alors s'écrire :

$$S_{t \leftarrow cluster}^{croisé} = N_{cluster}^{in} S(r = d_{cluster}) \quad (3.9)$$

où $N_{cluster}^{in}$ est le nombre de cellules dans un cluster et $d_{cluster}$ la distance entre la cellule cible t et le centre du cluster considéré.

Les composantes du tir croisé peuvent s'écrire ainsi :

$$\overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé}(SC) = 4\pi\rho_{cluster}N_{cluster}^{in}\tilde{a}_{cell} \int_{r>2*R_{cluster}} dr.r^2S(r) \quad (3.10)$$

$$\overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé}(TC) = 4\pi\rho_{cluster}^{in}\tilde{a}_{cell} \int_{r>2*R_{cell}} dr.r^2S(r)F_{ref}(r) \quad (3.11)$$

où $D_{1\leftarrow 1}^{croisé}$ est le tir croisé moyen aux cellules de cluster provenant de l'activité dans les cellules au sein du même cluster (contribution TC) et les cellules appartenant aux autres clusters (contribution SC); F_{ref} correspond au facteur de correction pour une géométrie sphérique (cf. **équation 3.6**).

$$\overline{D}_{2\leftarrow 2}^{croisé} = 4\pi\rho_{isolé}\tilde{a}_{cell} \int_{r>2\times R_{cluster}} dr.r^2S(r) \quad (3.12)$$

où $D_{2\leftarrow 2}^{croisé}$ est la dose absorbée moyenne aux cellules isolées provenant de l'activité dans les cellules isolées.

Par ailleurs, nous avons considéré que la contribution du tir croisé par un des deux types de cellules était en moyenne la même quelle que soit la position de la cellule cible dans le volume d'étude, conduisant à :

$$\overline{D}_{1\leftarrow 2}^{croisé} = \overline{D}_{2\leftarrow 2}^{croisé} \quad (3.13)$$

$$\overline{D}_{2\leftarrow 1}^{croisé} = \overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé}(SC) \quad (3.14)$$

où $D_{1\leftarrow 2}^{croisé}$ et $D_{2\leftarrow 1}^{croisé}$ sont le tir croisé moyen aux cellules de clusters provenant de l'activité dans les cellules isolées et le tir croisé moyen aux cellules isolées provenant de l'activité dans les cellules de clusters.

Une étude comparative des valeurs de doses obtenues a été réalisée afin d'évaluer l'impact des approximations de distributions dans la deuxième approche. Les temps de calcul ont également été relevés.

3 Résultats

3.1 Comparaison de la méthode RDF à la méthode de référence et au MIRDCell

3.1.1 Méthode RDF *versus* méthode de référence

Le **tableau 3.3** présente les valeurs de différences relatives entre les valeurs $\bar{S}^{croisé}$ obtenues avec la méthode de référence et la méthode RDF, pour différentes tailles de volume d'étude et des distributions de cellules distribuées aléatoirement ou arrangées selon un réseau cubique simple.

Les facteurs S obtenus avec les deux méthodes sont en excellent accord, les différences relatives étant inférieures à 1%. Concernant la méthode de référence, le temps de calcul lié à la génération des coordonnées des cellules (*Partie 1* dans le **tableau 3.3**) varie selon le nombre de cellules à générer et le type de configuration.

Pour la configuration réseau, le processus est très rapide. On observe que le temps de calcul est autour de 1 seconde pour des distributions jusqu'à $5 \cdot 10^5$ cellules et 6 secondes pour des distributions contenant $1 \cdot 10^6$ cellules.

Pour la configuration aléatoire, le temps de calcul augmente avec le nombre total de cellules impliquées, ainsi qu'avec la densité cellulaire. Ici, une densité cellulaire élevée de $100 \cdot 10^6$ cellules/mL a été considérée. De $1 \cdot 10^3$ à $5 \cdot 10^4$ cellules, les résultats montrent que le temps de calcul est relativement court entre 0,2 et 25,8 secondes. Ensuite, celui-ci augmente significativement, de 8201 secondes pour $5 \cdot 10^5$ cellules à plus de $38 \cdot 10^3$ secondes pour $1 \cdot 10^6$ cellules/mL.

En revanche, le temps de calcul lié au calcul des distances relatives et de la somme des facteurs S (*Partie 2* dans le **tableau 3.3**) augmente rapidement avec le nombre de cellules, atteignant presque 2,8 heures pour $1 \cdot 10^6$ cellules, indépendamment de la densité cellulaire et du type de configuration.

En contraste, la méthode RDF a permis d'obtenir des résultats avec des temps de calcul beaucoup plus courts. La *rdf* dans un milieu infini (conditions aux limites périodiques) a été pré-déterminée avec LAMMPS en considérant une distance de coupure de $250 \mu\text{m}$ et 10 000 bins en 620 secondes, tandis que le calcul de la fonction de correction et d'intégration des contributions n'a pas mis plus de 0,1 secondes quel que soit le nombre de cellules considérées.

Tableau 3.3 – Comparaison des temps de calcul et les différences relatives entre valeurs de tir croisé $\bar{S}^{croisé}$ calculées avec la méthode RDF et la méthode de référence pour différents rayons de volume d'étude. (*) : La *rdf* à partir de laquelle les calculs ont été effectués a été obtenue en 620 s, en considérant une distance de coupure de 0,25 cm et 10 000 bins. **P1** fait référence à l'étape de modélisation (création des coordonnées). La **P2** correspond au processus de cumulation des contributions de dose impliquant, dans le cas de la méthode de référence, le calcul des distances entre chaque cellule au préalable.

Paramètres			%Diff. rel. $\bar{S}^{croisé}$	Temps de calcul (s)			
Rayon (μm)	Nombre de cellules	Config.		Méthode de référence		méthode RDF(*)	
				P1	P2	P1	P2
150	10^3	réseau (cs)	$4,3 \cdot 10^{-1}$	0	0,3	<0,1	<0,1
		aléatoire		0,2	0,3	<0,1	<0,1
250	$6,5 \cdot 10^3$	réseau (cs)	$2,7 \cdot 10^{-1}$	0	2,8	<0,1	<0,1
		aléatoire		0,8	2,8	<0,1	<0,1
350	$1,8 \cdot 10^4$	réseau (cs)	$2,4 \cdot 10^{-1}$	0,03	33,6	<0,1	<0,1
		aléatoire		3,2	33,6	<0,1	<0,1
430	$3,3 \cdot 10^4$	réseau (cs)	$1,1 \cdot 10^{-1}$	0,1	100,1	<0,1	<0,1
		aléatoire		9,2	100,1	<0,1	<0,1
500	$5,2 \cdot 10^4$	réseau (cs)	$1,4 \cdot 10^{-1}$	0,1	339,2	<0,1	<0,1
		aléatoire		25,8	339,2	<0,1	<0,1
1000	$4,2 \cdot 10^5$	réseau (cs)	$8,0 \cdot 10^{-2}$	1,5	33 791	<0,1	<0,1
		aléatoire		8201	33 791	<0,1	<0,1
1300	$9,2 \cdot 10^5$	réseau (cs)	$8,2 \cdot 10^{-2}$	5,8	99 899	<0,1	<0,1
		aléatoire		38 708	99 899	<0,1	<0,1

3.1.2 Méthode RDF versus MIRDCell

Le **tableau 3.4** présente les résultats de la comparaison entre le calcul du tir croisé moyen en utilisant la méthode RDF et le logiciel MIRDCell.

Les valeurs de $\bar{S}^{croisé}$ obtenues avec la méthode RDF ont été d'abord calculées en se basant sur les facteurs $S(r)$ de paires obtenus par simulation Monte-Carlo avec MCNP6. Les différences relatives par rapport aux valeurs du MIRDCell (*1 versus 2*) sont autour de 30% en moyenne.

Sur la **figure 3.10**, les facteurs $S(r)$ calculés avec MCNP6 et extraits du MIRDCell ont été représentés en fonction de la distance cellule-cellule, ainsi que leur différences relatives. Ces différences oscillent entre -10% et 30% avec une périodicité artificielle observée dans la courbe du MIRDCell, augmentant avec la distance.

La méthode RDF a également été appliquée en utilisant les facteurs $S(r)$ de paires du MIRDCell. En éliminant les écarts induits par les différences entre les facteurs S , cela permet d'estimer ceux liés à la manière d'intégrer les contributions selon la distribution spatiale des cellules (*1 versus 3*).

On observe que les écarts *1 versus 3* sont responsables de la majorité des différences dans le cas du plus petit volume de cluster (de rayon 50 μm), atteignant 26%, et que leur contribution diminue lorsque le volume d'étude augmente.

Tableau 3.4 – Tir croisé moyen au noyau $\bar{S}^{croisé}$ ($Gy/(Bq.s)^{-1}$) dans un cluster sphérique de cellules de rayon variable calculé avec le MIRDCell (1) et la méthode RDF en utilisant les facteurs S de paires obtenus par simulation Monte-Carlo (code MCNP6) (2) ou par le MIRDCell (3). N_{cel} = nombre de cellules.

Paramètres		$\bar{S}^{croisé}$			%Différence relative	
rayon (μm)	N_{cel}	MIRDCell (1)	Méthode RDF (2)	Méthode RDF (3)	1 vs 2	1 vs 3
			S(r) (MCNP6)	S(r) (MIRDCell)		
50	57	$9,64.10^{-5}$	$1,49.10^{-4}$	$1,30.10^{-4}$	35,1	25,7
100	461	$2,69.10^{-4}$	$3,77.10^{-4}$	$3,12.10^{-4}$	28,7	14,0
150	1551	$4,24.10^{-4}$	$6,06.10^{-4}$	$4,91.10^{-4}$	30,0	13,6
200	3695	$5,80.10^{-4}$	$8,27.10^{-4}$	$6,62.10^{-4}$	29,9	12,4
250	7075	$7,24.10^{-4}$	$1,04.10^{-4}$	$8,25.10^{-4}$	30,1	12,3
500	56 619	$1,39.10^{-3}$	$1,91.10^{-4}$	$1,53.10^{-3}$	27,3	10,1
1000	452 719	$2,37.10^{-3}$	$2,91.10^{-3}$	$2,52.10^{-3}$	18,4	5,6

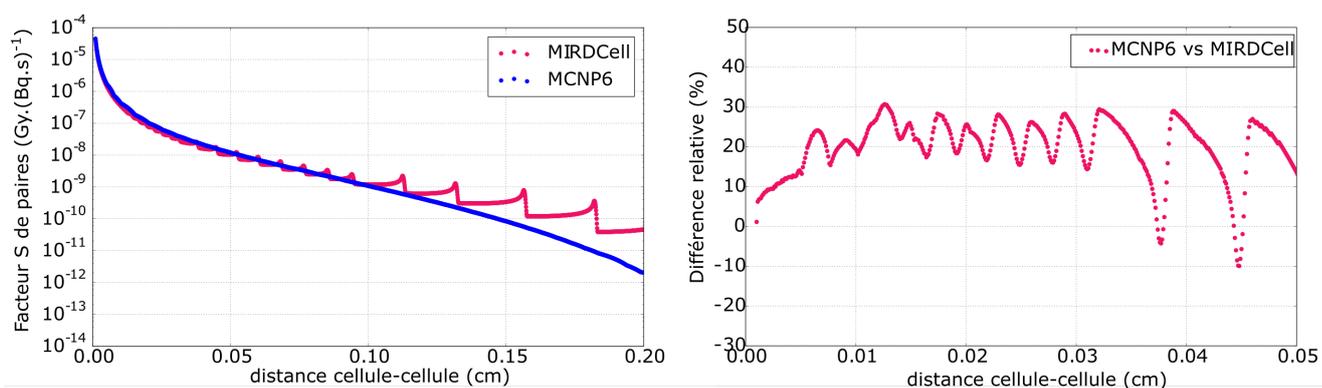


FIGURE 3.10 – Courbes des facteurs S de paires en fonction de la distance cellule-cellule calculés avec le code Monte-Carlo MCNP6 et le MIRDCell (gauche). Pourcentage de différence relative entre les facteurs S (droite).

3.2 Impact de la configuration géométrique sur le tir croisé

Pour étudier l'influence des configurations cellulaires sur le tir croisé, nous avons calculé à l'aide de LAMMPS les *rdfs* pour une configuration en réseau et une distribution aléatoire puis calculé les valeurs de $\bar{S}^{croisé}$ pour différentes densités cellulaires et volumes d'étude. Ensuite, les valeurs obtenues ont été comparées à celles obtenues pour une distribution idéale uniforme ($g_{ref}=1$).

3.2.1 Configuration réseau

La **figure 3.11** montre les différences relatives des facteurs $\bar{S}^{croisé}$ calculées dans le cas d'une distribution de cellules selon un réseau avec celles calculées pour une distribution idéale uniforme (référence).

Sur la **figure 3.11** en haut, les résultats sont présentés en fonction de la longueur du volume d'étude cubique considéré. Les calculs ont été effectués pour quatre valeurs de paramètre de réseau : 0,002 cm, 0,005 cm, 0,010 cm et 0,020 cm, ce qui correspond respectivement à des densités cellulaires de $1,25 \cdot 10^8$, $8 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ et $1,25 \cdot 10^5$ cellules/mL, dans le cas d'un réseau *sc* et $5 \cdot 10^8$, $3,2 \cdot 10^7$, $4 \cdot 10^6$ et $5 \cdot 10^5$ cellules/mL dans le cas d'un réseau *fcc*. Les calculs ont été effectués pour des longueurs de volume d'étude proportionnels au paramètre de réseau.

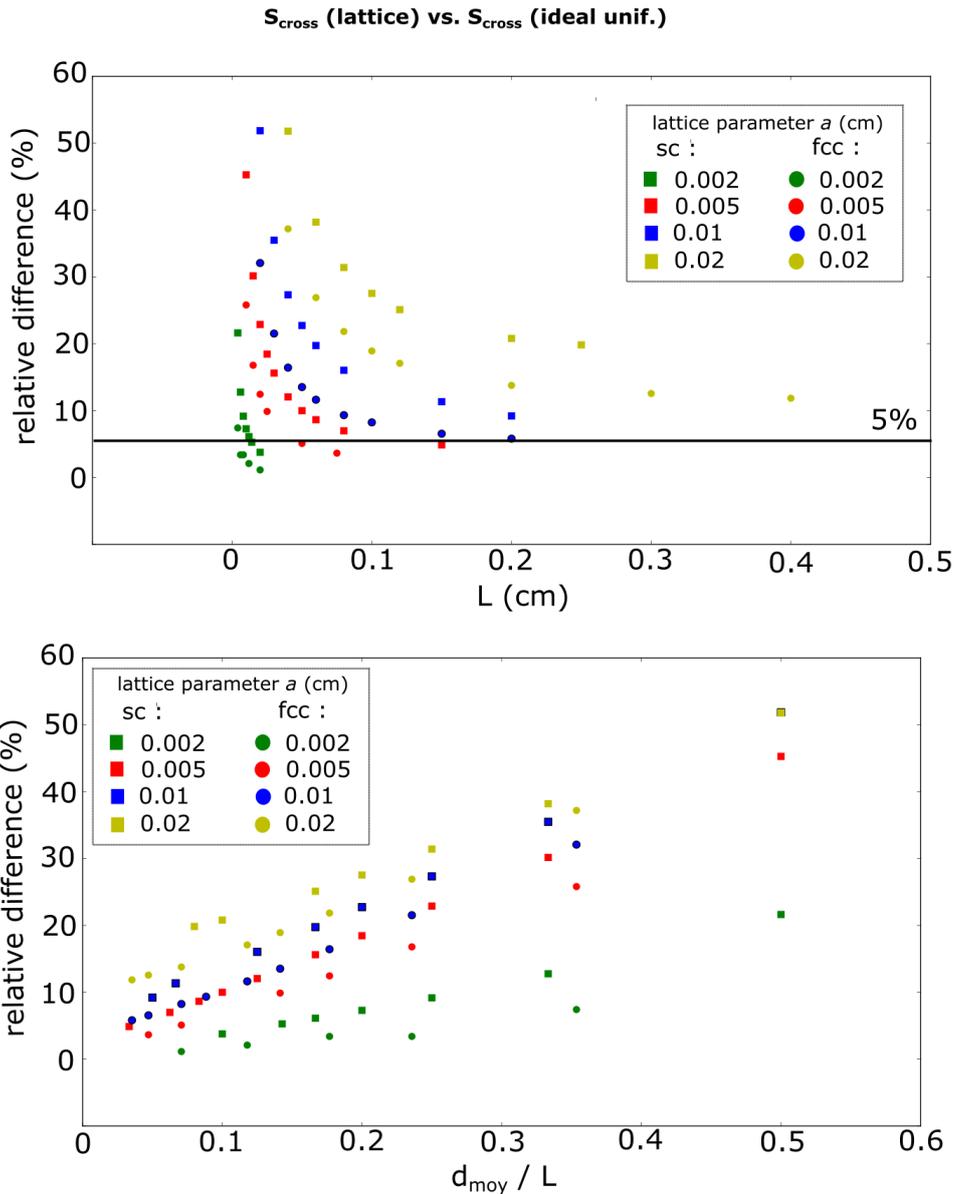


FIGURE 3.11 – Différence relative en % entre le facteur $\bar{S}^{croisé}$ pour une configuration de cellules en réseau *fcc* ou *sc* versus une distribution idéale uniforme (référence) en fonction de la longueur *L* (haut) et en fonction du rapport d_{moy}/L (bas); *L* étant la longueur du volume d'étude cubique; d_{moy} étant la distance moyenne inter-cellulaire égale au paramètre *a* dans le cas d'un réseau *sc* et égale à $a \cdot \sqrt{2}/2$ dans le cas d'un réseau *fcc*.

Pour les deux types de réseau, on observe des écarts de valeurs de $\bar{S}^{croisé}$ qui augmentent lorsque la densité cellulaire et la taille de volume d'étude diminuent. De plus, les pourcentages de différences varient selon le type de réseau considéré. Dans le cas d'un réseau *cfc*, les pourcentages de différences sont globalement plus faibles que ceux obtenus dans le cas d'un réseau cubique simple d'un facteur variant entre 3 et 3,3 pour $a=0,002$ cm ; entre 1,8 et 2 pour $a=0,005$ cm ; entre 1,4 et 1,5 pour $a=0,02$.

Pour la densité cellulaire la plus faible ($a=0,002$ cm), l'écart varie entre 52% et 20% dans le cas du réseau *cs*, et entre 37% et 12% dans le cas du réseau *cfc* pour un volume d'étude de longueur variant entre 0,04 cm et 0,25 cm.

Pour les densités plus élevées, à 1.10^6 cellules/mL et 4.10^6 cellules/mL respectivement pour les réseaux *cs* et *cfc*, les écarts deviennent inférieurs à 5% à partir de volumes d'étude de petite longueur entre 0,012 cm et 0,006 cm.

Ainsi, dans le cas de clusters de cellules compacts, les différences entre les facteurs $\bar{S}^{croisé}$ obtenues avec la configuration réseau et la distribution aléatoire uniforme sont négligeables.

Sur la **figure 3.11** en bas, les données ont été représentées en fonction du rapport entre la distance moyenne entre cellules d_{moy} et la longueur du volume d'étude cubique L . Pour le réseau *cs*, la distance d_{moy} correspond au paramètre de réseau a , tandis que pour le réseau *cfc*, d_{moy} correspond à $a\sqrt{2}/2$. Avec cette représentation, on observe que les écarts augmentent linéairement lorsque le rapport d_{moy}/L augmente, c'est-à-dire lorsque la longueur du volume d'étude diminue et/ou le paramètre de réseau augmente. Pour un même rapport d_{moy}/L , on observe que les différences relatives varient selon le paramètre de réseau ; celles-ci sont d'autant plus importantes quand le paramètre de réseau est grand.

3.2.2 Distribution aléatoire uniforme

Pour une distribution aléatoire de cellules, le facteur $\bar{S}^{croisé}$ a, dans un premier temps, été évalué en faisant varier le nombre de configurations aléatoires pour différentes densités cellulaires afin de sélectionner le nombre de configurations nécessaires à l'obtention d'un tir croisé moyen stable. Comme présenté sur la **figure 3.12**, le facteur $\bar{S}^{croisé}$ converge rapidement en augmentant le nombre de configurations et d'autant plus lorsque la densité cellulaire augmente. En considérant que la convergence est atteinte quand les variations deviennent inférieures à 1%, le nombre de configurations retenu pour des densités de 5.10^5 , 1.10^6 , 5.10^6 et 1.10^7 cellules/mL est respectivement de 50, 30, 10 et 6.

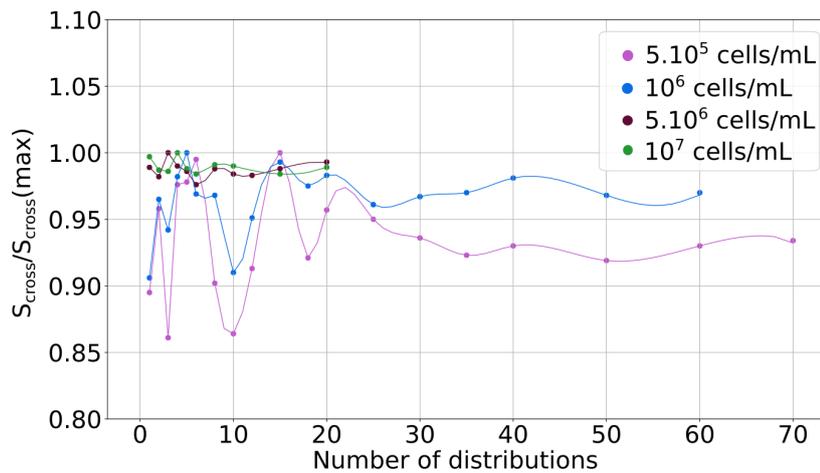


FIGURE 3.12 – $\bar{S}^{croisé}$ en fonction du nombre de configurations de distribution aléatoire uniforme pour quatre valeurs de densité cellulaire. Les valeurs de $\bar{S}^{croisé}$ ont été normalisées par la valeur maximale, pour chaque densité cellulaire.

La **figure 3.13** présente la différence relative entre le tir croisé pour une distribution aléatoire de cellules et la distribution idéale uniforme de référence, en fonction du rapport de la distance moyenne entre les cellules et la longueur du volume d'étude.

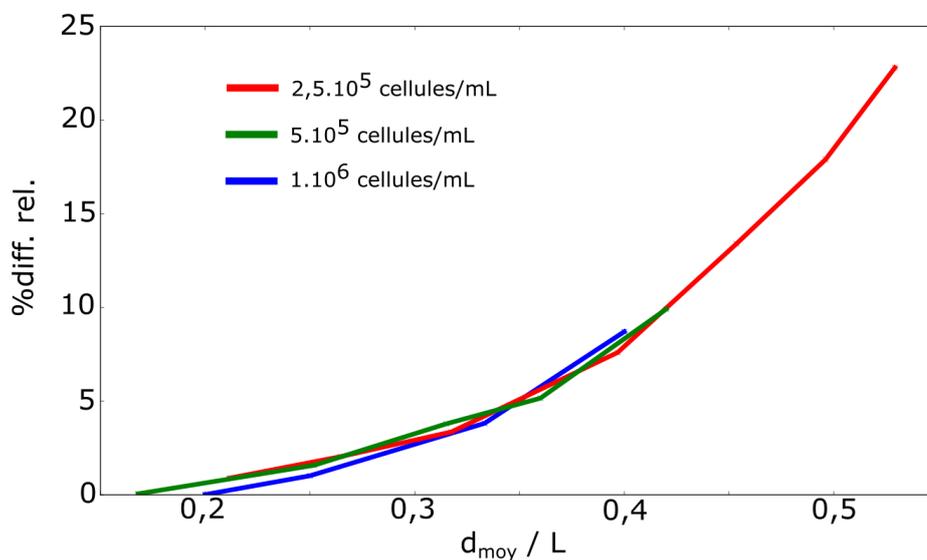


FIGURE 3.13 – Différence relative en % entre le facteur $\bar{S}^{croisé}$ pour une configuration de cellules aléatoire uniforme *versus* une distribution idéale uniforme (référence) en fonction du rapport d_{moy}/L ; L étant la longueur du volume d'étude cubique; d_{moy} étant la distance moyenne inter-cellulaire et égal à $1/d^{1/3}$ avec d la densité cellulaire.

Les calculs ont été effectués pour trois valeurs de densités cellulaires : $2,5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^5$ et $1 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les résultats ont été représentés de couleur différente pour chaque densité.

L'alignement de toutes les valeurs sur une même courbe témoigne d'une dépendance stricte entre le pourcentage de différence des facteurs $\bar{S}^{croisé}$ pour une distribution aléatoire de cellules *versus* idéale uniforme et le rapport entre la distance moyenne inter-cellulaire et la longueur du volume d'étude, quelle que soit la densité cellulaire.

Les écarts relatifs sont cependant globalement plus faibles que ceux observés dans le cas d'un réseau de cellules. La différence relative atteint 23% à $r=0,5$ et diminue à 5% à $r=0,36$ puis à 1% à $r=0,2$.

Pour donner un exemple, une différence relative de 1% est atteinte à 1.10^5 cellules/mL et à 1.10^6 cellules/mL respectivement pour un volume d'étude de longueur 0,1 cm et 0,04 cm.

3.3 Application de la méthode RDF à un modèle de culture cellulaire *in vitro*

Nous avons ensuite calculé puis comparé les valeurs de dose absorbée moyenne pour une distribution de cellule hétérogène dans un scénario *in vitro* d'incubation avec du ^{18}F -FDG, en utilisant la méthode RDF par deux approches : l'approche directe *via* le calcul LAMMPS des fonctions de distribution radiale de chaque population de cellules (§ 2.6.1) et une approche basée sur l'approximation des configurations cellulaires par des distributions idéales uniformes (§ 2.6.2).

Dans le **tableau 3.5** sont présentés la dose auto-absorbée, le tir croisé et la dose non-spécifique qui ont été calculés avec ces deux approches ainsi que les différences relatives.

Concernant la méthode LAMMPS, le temps de calcul a été de 10 minutes environ, ce qui est relativement court par rapport à celui qui aurait été obtenu avec la méthode de référence, sachant que 20 configurations aléatoires ont été générées pour obtenir le tir croisé moyen.

L'approche simplifiée a permis de réduire le temps de calcul avec un facteur de 300 environ par rapport à l'approche directe avec LAMMPS, mais au détriment du niveau de précision.

Le **tableau 3.5** montre que la différence relative (-10,2%) provient majoritairement de $D_{1\leftarrow 1}$, correspondant à la dose reçue par les cellules au sein d'un cluster provenant de l'activité dans les clusters eux-mêmes. En moyenne, le tir croisé a représenté 20% de la dose absorbée totale contre 25% et 55%, respectivement pour la dose auto-absorbée et la dose non-spécifique provenant de l'activité dans le milieu. En conséquence, les deux autres contributions participent à compenser l'écart lié au tir croisé sur la dose totale, réduisant la différence relative totale à -2,5 %.

Tableau 3.5 – Comparaison de l’auto-absorption, tir croisé, dose non-spécifique et la dose totale en Gy calculés avec deux méthodes : a) Approche directe avec LAMMPS ; b) Approche simplifiée (idéale uniforme). 2 = cellules isolées, 1 = cellules dans les clusters

	Méthode a	Méthode b	Différence relative (%)
D_{auto}	$3,6.10^{-2}$		-
D_{milieu}	$9,88.10^{-2}$		-
$D_{1\leftarrow 1}$	$2,12.10^{-2}$	$2,53.10^{-2}$	-18,9
$D_{1\leftarrow 2}$	$6,11.10^{-3}$	$6,26.10^{-3}$	-2,5
$\sum = D_1^{croisé}$ (Gy)	$2,74.10^{-2}$	$3,15.10^{-1}$	-15,2
$D_{2\leftarrow 2}$	$6,23.10^{-3}$	$6,26.10^{-3}$	-0,6
$D_{2\leftarrow 1}$	$9,79.10^{-3}$	$1,0.10^{-2}$	-2,3
$\sum = D_2^{croisé}$ (Gy)	$1,60.10^{-2}$	$1,63.10^{-2}$	-1,6
$D_{tot}^{croisé}$	$4,34.10^{-2}$	$4,78.10^{-2}$	-10,2
D_{tot}	$1,78.10^{-1}$	$1,83.10^{-1}$	-2,5
Temps de calcul (s)	611	2	

4 Discussion

Les calculs dosimétriques réalisés à l’échelle multi-cellulaire reposent généralement sur des modèles de distribution de cellules selon un réseau (surtout pour la modélisation de clusters compacts) ou une configuration aléatoire. Ces hypothèses de modèle sont rarement discutées alors que l’impact de la configuration cellulaire sur la dose absorbée pourrait être significatif dans certaines conditions.

Afin de mieux comprendre l’implication du type de configuration dans le calcul du tir croisé, nous avons alors réalisé des calculs en faisant varier ce paramètre.

Cette étude a reposé sur la détermination de fonctions de distribution radiale *rdf*, qui reflètent la cartographie spatiale d’un système. Bien qu’étant communément utilisées pour la description de structures atomiques, leur transposition à l’échelle cellulaire dans le cadre d’une évaluation dosimétrique est ici originale.

L’outil de dynamique moléculaire LAMMPS a permis de modéliser des géométries de cellules 3D à différents degrés de complexité et de calculer rapidement les *rdf*. Nous avons pu implémenter un modèle dosimétrique qui permet le calcul du tir croisé moyen avec une précision comparable à celle attribuée aux méthodes de référence mais en offrant une plus grande flexibilité dans la modélisation.

À ce jour, peu d’études ont eu recours à des outils de DM pour la modélisation. Dans une étude récente, Falzone *et al.* (9) ont utilisé un code de DM fait-maison afin de générer des distributions aléatoires de cellules de tailles variables.

4.1 Comparaison de la méthode RDF à la méthode de référence et au MIRDCell

Pour valider l'approche RDF, nous avons d'abord évalué la cohérence des valeurs de $\bar{S}^{croisé}$ avec celles calculées par la méthode de référence et le logiciel MIRDCell.

La comparaison avec le MIRDCell pour plusieurs volumes de clusters sphériques a montré des différences marquées, autour de 30%. Ces différences sont en partie liées aux écarts entre les facteurs $S(r)$ générés avec le MIRDCell et ceux estimés par simulation Monte-Carlo (code MCNP6), provenant des différentes approches de calculs : le calcul des facteurs S du MIRDCell est basé sur une approche analytique et l'approximation de ralentissement continu, comme décrit par Goddu et *et al.* (99). Les différences entre les deux méthodes ont été discutées dans un certain nombre de publications (112, 8, 126).

De plus, le logiciel du MIRDCell présente une périodicité artificielle dans les valeurs de $S(r)$ qui augmente avec la distance. Les mêmes observations avaient été faites dans la publication de Marcatili *et al.* (118) pour le radionucléide ^{177}Lu (118).

Ensuite, les différences proviennent également de la méthode utilisée pour sommer les contributions de tir croisé suivant les positions des cellules dans le modèle. Nous avons remarqué que dans le MIRDCell, ce processus était appliqué avec les contraintes suivantes : les contributions des cellules placées à une distance dont la valeur n'est pas un nombre entier ou au-delà du rayon du cluster ne sont pas incluses dans le calcul.

Dans notre méthode, les contributions de toutes les cellules sources sont prises en compte par une interpolation fine des facteurs $S(r)$ à chaque distance radiale. Ainsi, l'intégration partielle établie par le MIRDCell conduit à une sous-estimation globale du facteur $\bar{S}^{croisé}$, surtout dans le cas de petits clusters.

Les résultats obtenus par la méthode RDF sont très proches des valeurs obtenues avec la méthode de référence ; les écarts étant inférieurs à 0,1%. Par ailleurs, la comparaison des performances de calcul a révélé une réduction du temps de calcul considérable en utilisant la méthode RDF par rapport à la méthode de référence. Le gain de temps est particulièrement important pour la configuration aléatoire impliquant un grand nombre de cellules. Pour 1.10^6 cellules, les calculs ont été 330 fois plus rapides.

Avec la méthode de référence, dans le cas d'une configuration en réseau, l'étape de modélisation (*partie 1*) est globalement peu coûteuse en temps de calcul. Du fait de l'arrangement périodique des cellules, les positions sont décorréélées les unes des autres, ce qui facilite grandement la génération des coordonnées. En revanche, dans le cas d'une configuration aléatoire, le temps de calcul dédié à l'étape de modélisation augmente considérablement avec le nombre de cellules. En effet, les coordonnées de cellules sont créées les unes après les autres en vérifiant pour chacune qu'il n'y a pas de superposition avec celles déjà créées.

Or, pour un volume donné, la probabilité de générer des coordonnées dans des espaces libres devient de plus en plus faible à mesure que le volume se remplit.

En guise d'exemple, la génération des coordonnées de 1.10^6 cellules a nécessité 38 000 secondes. Il faut noter toutefois que ce calcul a été réalisé en considérant une densité cellulaire de 1.10^8 cellules/mL, ce qui est relativement élevé par rapport à la gamme de densité cellulaire utilisée *in vitro*. Ainsi les temps de calcul ont été relevés dans des conditions maximisantes. Dans le cas de densités cellulaires plus faibles, des temps de calculs moins importants sont attendus.

La seconde partie du processus, correspondant au calcul des distances relatives à chaque cellule cible et la somme des facteurs $S(r)$, a exigé un temps de calcul croissant avec le nombre de cellules, indépendamment de la densité cellulaire et du type de configuration.

Concernant la méthode RDF, la partie la plus chronophage correspond au calcul de la *rdf*. Les distances cellule-cellule sont comptées sur une liste de voisins créée par LAMMPS jusqu'à la distance de coupure sélectionnée. Plus la distance de coupure est élevée, plus le temps de calcul augmente. Dans l'exemple donné dans le **tableau 3.3**, la *rdf* pour des conditions aux limites périodiques et une distance de coupure de $250 \mu\text{m}$ a été calculée en seulement 630 secondes.

Un avantage important est que cette fonction *rdf* a pu ensuite être utilisée pour calculer le tir croisé pour toutes les tailles de volume d'étude, en appliquant la fonction de correction des effets de bords appropriée. En conséquence, quels que soient le nombre de cellules ou le type de configuration, le temps de calcul est resté constant et significativement plus faible que celui associé à la méthode de référence.

4.2 Impact de la configuration géométrique sur le tir croisé

Une étude de l'influence de la configuration spatiale des cellules sur la dose absorbée a été menée en fonction de la densité cellulaire et de la taille du volume d'étude.

Avec les outils LAMMPS et Python, le facteur $\bar{S}^{\text{croisé}}$ a été calculé avec la *rdf* spécifique à une distribution aléatoire de cellules ou un arrangement selon un réseau (*cs* et *cfc*) puis comparé au facteur $\bar{S}^{\text{croisé}}$ obtenu pour une distribution idéale uniforme (*i.e.*, g_{ref} simplement égale à 1). Quelle que soit la configuration, les écarts relatifs augmentent en diminuant la taille du volume d'étude et la densité cellulaire. De plus, la *rdf* tend vers 1 aux grandes distances car les positions deviennent décorréliées ; les écarts relatifs diminuent donc en augmentant le volume d'étude.

4.2.1 Distribution aléatoire uniforme

Les résultats ont mis en évidence des écarts non négligeables ($>5\%$), au-delà d'un rapport de la distance moyenne inter-cellulaire sur la longueur du volume d'étude de 0,35. Ainsi, pour une faible densité cellulaire telle que 1.10^5 cellules/mL, les écarts deviennent importants pour des volumes d'étude de longueur inférieures à 0,06 cm, contre 0,03 cm pour une densité de 1.10^6 cellules/mL.

Dans le contexte d'un radiomarquage de cellules dans un tube standard, les dimensions de volume d'étude sont de l'ordre du cm. Ainsi, dans la gamme de densités cellulaires généralement utilisées (1.10^5 - 1.10^8 cellules/mL), on se retrouve plutôt dans des cas où les écarts de tir croisé sont faibles.

Les distributions aléatoires de cellules peuvent être alors approximées de manière fiable par des distributions idéales uniformes ($g_{ref} = 1$) pour le calcul du tir croisé.

Cela signifie que, pour un radionucléide donné, une fois les facteurs S de paires obtenus, le calcul du tir croisé peut être effectué de manière analytique, sans nécessité de décrire spatialement la distribution des cellules. On peut donc s'affranchir de l'étape de modélisation, tout en réduisant nettement le temps de calcul et sans compromettre la précision du résultat.

4.2.2 Configuration réseau

La configuration en réseau se caractérise par une périodicité des positions de cellules. Celle-ci se reflète dans la *rdf* par une succession de pics à des intervalles donnés (cf. **figure 3.2**).

Le nombre de positions "vacantes" (c'est-à-dire où $g=0$) augmente proportionnellement avec le paramètre de réseau, ce qui conduit à une augmentation linéaire des pourcentages de différence entre la *rdf* du réseau et celle d'une distribution idéale uniforme ($g=1$) lorsque le paramètre de réseau ou la distance moyenne inter-cellulaire augmente.

Nous avons vu que, globalement, les écarts sont plus importants que ceux obtenus pour une distribution aléatoire de cellules. Pour des densités cellulaires inférieures à 1.10^6 cellules/mL, les différences dépassent les 10% pour des volumes d'étude de longueur inférieure à 0,2 cm dans le cas d'un réseau *cs*.

Pour le même paramètre de réseau, les distances moyennes sont plus faibles pour le réseau *cfc* et donc la densité est plus forte, expliquant par ailleurs des écarts plus faibles entre les facteurs $\bar{S}^{croisé}$ pour le réseau *cfc* versus la distribution idéale uniforme.

Il faut donc être prudent dans l'utilisation d'un arrangement de cellules selon un réseau et plus généralement dans le calcul du tir croisé à partir d'une seule configuration géométrique. On peut s'attendre toutefois à ce que l'addition de l'auto-absorption et la dose non-spécifique au tir croisé dans la dose absorbée totale conduise à une réduction de l'impact du biais, d'autant plus lorsque l'efficacité de marquage est importante.

Dans le cas de la modélisation de clusters compacts de cellules de rayons de l'ordre du mm, quelle que soit la configuration choisie, nos résultats montrent qu'il est possible d'approximer la distribution de cellules par une distribution idéale uniforme de manière fiable.

Enfin, il faut souligner que la configuration réseau correspond à une description discontinue de la matière qui entraîne l'apparition de régions de vides au niveau des bords dès lors que le volume d'étude considéré n'est pas de taille proportionnelle au paramètre de réseau (**figure 3.14**). Cela conduit *in fine* à une variation de la densité cellulaire globale. Or, la *rdf* calculée par LAMMPS est systématiquement normalisée par la densité globale. Ainsi, si ce modèle de configuration est choisi, il est important de prendre en considération cet aspect lors du calcul de la *rdf* avec LAMMPS.

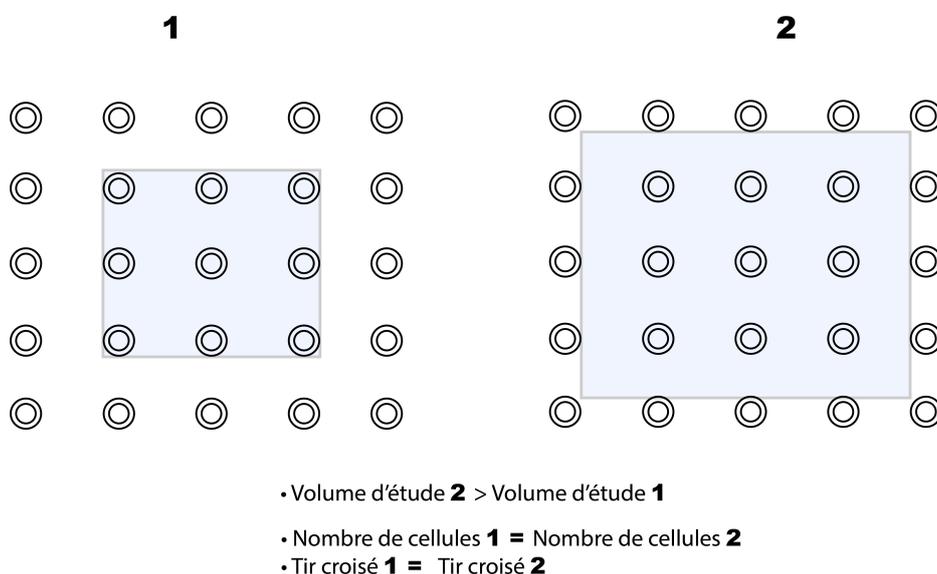


FIGURE 3.14 – Exemple d'un réseau cubique simple. La distribution périodique des cellules crée des variations globales de la densité pour certains volumes, à cause des espacements au niveau des bords.

4.3 Application de la méthode RDF à un modèle de culture cellulaire *in vitro*

La méthode RDF a finalement été appliquée à un cas hypothétique d'expérience *in vitro* de radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG. Le modèle de culture considéré était constitué d'un mélange de cellules isolées et de petits clusters de cellules suspendus dans une solution radioactive de ^{18}F -FDG.

Ce cas pratique a permis de montrer le potentiel de la méthode et de l'outil LAMMPS pour gérer des calculs avec une géométrie plus complexe incluant des hétérogénéités spatiales avec un temps de calcul relativement court (611 secondes) par rapport à ce qui aurait été attendu avec la méthode de référence.

En parallèle, les calculs ont également été réalisés en approximant les distributions cellulaires par des distributions idéales uniformes, ce qui a permis de mettre en perspective les résultats précédents concernant l'impact de la configuration géométrique sur la dose.

Les résultats ont montré que le tir croisé obtenu avec les deux méthodes présentait des différences non négligeables, autour de 10%, la contribution la plus importante provenant du tir croisé pour les cellules de clusters vers les cellules de clusters ($D_{1\leftarrow 1}$). La contribution majoritaire à cet écart correspond à l'approximation de la distribution des cellules selon un réseau au sein des clusters par une distribution idéale uniforme. Le pourcentage de différence de 18,9% est en accord avec les courbes présentées **figure 3.11**, pour un rayon de cluster de $3 \cdot 10^{-3}$ cm et une densité de $1 \cdot 10^8$ cellules/mL ($a \approx 0,002$ et $a/L \approx 0,35$).

Les autres contributions ($D_{1\leftarrow 2}$, $D_2^{\text{croisé}}$) sont similaires pour les deux méthodes, avec des différences relatives en dessous de 2,5%. L'auto-absorption et la dose non-spécifique ont été calculées pour évaluer l'impact sur la dose absorbée totale. Les contributions de l'auto-absorption et du milieu ont permis de faire diminuer significativement les écarts sur la dose absorbée totale à 2,5%. Dans le cas d'un pourcentage d'activité dans le milieu plus élevé ou une densité de cellules isolées plus faible, les écarts seraient encore réduits.

4.4 Modèle dosimétrique et utilisation de LAMMPS : limitations et perspectives

Des considérations intéressantes ont découlé de l'utilisation de LAMMPS pour les calculs dosimétriques. Concernant le processus de modélisation, l'implémentation des conditions aux limites périodiques a été une approche utile pour manipuler de grandes distributions cellulaires.

Tout d'abord, elle a permis de limiter l'occupation de la mémoire et le temps de calcul en répliquant la boîte de simulation dans les trois dimensions spatiales, créant ainsi des cellules "fantômes" qui sont prises en compte lors du calcul. Ensuite, le calcul de la *rdf* avec les conditions aux limites périodiques puis l'application d'un facteur de correction analytique pour prendre en compte les effets de bords ont constitué une

façon économique de calculer la dose, évitant ainsi de modéliser la distribution cellulaire pour chaque volume considéré.

Nous devons garder à l'esprit toutefois que la génération de distributions aléatoires de cellules en milieu infini par réplique de la boîte de simulation dans les trois dimensions (conditions aux limites périodiques) rend les distributions seulement pseudo-aléatoires. La périodicité induite peut introduire un biais dans la *rdf* et dans le calcul de dose. De plus, la réplique de la boîte fait apparaître des pics anormalement élevés de manière périodique aux distances r correspondant aux multiples de la taille de la boîte. À titre d'exemple, pour une boîte de simulation cubique de côté L , des pics artificiels aux distances $\{L, \sqrt{2}L, \sqrt{3}L, 2L, \dots\}$ apparaissent comme le montre la **figure 3.15**.

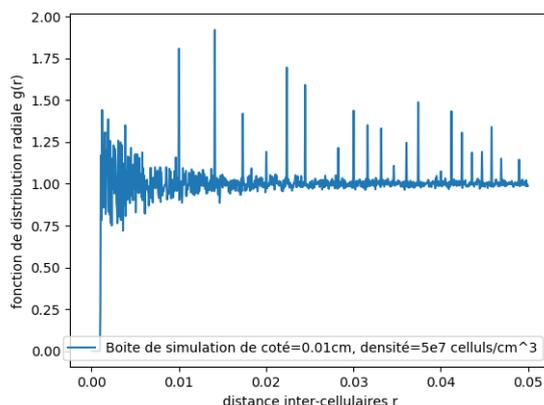


FIGURE 3.15 – Exemple de pics artificiels dans la fonction de distribution radiale induits par les conditions aux limites périodiques.

Pour limiter l'impact de cet effet sur la dose, la boîte de simulation primaire doit être raisonnablement grande. Pour nos calculs, nous avons vérifié au préalable que la présence de ces pics artificiels n'avait pas d'impact significatif sur la dose absorbée. Dans le cas où l'impact est non négligeable, on peut facilement corriger cet artefact en appliquant un filtre fenêtre, ramenant la valeur de $g(r)$ pour ces distances à la moyenne sur la fenêtre.

Il faut également souligner que le modèle proposé est générique et adapté à la prise en compte de toutes les variables qui influent potentiellement sur la dose. Ici, les variables de taille des cellules et d'activité intracellulaire n'ont pas été considérées. Toutefois, il est tout à fait envisageable de modéliser une population de cellules de taille variable avec LAMMPS et d'assigner à chaque cellule une taille de cellules et une activité cumulée intra-cellulaire par échantillonnage de distributions prenant en compte la moyenne et l'écart-type

de données expérimentales.

Finalement, dans les études réalisées dans ce chapitre, des commandes LAMMPS ont été utilisées pour modéliser des structures en réseau (statiques) ou générer des échantillons purement statistiques de distributions aléatoires sans tirer avantage de l'approche par dynamique moléculaire offerte par le code.

Il serait intéressant d'explorer les fonctionnalités de dynamique dans le cadre d'études dosimétriques.

Dans le cas de distributions aléatoires de cellules, le fait de moyenniser $g(r)$ sur de multiples configurations aléatoires revient à balayer différentes positions possibles, ce qui explique que la fonction tende vers celle d'une distribution idéale homogène. Plus la densité cellulaire est faible, plus le nombre de configurations à générer pour que la valeur de $\bar{S}^{croisé}$ converge est élevé ; autrement dit, plus la dispersion de la fonction $g(r)$ associée à chaque configuration individuelle est susceptible d'être importante.

On peut alors se poser la question de la représentativité d'une *rdf* moyenne pour la distribution aléatoire dans certains cas.

Des calculs de *rdf* plus réalistes pourraient être réalisés sur LAMMPS en passant d'une modélisation d'une distribution aléatoire uniforme purement statistique à une distribution prenant en compte de manière réaliste la dynamique des cellules.

Dans le cas concret d'une incubation de cellules en suspension dans une solution radioactive pour réaliser un radiomarquage, on peut alors imaginer deux scénarios :

- La solution est régulièrement agitée : dans ce cas, la modélisation du système par une distribution aléatoire uniforme à partir d'une moyenne statistique sur un échantillon de configurations aléatoires semble appropriée.
- Les cellules ne sont pas agitées : soumises à la pesanteur, celles-ci sédimentent progressivement au fond du tube.

Dans cette perspective, nous avons réalisé une étude préliminaire portant sur la modélisation du processus dynamique de sédimentation. Elle est présentée dans l'annexe 2, §2.

Brièvement, la dose absorbée moyenne en considérant trois modèles différents : (i) un modèle de suspension cellulaire statique négligeant la sédimentation, (ii) un modèle binaire comprenant une configuration de cellules en suspension entre 0 et le temps pour lequel toutes les cellules ont théoriquement sédimentées, et (iii) un modèle semi-réaliste avec une configuration cellulaire où la densité effective varie au sein de la distribution de cellules et au cours du temps pour refléter la sédimentation continue des cellules.

La comparaison des doses a mis en évidence un écart de dose important entre le modèle sans sédimentation et les deux autres, démontrant ainsi l'importance de la prise en compte de ce processus dans le calcul de dose.

5 Conclusion

Dans ce travail, nous avons proposé une méthode originale pour calculer rapidement le tir croisé aux cellules, basée sur l'utilisation de fonction de distributions radiales. Le code LAMMPS a été utilisé pour modéliser et calculer la *rdf* dans différentes conditions de densité cellulaire, taille de volume et types de configuration (aléatoire ou réseau). Bien que la méthode proposée soit adaptée à tout type de radionucléide, celle-ci a été appliquée ici au cas d'un radiomarquage de cellule avec du ^{18}F -FDG utilisé pour l'imagerie TEP puis validée par comparaison avec la méthode de référence implémentée dans le chapitre 2 et le logiciel MIRDCell. La nouvelle approche basée sur la *rdf* en utilisant le code LAMMPS a permis d'obtenir des résultats avec un gain de temps considérable ; le temps de calcul diminuant de quelques heures à quelques secondes pour des modèles de plus de 1 million de cellules, par rapport à la méthode de référence.

La méthode RDF a ensuite été utilisée pour évaluer de manière systématique l'impact de la configuration spatiale des cellules sur le tir croisé en fonction de la densité cellulaire et du volume d'étude. La *rdf* a été calculée pour une configuration de cellules selon un réseau cubique (*cfc* ou *cs*) et une configuration aléatoire de cellules et les valeurs de croisé ont ensuite été comparées à celles obtenues pour une distribution idéale uniforme ($g_{ref}=1$).

Les résultats ont montré des écarts qui augmentent en diminuant la densité cellulaire et la taille du volume d'étude. Dans le cas de la distribution aléatoire uniforme, des différences relatives significatives ($>5\%$) ont été obtenues pour des volumes de tailles très limitées ($<0,05$ cm de longueur) et de faibles densités cellulaires ($<5 \cdot 10^5$ cellules/mL).

Dans ces conditions, LAMMPS apparaît comme un bon outil pour générer des configurations aléatoires et calculer la *rdf* moyenne de manière rapide et fiable. Dans les autres cas où les écarts sont considérés comme négligeables, une perspective forte est offerte : celle de permettre le calcul de la dose absorbée sans nécessiter d'étape de modélisation de la distribution des cellules et sans perte de précision de calcul. De plus, nous avons montré que la configuration de cellules selon un réseau cubique pouvait introduire un biais dans le tir croisé par rapport à une distribution idéale uniforme ou une distribution aléatoire de cellules. Dans le cas d'un réseau cubique simple (*cs*), des écarts à plus de 5% ont été calculés pour des densités cellulaires inférieures à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL et pour des volumes de longueurs dépassant le parcours maximal des β^+ du ^{18}F (2,4 mm). Dans la gamme de densité cellulaire $8 \cdot 10^6$ - $1,25 \cdot 10^8$ cellules/mL, les longueurs de volume d'étude pour ces mêmes écarts varient entre 0,15 cm et moins de 0,015 cm.

Enfin, le travail présenté dans ce chapitre a permis de montrer l'intérêt de l'outil LAMMPS et de l'application de la méthode RDF à des géométries plus complexes composées de plusieurs populations de cellules avec

des caractéristiques spatiales différentes.

Il apparaît également que l'utilisation de sa fonctionnalité de dynamique moléculaire pourrait être explorée davantage afin de tirer profit de la fonction de dynamique moléculaire.

Dans cette perspective, une étude préliminaire concernant le calcul de la dose moyenne délivrée aux cellules lors d'un radiomarquage au ^{18}F -FDG a été réalisée en modélisant une population de cellules en suspension affectées d'un processus de sédimentation au cours du temps (présentée dans l'Annexe 2, §2). Ces fonctionnalités devraient également permettre de modéliser de manière plus réaliste la cinétique de distributions de cellules en tenant compte par exemple des propriétés mécaniques des cellules (viscosité, élasticité) et de leurs interactions dans un liquide.

Dans ce chapitre 3 et le précédent, nous avons développé et optimisé des outils de calcul de la dose absorbée moyenne dans différentes configurations de cellules en prenant en compte des variables de marquage *in vitro* telles que la densité cellulaire et l'efficacité de marquage. Les études paramétriques ont permis de mieux appréhender les paramètres importants à prendre en compte dans le calcul, et leur implication dans le dépôt de dose.

Le chapitre suivant est consacré à l'étude expérimentale de la relation dose-effet de cellules radiomarquées *in vitro* au ^{18}F -FDG afin d'étudier l'impact de ce type de radiomarquage sur les cellules et d'apporter de nouvelles données radiobiologiques. Les outils de calculs développés ici seront utilisés pour élaborer un modèle dosimétrique réaliste permettant de calculer la dose moyenne délivrée aux cellules au cours du radiomarquage et de les corrélérer aux effets biologiques.

Chapitre 4.

Relation dose-effet de cellules radiomar- quées au ^{18}F -FDG

1 Introduction

Pour rappel, dans le cadre du suivi de cellules par imagerie TEP, le radiomarquage au ^{18}F -FDG est particulièrement étudié en raison de la facilité de production du ^{18}F -FDG et du potentiel d'un transfert plus rapide du protocole vers un cadre clinique (216, 85).

Le succès d'une telle procédure repose, en théorie, sur la capacité du radiomarquage à induire une incorporation stable et spécifique du radiopharmaceutique dans les cellules, et cela, sans altérer la fonctionnalité normale des cellules ou leur viabilité pouvant impacter la biodistribution *in vivo* et donc l'interprétation des images (70).

Les données de la littérature sur le sujet ne sont actuellement pas suffisantes pour établir une conclusion claire sur la cytotoxicité du radiomarquage. Une partie des difficultés rencontrées dans l'analyse des données est liée au fait que nombre d'études se limitent à une mesure de viabilité, à des temps très précoces (<24h), qui ne permettent pas de détecter les effets différés sur l'intégrité des cellules. D'autre part, l'aspect dosimétrique est peu abordé dans la littérature où les effets biologiques sont davantage exprimés en termes de valeurs d'activité (Bq/cellule) qu'en termes de valeurs de dose (Gy) (52, 89, 32, 80, 217). Cet écueil conduit à une difficulté d'interprétation des résultats et limite la comparaison entre les différents travaux, d'autant plus que les paramètres de marquage varient beaucoup d'une étude à l'autre. L'évaluation précise de la dose aux cellules est cruciale pour mieux comprendre la relation entre les paramètres physiques et les effets observés.

Le travail présenté dans ce chapitre s'inscrit dans la perspective de mieux appréhender les enjeux qui sous-tendent la procédure de radiomarquage et d'éclairer les pratiques actuelles afin d'établir, dans le futur, des protocoles de marquage de manière plus harmonisée.

Les outils de calculs développés dans les chapitres précédents ont été utilisés afin d'étudier l'impact du radiomarquage par le biais d'une étude expérimentale de la relation dose-effet appliquée au cas du ^{18}F -FDG. Pour cette étude, nous avons sélectionné deux modèles cellulaires différents, en lien avec les applications de radiomarquage présentées dans le chapitre 1 (cf. Chapitre 1, §3) : des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux (adCSM) et une lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T CD4 humaines (JURKAT). Cette dernière est fréquemment utilisée pour les études de la réponse cellulaire à l'irradiation et présente un intérêt pour l'étude des thérapies cellulaires basées sur les lymphocytes T (218, 219).

D'un point de vue expérimental, une première étape a été consacrée à la mise au point d'un protocole de radiomarquage fiable et reproductible puis à la réalisation d'une étude préliminaire de caractérisation du

radiomarquage afin d'analyser l'influence de divers paramètres expérimentaux sur l'efficacité et la stabilité du ^{18}F -FDG. Les expériences de radiomarquage au ^{18}F -FDG ont été réalisées sur la plateforme du Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), en collaboration avec le Laboratoire de Radiotoxicologie et Radiobiologie expérimentale (LRTOX) de l'IRSN.

Des tests de clonogénicité ont ensuite été réalisés afin d'établir des courbes de survie en fonction de la dose absorbée. De plus, une analyse quantitative des CDB de l'ADN radio-induites dans les cellules a été poursuivie.

Des irradiations ont été réalisées en parallèle sur un accélérateur linéaire médical (LINAC), à 4 MV, disponible à l'IRSN, afin de mettre au point les tests fonctionnels et finalement pour comparer les résultats à ceux obtenus après radiomarquage au ^{18}F -FDG.

Le second versant de l'étude a concerné le développement d'un modèle dosimétrique représentatif du dispositif expérimental pour corrélérer les effets observés à des doses précises ainsi qu'une étude de caractérisation des incertitudes associées à la dose absorbée.

Ce modèle dosimétrique a été utilisé pour (i) définir les gammes d'activité à appliquer lors des tests fonctionnels pour obtenir une gamme de doses comparable à celle de l'irradiation externe et, (ii) calculer les doses moyennes délivrées au noyau cellulaire au cours du radiomarquage de manière personnalisée en prenant en compte l'ensemble des grandeurs d'influence spécifiques à chaque expérience.

2 Matériels et méthodes expérimentales

2.1 Cellules et conditions de culture

2.1.1 JURKAT

Les cellules JURKAT ont été cultivées en suspension dans des flasques de 75 cm² à 37°C et 5% de CO₂ pendant quelques jours jusqu'à atteindre une densité de l'ordre d'une dizaine de millions de cellules/mL. La composition du milieu de culture est présentée dans le **tableau 4.1**. Les cellules ont été ensuite collectées par centrifugation (8 minutes à 400g), énumérées, puis remises en flasques à 5 000 cellules/mL dans 20 mL de milieu de culture.

2.1.2 Cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (adCSM)

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules adhérentes primaires ayant un nombre de divisions cellulaires limité. Dans le cadre de nos expérimentations, les cellules ont été obtenues à partir de

tissu adipeux de rats. Six lots de cellules ont été extraits précédemment de rats différents. Afin de vérifier la qualité des lots de cellules produits, une évaluation de leur capacité à former des colonies a été réalisée. De plus, les cellules ont été marquées par des marqueurs d'antigènes spécifiques (CD29, CD73, CD90 et CD106) et non-spécifiques (CD34, CD45, CD44H).

Les cellules ont ensuite été conservées sous forme d'aliqots de 1 million de cellules à -150°C, jusqu'à utilisation ultérieure pour les expérimentations.

Après décongélation d'un lot, les cellules ont été mises en culture dans des flasques de 75 cm² dans un milieu de culture (composition indiquée dans le **tableau 4.1**) permettant leur expansion en monocouche. Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine et à quasi-confluence, un passage a été réalisé. Le principe du passage est de repiquer les cellules dans une nouvelle flasque avec du milieu de culture neuf, à une densité plus faible, pour maintenir la culture. Plus précisément, les cellules ont été rincées deux fois en solution de tampon au phosphate (STP), puis détachées en les incubant 5 minutes à 37°C avec de la trypsine (5 mL/flasque). Après ce temps d'incubation, du milieu de culture a été ajouté pour stopper l'action de la trypsine. Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation, énumérées et ré-ensemencées. Les cellules au deuxième passage (P2) ont été utilisées pour les expérimentations *in vitro*.

Tableau 4.1 – Composition des milieux de culture pour les cellules JURKAT et adCSM.

	JURKAT	adCSM
Milieux	Milieu RPMI 1640 (31870074, Fisher)	Milieu MEM- α (Sigma Aldrich, 51412C)
	10% Sérum de veau fœtal (SVF) (10270106, Fisher)	
Suppléments	1% de pénicilline/streptomycine (Sigma Aldrich, P4333-100ML)	
	1% de glutamine (Fisher, 25030081)	

2.2 Caractérisation du marquage au ¹⁸F-FDG

2.2.1 Principe du radiomarquage

Le radiopharmaceutique ¹⁸F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (¹⁸F-FDG) correspond à l'association du radionucléide ¹⁸F et du FDG, un analogue du glucose, par remplacement du deuxième groupement hydroxyl (OH) du FDG par un atome radioactif de ¹⁸F. Le radiopharmaceutique est transporté à l'intérieur des cellules *via* les transporteurs du glucose présents sur la membrane des cellules, de la même façon que le glucose. Il est ensuite phosphorylé par l'enzyme hexokinase en FDG-6-phosphate qui, n'étant pas un substrat des autres enzymes de la glycolyse, se retrouve ainsi piégé dans le cytoplasme de la cellule (181, 88). Le processus

de captation du ^{18}F -FDG est illustré **figure 4.1**.

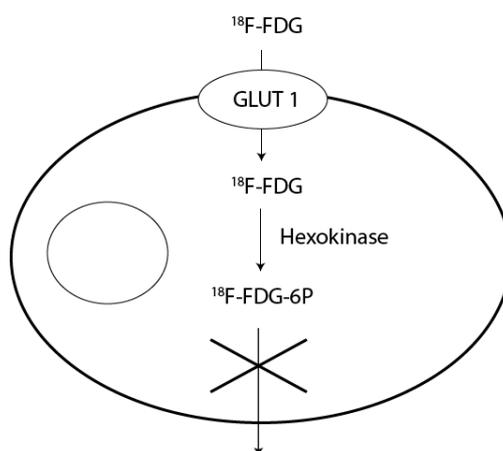


FIGURE 4.1 – Mécanisme d'internalisation du FDG dans les cellules (181).

Ainsi, une simple incubation des cellules avec le ^{18}F -FDG permet de radiomarquer les cellules. La procédure nécessite cependant de soumettre, en amont, les cellules à une privation de glucose afin d'éviter la compétition entre le glucose et le FDG au niveau des transporteurs membranaires. Pour cela, le milieu de culture a été systématiquement retiré et remplacé par de la solution STP au moins une heure avant le radiomarquage.

Le ^{18}F -FDG utilisé pour l'ensemble des expérimentations *in vitro* a été fabriqué par un cyclotron de la société Curium. Les premières expériences de radiomarquage ^{18}F -FDG ont été dédiées à la caractérisation de l'efficacité de marquage *i.e.*, le pourcentage d'activité incorporée dans les cellules, dans différentes conditions expérimentales, pour les deux types cellulaires étudiés.

2.2.2 Mesure de l'efficacité de marquage

Définition. L'évaluation de l'efficacité de marquage (*Eff.*) repose sur le rapport de la mesure de l'activité incorporée dans les cellules à la fin de la période d'incubation (A_{cell}) des cellules avec le ^{18}F -FDG et l'activité totale présente dans le tube (A_{tot}). Elle se calcule comme suit :

$$Eff.(\%) = 100 \times \frac{A_{cell}}{A_{tot}} \quad (4.1)$$

Conditions de marquage. Des expériences de radiomarquage au ^{18}F -FDG ont été réalisées avec les cellules JURKAT et adCSM dans diverses conditions de concentration en insuline (UI/mL), de densité cellulaire, d'activité volumique et de temps d'incubation, indiquées dans le **tableau 4.2**.

Chaque expérience a été reproduite trois fois et chaque condition en triplicat. Le processus d'amplification

Tableau 4.2 – Paramètres expérimentaux utilisés pour l'évaluation de l'efficacité de marquage pour les cellules JURKAT (a) et adCSM (b).

(a) JURKAT			
Conc. insuline (UI/mL)	Densité cell. (/mL)	Act. volumique (MBq/mL)	Temps d'incubation (min)
1, 5, 10, 20	5.10 ⁶	20	60
0	2.10⁶, 5.10⁶, 10.10⁶	20	60
0	5.10 ⁶	5, 10, 20, 40	60
0	5.10 ⁶	20	15, 30, 45, 60, 90, 150

(b) adCSM			
Conc. insuline (UI/mL)	Densité cell. (/mL)	Act. volumique (MBq/mL)	Temps d'incubation (min)
1, 5, 10, 20	2.10 ⁶	20	60
0	2.10 ⁶	5, 10, 20, 40	60
0	2.10 ⁶	20	15, 30, 45, 60, 90, 150

des adCSM étant plus lent et limité, la densité cellulaire de référence (2.10⁶ cellules/mL) a été fixée à une valeur plus faible que celle des JURKAT (5.10⁶ cellules/mL).

Protocole. Les cellules ont été lavées deux fois en STP, comptées, puis mises en suspension en tube à la densité sélectionnée dans une solution de STP, supplémentée de SVF à 1%. Pour collecter les cellules adCSM, la même procédure de décollement par trypsine que celle décrite dans le paragraphe 2.1 a été utilisée. Les cellules ont été maintenues en solution STP (c'est-à-dire en déprivation de milieu nutritif) pendant au moins une heure avant l'ajout du ¹⁸F-FDG. Ces étapes de préparation des échantillons ont été réalisées en condition stérile, sous flux laminaire. Le ¹⁸F-FDG a ensuite été ajouté dans chaque tube, dans un volume total de 0,4 mL pour les JURKAT comme pour les adCSM.

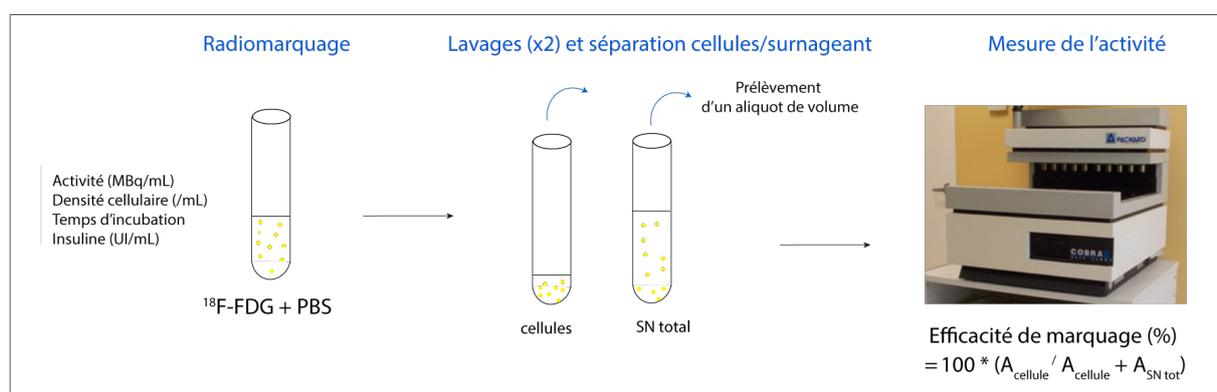


FIGURE 4.2 – Représentation des principales étapes pour la mesure de l'efficacité de marquage pour un échantillon. Après incubation des cellules avec le ¹⁸F-FDG dans un tube, les cellules et le surnageant (SN) sont séparés par centrifugation afin de mesurer l'activité contenue dans chacune des composantes et déterminer l'efficacité de marquage.

Après incubation des cellules en présence du ^{18}F -FDG pour la durée sélectionnée, le protocole suivi pour la mesure de l'efficacité dans chaque tube de marquage, dont le principe est illustré **figure 4.2**, a été le suivant :

- 1^{ère} centrifugation des cellules pendant 8 minutes à 400 g,
- Transfert du surnageant dans un autre tube (T_{sn}),
- Resuspension des cellules dans 2 mL de STP,
- 2^{ème} centrifugation des cellules pendant 7 minutes à 1500 rpm,
- Transfert du surnageant total dans le tube T_{sn} ,
- Resuspension des cellules dans 1 mL de STP,
- Prélèvement d'un aliquot de cellules et de surnageant du tube T_{sn} (10 μL),
- Mesure du taux de comptage pour chaque aliquot au compteur gamma (Cobra II Auto-Gamma 5010, Packard Instrument).

Le compteur gamma mesure le taux de comptage, c'est-à-dire le nombre de coups détectés par unité de temps et la conversion des coups en activité (Bq) dépend des valeurs de calibration du détecteur. Dans notre cas, un comptage en coups par minute (cpm) a été réalisé, avec l'équivalence suivante : 1 cpm = 1 Bq.

Un tube témoin de cellules sans activité, ainsi qu'un tube témoin sans cellule avec de l'activité ont été systématiquement passés au compteur. Le témoin positif a permis de contrôler l'exactitude de l'activité ajoutée dans les tubes. Par ailleurs, lors de la séparation du surnageant du culot cellulaire, une petite quantité de surnageant subsiste au fond du tube (une dizaine de μL dans notre cas), dont l'activité sera alors prise en compte dans la mesure associée aux cellules. Pour vérifier que l'activité associée à ce volume était négligeable, un aliquot du surnageant issu du deuxième lavage a systématiquement été prélevé et passé au compteur gamma.

2.2.3 Stabilité du radiomarquage

Une perte progressive de l'activité incorporée dans les cellules peut avoir lieu par un processus de déphosphorylation et hydrolyse du ^{18}F -FDG (220). Après un temps d'incubation de 60 minutes, la stabilité du radiomarquage au ^{18}F -FDG a été évaluée en mesurant le pourcentage de l'activité restant dans les cellules à différents temps après la fin du radiomarquage (30, 60 et 90 minutes).

Ces mesures de stabilité ont été réalisées pour des conditions fixes de densité cellulaire pour les adCSM et JURKAT (respectivement 2.10^6 et 5.10^6 cellules/mL) d'activité volumique (20 MBq/mL) et en absence d'insuline.

À chaque temps post-marquage sélectionné, la suspension de cellules marquées a été centrifugée et des

aliquots de surnageant et de cellules ont été prélevés afin de mesurer leur activité respective avec le compteur gamma.

La stabilité du marquage a été calculée ainsi :

$$\text{Stabilité (t) (\%)} = \frac{A_{cell}(t)}{(A_{cell}(t) + (A_{SN}(t)))} \times 100 \quad (4.2)$$

avec $A_{cell}(t)$ et $A_{SN}(t)$ les activités mesurées respectivement dans les cellules et le surnageant au temps t .

Les activités mesurées ont été corrigées de la décroissance, telles que :

$$A_i(t) = A_i(t_m) \times \exp\left(\frac{\ln(2)}{T_p} \times (t_m - t)\right) \quad (4.3)$$

avec $i=cell$ ou SN ; t_m le temps de mesure et T_p la période physique du ^{18}F -FDG.

2.3 Tests fonctionnels *in vitro*

2.3.1 Choix des paramètres biologiques et des techniques expérimentales

L'objectif était de concevoir des conditions de radiomarquage homogènes et des tests *in vitro* robustes pour les adCSM et les JURKAT, permettant de comparer et d'analyser, pour une gamme de dose, la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN et le devenir cellulaire. Le plan expérimental est illustré **figure 4.3**.

Après radiomarquage des cellules au ^{18}F -FDG ou irradiation externe aux rayons X, une partie des cellules a été mise en culture afin d'évaluer la survie clonogénique après une dizaine de jours d'incubation, tandis qu'une autre partie des cellules a été mise en culture dans plusieurs échantillons puis fixée à 1h, 24h et 72h afin d'évaluer la cinétique de dommages/réparation des cassures de l'ADN et le cycle cellulaire. Pour cela, des marquages immunofluorescents respectivement des *foci* γH2AX et de l'ADN ont été réalisés.

Nous avons fait le choix d'une analyse des *foci* γH2AX par mesure au cytomètre en flux qui est avantageuse pour (i) sa rapidité d'implémentation et (ii) sa capacité d'analyse quantitative à l'échelle de la cellule unique de plusieurs paramètres simultanément.

Un protocole de marquage immunofluorescent et d'analyse au cytomètre de flux ont ainsi été développés pour effectuer, sur une même population de cellules, une mesure rapide et reproductible de l'intensité de fluorescence relative γH2AX en fonction du cycle cellulaire.

Étant donné que les cellules sont radiomarquées en suspension, il faut noter qu'une analyse par microscopie aurait posée des difficultés techniques car la visualisation des *foci* s'effectue sur lame avec les cellules immunomarquées devant être fixées au support. Or, le temps de mesure à 1h post-marquage était trop

précoce pour que les cellules adCSM aient le temps d'adhérer de nouveau sur lame. Les cellules JURKAT, quant à elles, sont non-adhérentes. Des solutions de fixation sur lame existent (cytospin ou support de gélatine), mais celles-ci ne sont pas optimales et nécessitent un temps de mise en oeuvre trop long pour visualiser les *foci* au temps 1h post-incubation.

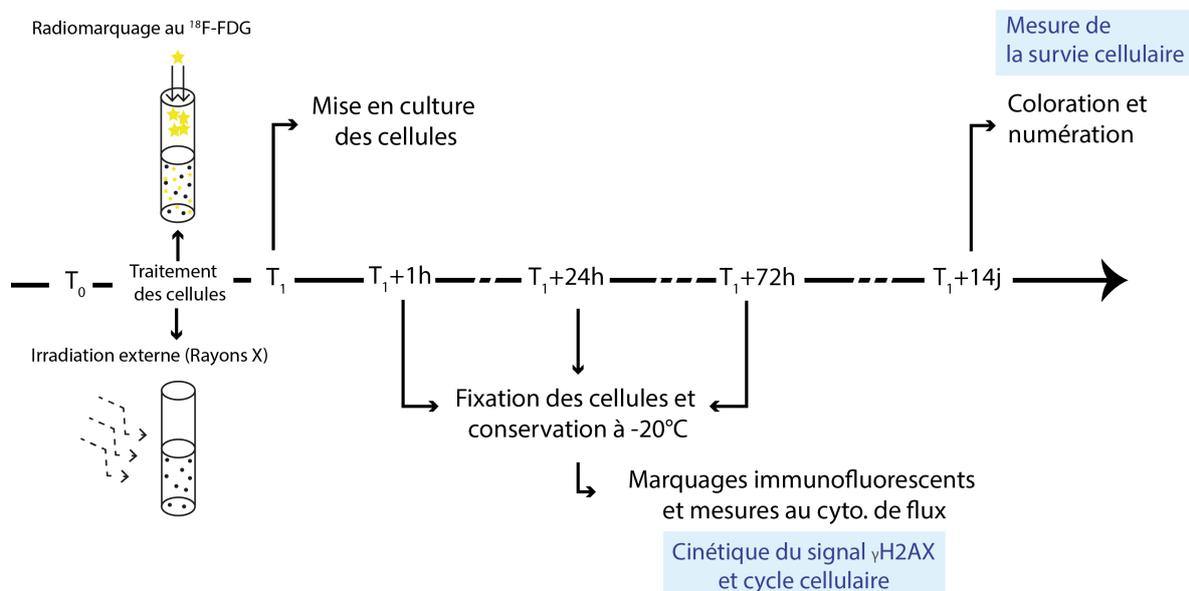


FIGURE 4.3 – Plan expérimental. Chronologie des étapes expérimentales pour l'étude comparée des effets biologiques du radiomarquage et de l'irradiation externe aux cellules JURKAT et aux cellules adCSM.

2.3.2 Protocole de marquage et d'irradiation des cellules

Irradiation. 4.10^6 cellules ont été remises en suspension en tube dans 4 mL de milieu de culture.

Les irradiations ont été réalisées avec l'accélérateur ALPHÉE (Accélérateur linéaire pour la production de photons et d'électrons) de l'IRSN. Il s'agit d'un appareil de radiothérapie permettant d'irradier une large gamme d'échantillons biologiques : cellules, sang ou tissus animaux (rongeurs, mini-pigs).

La plateforme a été utilisée pour délivrer des rayonnements X à 4 MV avec un champ d'irradiation 30x30 cm, à un débit dose de 2,5 Gy/min en moyenne. Les tubes contenant les cellules ont été placés à 1 mètre de la source dans une cuve d'eau puis irradiés à température ambiante.

Les doses délivrées au niveau des cellules étaient : 0,5, 1, 2, 3 et 4 Gy pour les JURKAT et 1, 2, 5 et 10 Gy pour les adCSM avec une incertitude relative sur la dose de 5%.

Radiomarquage. Pour les expériences de radiomarquage, les cellules ont été remises en suspension en tube dans une solution de ^{18}F -FDG diluée en STP à une densité de 5.10^6 cellules/mL et un volume total respectivement de 0,5 mL et 1 mL pour les adCSM et les JURKAT. Un tube par activité, un tube témoin

(avec cellules et sans activité) et un tube sans cellule avec activité ont été préparés en triplicat.

Les cellules ont été récoltées, lavées, puis comptées.

Afin de mieux appréhender l'évaluation de l'incertitude associée au nombre de cellules qui sera effectuée dans la partie 3, des précisions sur la méthode de numération sont apportées. La numération des cellules vivantes est réalisée manuellement à l'aide d'une lame de malassez, avec un volume de 10 μL de suspension cellulaire diluée au bleu de trypan au 1/10. Le petit volume de suspension cellulaire est étalé sur un quadrillage par capillarité entre la lame et une lamelle. La lame est ensuite mise sous microscope et les cellules sont comptées sur un nombre suffisant de carrés du quadrillage pour atteindre au moins 100 cellules. Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01 μL , il est alors possible d'estimer la concentration de cellules moyenne.

Les activités volumiques de ^{18}F -FDG étaient pour les JURKAT : 1,5, 2,5, 5, 8, 11 MBq/mL et pour les adCSM : 2,4, 5, 11, 23 MBq/mL. La sélection de ces gammes d'activités a reposé sur des calculs dosimétriques prévisionnels basés sur les données d'efficacité de marquage obtenues dans l'étude de caractérisation, afin que les doses délivrées aux cellules soient comparables à celles utilisées pour l'irradiation externe.

Pendant l'incubation avec le ^{18}F -FDG, les cellules ont été mélangées toutes les 10-15 minutes. Après 60 minutes d'incubation, pour stopper le marquage, les cellules ont été centrifugées (5 min à 1500 rpm), puis resuspendues dans 2 mL de milieu de culture. Elles ont ensuite été centrifugées de nouveau puis resuspendues dans 2 à 4 mL de milieu de culture avant ensemencement pour les différents tests fonctionnels. Des aliquots de surnageant et de suspension cellulaire ont été prélevés pour mesure de l'activité avec le compteur gamma. L'ensemble de la procédure de radiomarquage a été réalisé sous hotte de culture de façon à préserver la stérilité des cultures de cellules.

2.3.3 Protocoles d'étude de la survie clonogénique

Survie clonogénique des adCSM : test CFU-F. Après radiomarquage ou irradiation, une partie des adCSM a étéensemencée en triplicat dans des flasques de 25 cm^2 à plusieurs densités cellulaires, indiquées dans le **tableau 4.3**.

Les cellules ont été mises en culture à 37°C pendant 10 à 14 jours et les colonies formées appelées colony-forming unit fibroblast (CFU-F) ont été révélées par une coloration de May-Grünwald-giemsa, après rinçage des flasques au STP et fixation au méthanol pendant 10 minutes.

Pour chaque flasque, l'efficacité de survie a été obtenue par régression linéaire du nombre de colonies obtenues, en fonction du nombre de cellules initialement ensemencées. L'efficacité de survie correspond

Tableau 4.3 – Conditions de mises en culture pour le test CFU-F des cellules adCSM marquées au ^{18}F ou irradiées. Chaque condition a été appliquée en triplicat.

Traitement des cellules	Conditions de culture	Nombre de cellules par flasque
Irradiation externe	Témoin	25-50-100-200
	1 Gy	100-200-400-800
	2 Gy	200-400-800-1 600
	5 Gy	1000-2 000-4 000-8 000
	10 Gy	10^4 - $2 \cdot 10^4$ - $4 \cdot 10^4$ - $8 \cdot 10^4$
^{18}F -FDG	Témoin	25-50-100-200
	2,4 MBq/mL	100-200-400-800
	5 MBq/mL	200-400-800-1 600
	11 MBq/mL	1000-2 000-4 000-8 000
	23 MBq/mL	10^4 - $2 \cdot 10^4$ - $4 \cdot 10^4$ - $8 \cdot 10^4$

alors au coefficient de la pente.

Pour déterminer la survie clonogénique, l'efficacité de survie des cellules traitées est finalement normalisée par rapport à celle des cellules témoins. Pour chaque protocole d'exposition, la moyenne et l'écart-type de la fraction de survie ont été calculés à partir d'au moins trois expérimentations indépendantes.

Survie clonogénique des cellules JURKAT : méthode par dilution limite. Un test CFU tel qu'utilisé pour les adCSM n'est pas adapté aux JURKAT qui sont des cellules proliférant en suspension. Dans leur milieu de culture standard, celles-ci ne forment pas de clones identifiables et énumérables visuellement. Pour évaluer la survie des cellules JURKAT, une méthode de dilution limite a donc été utilisée. Cette méthode consiste à estimer la fréquence de clonage des cellules en ensemençant les cellules à de très faibles quantités dans des plaques 96-puits à fond plat.

Tableau 4.4 – Conditions de mise en culture des cellules JURKAT marquées au ^{18}F -FDG ou irradiées pour évaluer la survie clonogénique.

Traitement des cellules	Conditions de culture	Nombre de cellules par puits
Irradiation externe	Témoin (0 Gy)	0,5-1-2-4-8-16
	0,5 Gy	1-2-4-8-16-32
	1 Gy	2-4-8-16-32-64
	2 Gy	4-8-16-32-64-128
	3 Gy	8-16-32-64-128
	4 Gy	16-32-64-128-256-512
^{18}F -FDG	Témoin (0 MBq/mL)	0,5-1-2-4-8-16
	1,5 MBq/mL	0,5-1-2-4-8-16
	2,8 MBq/mL	0,5-1-2-4-8-16-32
	5 MBq/mL	1-2-4-8-16-32-64
	8 MBq/mL	2-4-8-16-32-64-128
	10,8 MBq/mL	4-8-16-32-64-128-256

Pour chaque condition, les cellules ont été diluées de manière à répartir dans des plaques 96 puits un

nombre de cellules allant de 0,5 cellules à 512 cellules dans 200 μL de milieu de culture par puits, à raison de 20 ou 30 puits par dilution. Les conditions précises d'ensemencement sont indiquées dans le **tableau 4.4**.

Après une dizaine de jours de culture, les cellules métaboliquement actives sont révélées en ajoutant 20 μL par puits de solution de sel de tétrazolium (MTT), à 2,5 mg/mL. Le réactif MTT est en effet réduit en un produit appelé formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives. Cette réaction produit des cristaux de couleur violette. Après une nuit d'incubation, les surnageants de chaque puits ont été retirés et les cristaux ont été dissous en ajoutant 100 μL par puits de solution d'isopropanol-HCL/0,1N. La densité optique à 495 nm, proportionnelle à la quantité de formazan, a été finalement mesurée dans chaque puits par spectrométrie.

Pour chaque condition, les puits associés à une densité optique au dessus de la limite de détection ont été classifiés en tant que puits positifs, les autres en tant que puits négatifs. Les puits positifs représentent ceux dans lesquels les cellules ont proliféré. La limite de détection (LD) a été définie ainsi :

$$LD = \overline{OD}(A_{milieu}) + 2 \times OD_{\sigma}(A_{milieu}) \quad (4.4)$$

avec $\overline{OD}(A_{milieu})$ la densité optique des puits témoins contenant du milieu de culture sans cellule et OD_{σ} l'écart-type. Pour chaque dose et dilution, la fréquence de puits négatifs a été calculée et représentée en fonction du nombre de cellules, en échelle semi-logarithmique, comme illustré **figure 4.4**.

Une régression log-linéaire a été réalisée pour chaque dosage. L'efficacité de survie a ensuite été déterminée en s'appuyant sur un raisonnement statistique. Selon la loi statistique de Poisson, il a été établi que l'inverse du nombre de cellule N pour lequel on obtient une fréquence de puits négatifs de 37% correspond à l'efficacité de survie (221). Autrement dit, à une fréquence de 37 %, 1 cellule en moyenne sur les N cellules a formé une colonie.

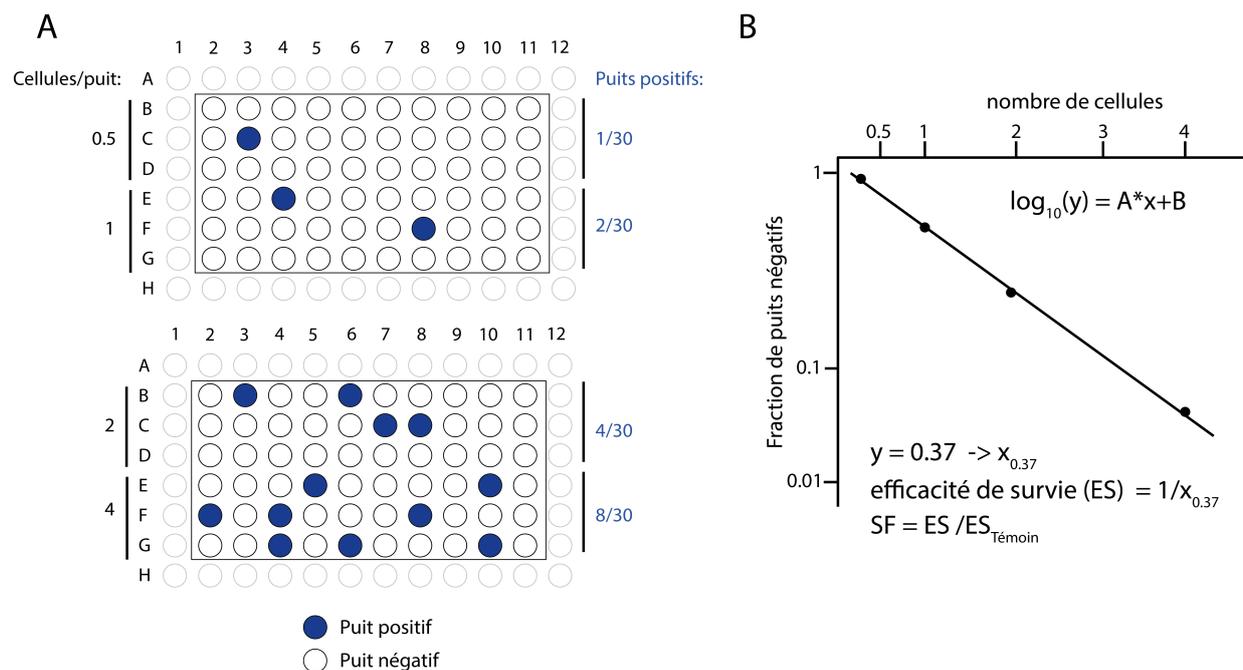


FIGURE 4.4 – Illustration de la méthode de dilution limite pour calculer la fraction de survie des cellules JURKAT, pour une dose donnée. (A) Les cellules sont réparties en très faibles quantités dans les puits (de 0,5 cellules à 4 cellules dans cet exemple), à raison de 30 puits pour chaque nombre. La réponse en absorbance de chaque puits est quantifiée et le nombre de puits positifs, par rapport au seuil de détection pour des puits contrôles sans cellule, est compté. (B) La fréquence de puits négatifs est représentée en fonction du nombre de cellules, en échelle semi-logarithmique. L'efficacité de survie est calculée pour $y=0,37$ et la fraction de survie correspond au ratio de l'efficacité de survie pour la dose considérée sur l'efficacité de survie pour les cellules témoins.

2.3.4 Protocole d'étude du cycle cellulaire et des foyers γ H2AX par cytométrie en flux

Une partie des cellules radiomarquées ou irradiées a également été utilisée pour évaluer la distribution dans les différentes phases du cycle cellulaire et les dommages à l'ADN radio-induits à différents temps post-traitement (1h, 24h et 72h). Environ 1 million de cellules par condition ont été cultivées dans du milieu de culture, en tubes pour les cellules JURKAT et en flasques de 25 cm² pour les cellules adCSM.

Aux trois temps de mesure, les cellules ont été récoltées puis fixées (cf. **figure 4.3 (1A,B et C)**). La fixation est un procédé qui permet de figer dans le temps les cellules dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. La fixation des cellules a été effectuée en utilisant de l'éthanol 70%. Après mélange des cellules avec 500 μ L d'éthanol pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex, les cellules ont été conservées à -20°C jusqu'à trois semaines avant marquage et analyse. Les principales étapes sont illustrées dans la **figure 4.5**.

Marquages par immunofluorescence. Des marquages par immunofluorescence ont ensuite été réalisés sur les cellules fixées.

Les cellules sont d'abord centrifugées pendant 4 min à 2000 g, puis lavées deux fois avec 500 μ L de solution

Acquisition au cytomètre en flux. Les cellules marquées par immunofluorescence ont été analysées par cytométrie en flux avec l'appareil FACSCalibur (Beckton Dickinson). Cette méthode repose sur le passage des cellules, une à une, dans un faisceau laser. Ici, un laser d'excitation à 488 nm a été utilisé et deux types de mesures relatives ont été recueillis :

- un signal optique par diffraction du laser sur les cellules caractérisant la taille des cellules ("forward scatter") et la granulosité ("side scatter") ;
- un signal de fluorescence réémis par les marqueurs de fluorescence fixés sur les cellules.

Plusieurs paramètres caractérisent l'intensité des signaux émis au passage d'une cellule dans le laser : la largeur du signal (**W**), l'amplitude (**H**) et l'aire du signal (**A**), ainsi que la durée de passage de la cellule (temps de vol).

Les propriétés spectrales des deux marqueurs fluorescents (maximum d'excitation et d'émission) sont indiquées dans le **tableau 4.6**.

Tableau 4.6 – Principales caractéristiques des signaux mesurés lors de l'acquisition au cytomètre de flux. Les fluorochromes absorbent l'énergie lumineuse du laser (488 nm) et réémettent une lumière avec une énergie plus faible mais une longueur d'onde λ plus élevée. λ_{max} = longueur d'onde au pic du spectre d'énergie, lin = linéaire, log = logarithmique, -H = hauteur maximale du signal, FSC = front scatter, SSC = side scatter. Les filtres de détection sont indiqués en longueur d'onde/largeur de bande.

Paramètre	Significativité	Excitation	Emission	Détection	Signal	
		λ_{max} (nm)	λ_{max} (nm)	Filtre	échelle	carac.
FSC	Taille des cellules	-	-	488/10	lin	-H
SSC	Granulosité des cellules	-	-	488/10	lin	-H
Alexa Fluor 488	γ H2AX (CDB)	495	519	525/50 (FL1)	log	-H
7-AAD	ADN (cycle cellulaire)	546	647	450/50 (FL3)	lin	-H

Ainsi, pour chaque cellule, l'intensité de fluorescence associée à l'expression des *foci* γ H2AX et celle associée au cycle cellulaire ont été enregistrées. Pour chaque échantillon, un minimum de 10 000 événements a été enregistré.

Analyse des données de cytométrie. Le logiciel CellQuestPro (Becton Dickinson) a été utilisé pour traiter les données. Celles-ci peuvent se présenter sous forme de graphiques en points, contours ou d'histogrammes auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (% , intensité de fluorescence, etc).

L'analyse des données de cytométrie est fondée sur le principe de fenêtrage, où des régions sont placées autour des populations de cellules avec des caractéristiques communes pour identifier et quantifier des populations d'intérêts.

Un premier tri a systématiquement été réalisé afin de retirer de l'analyse le bruit de fond potentiellement généré par des débris ou provenant de la fluorescence de cellules marquées de façon aspécifique. Les

cellules ont été triées en fonction de leur taille et de leur granulosité *via* la représentation par point du signal FSC-H *versus* SSC-H. Une région 1 a systématiquement été délimitée afin d'exclure les débris cellulaires, qui apparaissent clairement hors des gammes de taille et de granulosité attendues (**figure 4.6**).

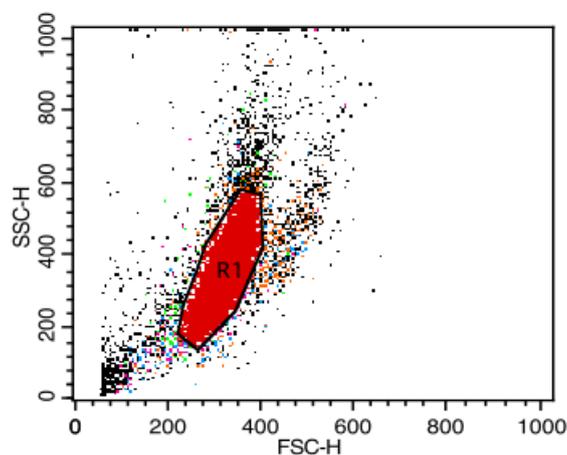


FIGURE 4.6 – Représentation de la population de cellules en fonction de la taille des cellules (FSC) et granulosité (SSC). Chaque point représente une cellule. Les débris cellulaires sont exclus de l'analyse *via* la définition d'un contour (R1).

La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire et la fréquence γ H2AX radio-induite dans les cellules ont ensuite pu être analysées *via* les intensités de fluorescence du 7-AAD et Alexa Fluor 488.

2.3.5 Analyse statistique

Caractérisation du marquage. Les données sont présentées sous la forme **moyenne \pm écart-type**. Pour évaluer l'influence des différents paramètres de marquage sur l'efficacité, un test statistique ANOVA a été appliqué sur chaque série de données. Le test ANOVA est un test de variance qui permet de déterminer si la part de dispersion imputable au facteur étudié, est significativement supérieure à la part résiduelle. Un test de comparaisons multiples de Tukey, dit test HSD (abréviation de *Honestly Significant Difference*) a été appliqué ensuite, afin de distinguer les échantillons qui diffèrent les uns des autres significativement, en comparant deux-à-deux les effets du facteur.

Le test suppose une normalité des distributions et une indépendance entre chaque échantillon. Ainsi, avant d'appliquer le test ANOVA, nous avons d'abord vérifié avec le test statistique Kolmogorov-Smirnov que les données suivaient une loi normale.

De plus, la significativité des différences entre JURKAT et adCSM a été testée en utilisant le test de Student non-apparié. Les différences ont été considérées comme significative pour des valeurs de p inférieures à 0,05. Le logiciel R¹ a été utilisé pour réaliser ces analyses statistiques.

1. <https://www.r-project.org/>

Survie clonogénique. Une comparaison statistique des courbes de clonogénicité a été réalisée en utilisant un test ANOVA.

Pour chaque couple de données, le test ANOVA a comparé une courbe s'ajustant à toutes les données avec celle ajustée à chaque série de données prise individuellement. Le résultat du test a permis de déterminer si les différences entre les modèles d'ajustement sont significativement différentes, considérant un niveau de signification à 5%.

Fréquence de formation γ H2AX. La relation entre la dose absorbée et la fluorescence relative de γ -H2AX dans les cellules a été examinée par régression linéaire, en fonction du temps de mesure post-marquage et irradiation (1h, 42h, 72h) et de la phase du cycle cellulaire.

Pour établir si les différences entre les coefficients d'ajustement en fonction du temps ou de la phase du cycle sont significatives, nous avons réalisé une analyse de co-variance avec le test ANOVA à partir d'une régression linéaire sur l'ensemble des données. Ce test permet d'évaluer l'interaction entre les différents facteurs.

La significativité des différences a été établie pour un seuil de 5% ($p < 0,05$). Le test de student non-apparié a également été utilisé pour la comparaison de valeurs moyennes entre différentes doses, avec $p < 0,05$.

3 Évaluation dosimétrique

3.1 Présentation du modèle dosimétrique

L'expérience de radiomarquage au ^{18}F -FDG a été modélisée afin d'estimer la dose moyenne reçue au noyau des cellules au cours de celle-ci et d'établir une corrélation aux effets *in vitro* radio-induits étudiés. Comme le montre la **figure 4.7**, le modèle dosimétrique décrit toutes les étapes expérimentales, incluant l'incubation des cellules avec le ^{18}F -FDG, les étapes de lavages et la remise en culture des cellules pour les différents tests fonctionnels.

Pour chacune des étapes, la dosimétrie a reposé sur le calcul des trois contributions de la dose absorbée : la dose auto-absorbée, le tir croisé et la dose non-spécifique provenant de l'activité dans le milieu, en tenant compte de la cinétique d'incorporation et de rétention d'activité dans les cellules ainsi que des changements de densité cellulaire et de configuration spatiale des cellules.

Les différentes hypothèses du modèle et des méthodes utilisées pour la détermination des trois composantes de dose sont décrites dans le paragraphe 3.2.

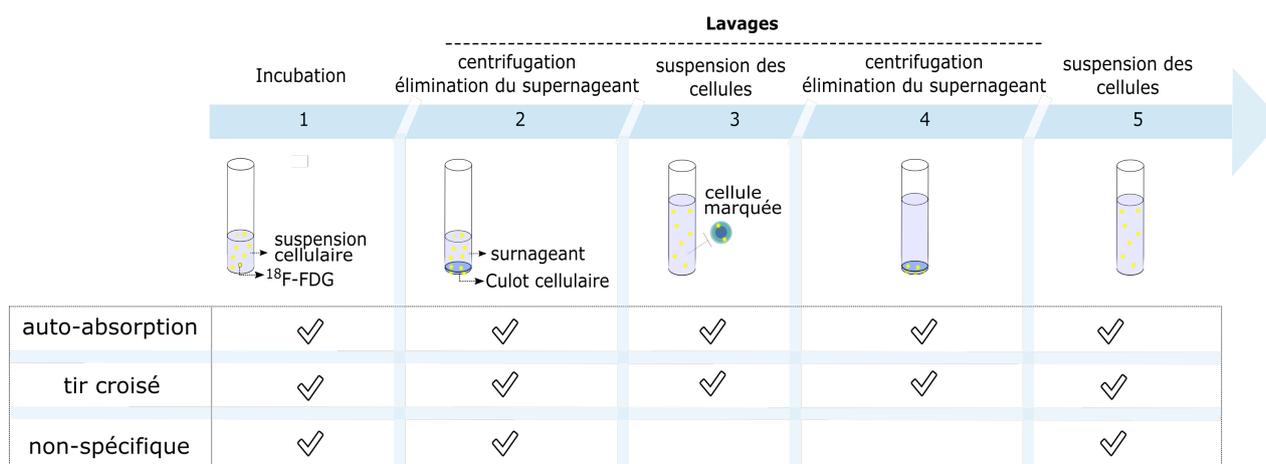


FIGURE 4.7 – Description des étapes de radiomarquage et modèle dosimétrique utilisé pour le calcul de la dose auto-absorbée, du tir croisé et de la dose non-spécifique absorbée aux cellules (provenant de l’activité dans le milieu).

3.1.1 Prise en compte des incertitudes

Démarche générale. L’estimation de la dose moyenne déposée aux cellules au cours du radiomarquage, reposant sur des paramètres à la fois physiques et biologiques et sur un certain nombre d’hypothèses de calcul, s’accompagnent nécessairement d’une incertitude de mesure.

En médecine nucléaire, la question des incertitudes a essentiellement été abordée dans le cadre de l’imagerie quantitative pour la radiothérapie interne (222, 223, 224). Récemment, des indications pratiques ont été délivrées par l’European Association of Nuclear Medicine (EANM) pour appliquer la méthode guide to the expression of Uncertainty in Measurement (GUM) au schéma du MIRD (225).

De manière générale, en dosimétrie à l’échelle cellulaire, les doses calculées sont indiquées sans l’incertitude associée, ou exprimées sous la forme moyenne et écart-type sur plusieurs expérimentations répétées. Ainsi, dans cette étude, nous avons cherché à évaluer de manière systématique les incertitudes associées à la dose absorbée à la cellule lors du radiomarquage au ¹⁸F-FDG, par propagation des incertitudes le long de toute la procédure de radiomarquage, en suivant la méthode analytique du GUM.

L’idée générale est d’identifier puis caractériser les sources d’incertitude impliquées dans chaque étape du radiomarquage pour évaluer finalement l’incertitude combinée sur la dose totale absorbée aux cellules.

Méthode de calcul des incertitudes (méthode GUM). Avant toute chose, une incertitude de mesure est un paramètre caractérisant un intervalle de valeurs dans lequel une valeur mesurée peut être raisonnablement incluse à un niveau de confiance spécifié. Celle-ci comprend les erreurs aléatoires et systématiques commises lors de la lecture de la valeur de la grandeur.

Globalement, la méthode du GUM peut être appliquée lorsque la grandeur y que l'on cherche à estimer peut être déduite d'une expression mathématique liant sa valeur à celles de plusieurs grandeurs d'entrée x_i , telle que :

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (4.5)$$

Les principales étapes suivies dans cette étude pour le calcul des incertitudes associées à la dose absorbée sont :

- **Étape 1** : établissement des relations mathématiques entre la dose absorbée et les grandeurs d'entrée ;
- **Étape 2** : identification des sources d'incertitudes et caractérisation des incertitudes-types associées ;
- **Étape 3** : calcul de l'incertitude composée sous la forme $\overline{Dose} \pm U(\text{Dose})$ en Gy.

L'évaluation des incertitudes-types associées aux grandeurs peut se faire selon deux méthodes :

- la méthode d'estimation dite statistique, qui consiste en un traitement statistique des valeurs mesurées (incertitude de type A) ;
- la méthode d'estimation non statistique, qui évalue l'incertitude par un jugement fondé sur des lois de probabilité (incertitude de type B).

En pratique, les incertitudes de type B sont définies à partir d'une mesure unique. Il faut alors repérer les différentes sources d'erreur liées au processus de mesure.

Pour exemple, les incertitudes associées à trois lois de probabilité usuelles différentes sont présentées **figure 4.8**.

Un facteur d'élargissement est en général appliqué sur les incertitudes-types afin de définir un intervalle de confiance. Dans le cas d'une incertitude de type A, pour un intervalle de confiance sélectionné, la valeur du facteur dépend du nombre d'échantillon. Pour une incertitude de type B, reposant sur une mesure unique, un facteur d'élargissement $k=1,96$ peut être considéré pour définir un intervalle de confiance de 95%.

Le calcul des incertitudes composées (**étape 3**) par propagation des incertitudes-types a été effectué sous

Python (v2.7) à l'aide du paquet *Uncertainties*² qui permet de manipuler les variables sous la forme **nombre** ± **incertitude**. Les calculs, essentiellement analytiques, reposent sur la théorie de propagation des variances.

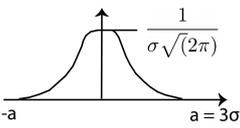
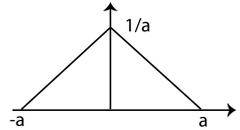
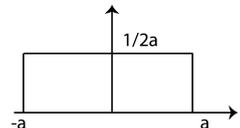
Loi	Fonction de distribution	$u(x)$	Utilisation
Normale		$a/3$	Erreur dépendant d'un nombre important de paramètres, de faible effet individuel
Triangulaire		$a/\sqrt{6}$	Erreur comprise entre deux limites avec faible probabilité d'atteindre ces limites
Uniforme		$a/\sqrt{3}$	Résolution d'un indicateur numérique Instrument vérifié

FIGURE 4.8 – Evaluation d'une incertitude de type B. Guide d'utilisation pour des lois de probabilité usuelles.

Dans les paragraphes suivants, chaque composante de dose sera explicitée et l'incertitude associée à chaque terme sera analysée de manière individuelle.

3.2 Méthode de calcul de la dose moyenne absorbée au noyau et des incertitudes associées

3.2.1 Auto-absorption

Comme déjà vu, d'après le formalisme du MIRd, l'auto-absorption se décrit comme le produit de l'activité cumulée moyenne dans une cellule \tilde{A}_{cel} en MBq et du facteur S^{auto} en Gy/Bq.s⁻¹. Le calcul de ces deux composantes est discuté dans les deux paragraphes suivants.

Activité cumulée. L'activité cumulée \tilde{A}_{cel} correspond à l'intégrale de la fonction de l'activité intracellulaire A_{cel} du temps, illustrée **figure 4.9**.

La première partie de la courbe correspond à la phase d'incorporation de l'activité dans les cellules (phase 1 dans le modèle dosimétrique).

Idéalement, la courbe d'activité est construite par interpolation à partir de mesures de l'activité incorporée dans les cellules à différents temps (3, 118, 103). Cette approche n'est cependant pas applicable dans

2. <https://pythonhosted.org/uncertainties/>

notre cas, car nous ne disposons que d'une seule mesure d'activité, à la fin du temps d'incubation. De ce fait, dans un premier temps, l'hypothèse d'une augmentation linéaire de l'activité dans les cellules a été formulée. L'activité A_{cel} peut être définie par :

$$\text{Phase 1 } (0 < t < t_{inc}) : A_{cel}(t) = \frac{A_{inc}}{t_{inc}} \times t \quad (4.6)$$

avec A_{inc} l'activité par cellule à la fin de la période d'incubation et t_{inc} le temps d'incubation. L'activité A_{inc} peut être explicitée ainsi :

$$A_{inc} = \frac{1}{N_{cel}} \times \frac{A_m}{V_{aliquot}} \cdot V_t \times \exp\left(\frac{-\ln(2)}{T_p} \cdot (t_m - t_{inc})\right) \quad (4.7)$$

avec N_{cel} le nombre de cellules, A_m l'activité incorporée dans les cellules dans un volume de cellules $V_{aliquot}$ mesurée au temps t_m , V_t le volume total de suspension cellulaire et T_p la période physique du $^{18}\text{F-FDG}$.

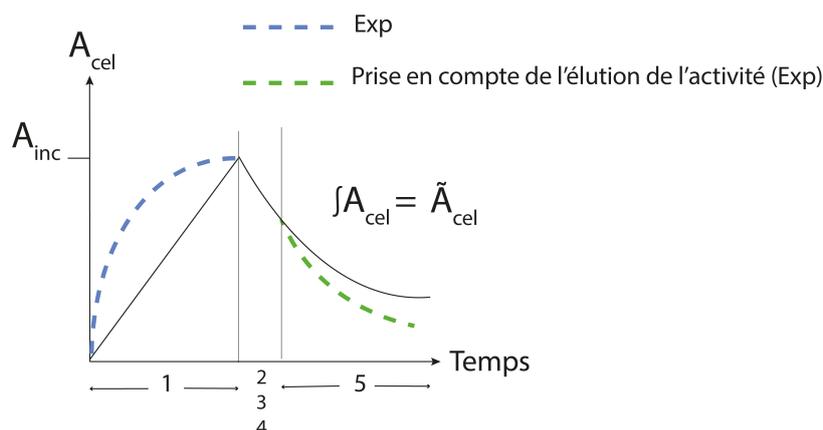


FIGURE 4.9 – Courbe de l'activité par cellule A_{cel} en fonction du temps. Les numéros 1-5 indiquent les étapes de radiomarquage associées à chaque tronçon d'activité. 1 : Incubation ; 2-4 : lavages ; 5 : remise en suspension des cellules. Pendant la phase d'incubation, deux hypothèses ont été prises sur la forme de l'incorporation d'activité dans les cellules. Une augmentation linéaire (trait plein) ou basée sur les mesures expérimentales de caractérisation du marquage (pointillés bleus).

Dans un deuxième temps, un modèle plus réaliste de l'incorporation a été testé, en se basant sur les données de l'activité intra-cellulaire moyenne acquise dans l'étude préliminaire de caractérisation du radiomarquage. La courbe temps-activité sera présentée dans la partie résultat (§4.1.1). Brièvement, nous avons observé, pour une activité volumique de 20 MBq/mL, que l'activité incorporée, non corrigée de la décroissance, ne variait pas significativement entre 15 minutes et 60 minutes d'incubation. Dans notre modèle, nous avons donc considéré une fonction constante entre ces deux temps, telle que $A_{cel} = A_{inc}$. Entre 0 et 15 minutes, en revanche, en l'absence de points expérimentaux, nous avons fait de nouveau l'hypothèse d'une augmentation linéaire de l'activité (cf. **équation 4.6**).

Le nombre de cellules dans un tube de marquage N_{cel} peut lui aussi être décomposé, en fonction du nombre de cellules total N_{tot} , du volume associé V_{tot} et du volume versé dans le tube de marquage $V_{aliquot}$.

$$N_{cel} = \frac{N_{tot}}{V_{tot}} \times V_{aliquot} \quad (4.8)$$

Le nombre de cellules total N_{tot} a été déterminé expérimentalement à l'aide d'une chambre de Malassez à partir d'un petit volume de suspension cellulaire. On peut écrire que :

$$N_{tot} = \frac{n}{V_n} \times V_{tot} \times F \quad (4.9)$$

avec n le nombre de cellules comptées dans le volume V_n , V_{tot} le volume total contenant la totalité des cellules et F le facteur de dilution. Le facteur F dépend lui-même des volumes prélevés pour réaliser la dilution.

Pour les phases consécutives à la phase d'incubation 2-5, l'activité dans les cellules peut s'écrire :

$$\text{Phase 2-5 } (t_{inc} < t < +\infty) : A_{cel}(t) = A_{inc} \times \exp\left(\frac{-\ln(2)}{T_p} \cdot \delta T_\infty\right) \times s(t) \quad (4.10)$$

avec δT_∞ la durée de décroissance entre A_{inc} et $A_{cel}=0$ et $s(t)$ une composante caractérisant la stabilité du marquage. Dans l'hypothèse où il n'y a pas de relargage de l'activité dans le milieu, la composante stabilité est constante et égale à 1.

En revanche, si l'éluion est prise en compte, ce facteur peut être défini à partir des données expérimentales de stabilité obtenues lors de la caractérisation du marquage (cf. partie Résultats, §4.1.2). Une régression linéaire a été appliquée aux mesures de stabilité en fonction du temps telle que :

$$s(t)(\%) = a \times t + b \quad (4.11)$$

Les paramètres d'ajustement obtenus sont ($a=-4,52 \cdot 10^{-5} \pm 1,45 \cdot 10^{-5}$; $b=9,26 \cdot 10^{-1} \pm 5,54 \cdot 10^{-2}$) pour les JURKAT, et ($a=-7,52 \cdot 10^{-5} \pm 6,84 \cdot 10^{-6}$; $b=8,59 \cdot 10^{-1} \pm 2,59 \cdot 10^{-2}$) pour les adCSM.

Facteur S^{auto} . Le calcul des facteurs S dépend principalement du radionucléide, du modèle géométrique et du mode de calcul utilisé.

Pour cette application, le facteur S^{auto} a été déterminé par simulation Monte-Carlo (MCNP6), suivant les méthodes décrites dans les chapitres 2 et 3. Un modèle standard de géométrie sphérique a été considéré, le noyau et le cytoplasme étant définis comme respectivement la région cible et la région source.

Le calcul a été réalisé pour plusieurs dimensions de cellules, en considérant un rapport volumique moyen du noyau par rapport à la cellule entière représentatif des deux types cellulaires étudiés de 0,63 pour les cellules JURKAT ($0,62 \pm 0,126$) et pour les adCSM ($0,63 \pm 0,09$) comme estimé expérimentalement par Feng *et al.* et Starr *et al.* (226, 227). Nous avons repris cette valeur pour le calcul des facteurs S^{auto} .

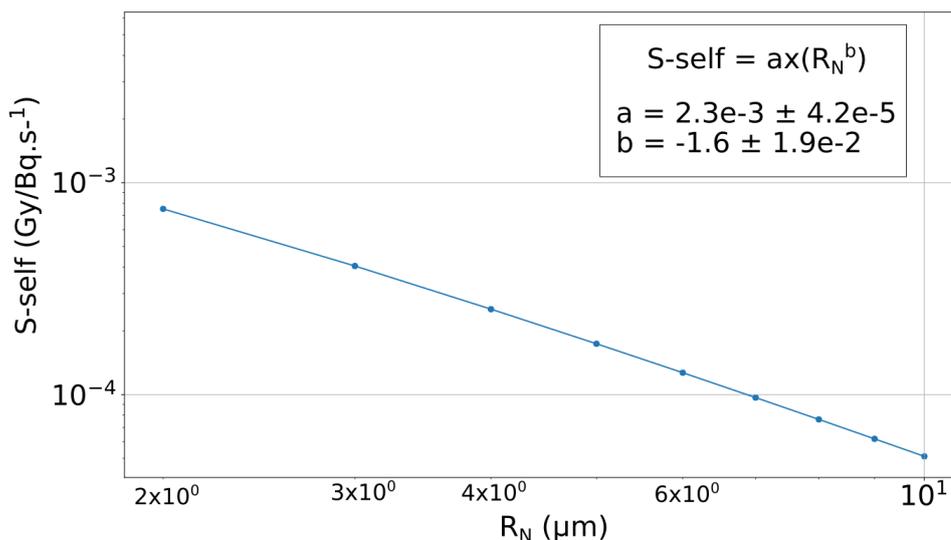


FIGURE 4.10 – Facteurs S^{auto} en fonction du rayon du noyau en échelle log-log, pour un modèle sphérique de cellule de densité unitaire.

Une courbe du facteur S^{auto} versus le rayon du noyau R_N a été construite et est présentée **figure 4.10**.

Les données ont été ajustées à une fonction de la forme :

$$S^{auto} = a \times R_N^b \quad (4.12)$$

avec a et b les paramètres d'ajustement.

Expérimentalement, nous avons mesuré le rayon total des cellules JURKAT et des adCSM pour un échantillon de $n=100$ cellules. Pour cela, l'acquisition d'images a été réalisée avec un microscope optique avec les cellules sur lame de malassez, au moment de la numération des cellules. Le logiciel de traitement d'images Histolab a ensuite été utilisé pour faire la mesure des rayons R_c .

Nous avons obtenu : $R_c = 6,7 \pm 0,85 \mu\text{m}$ pour les JURKAT, $R_c = 9,7 \pm 1,18 \mu\text{m}$ pour les adCSM.

Le rayon nucléaire a été estimé à partir de ces valeurs et du rapport volumique noyau/cellule de 0,63 sélectionné précédemment. D'après l'équation 4.12, les dimensions cellulaires correspondent à des facteurs S^{auto} de $1,40 \cdot 10^{-4}$ et $7,1 \cdot 10^{-5} \text{ Gy/Bq.s}^{-1}$.

Incertitudes. Les relations mathématiques établies pour chaque composante de l'auto-absorption ont permis de mettre en évidence les grandeurs d'influence nécessaires pour la caractérisation des incertitudes. Celles-ci sont représentées dans un diagramme de causes et effets **figure 4.11** illustrant la propagation de l'incertitude au travers des différentes grandeurs d'influence de l'auto-absorption.

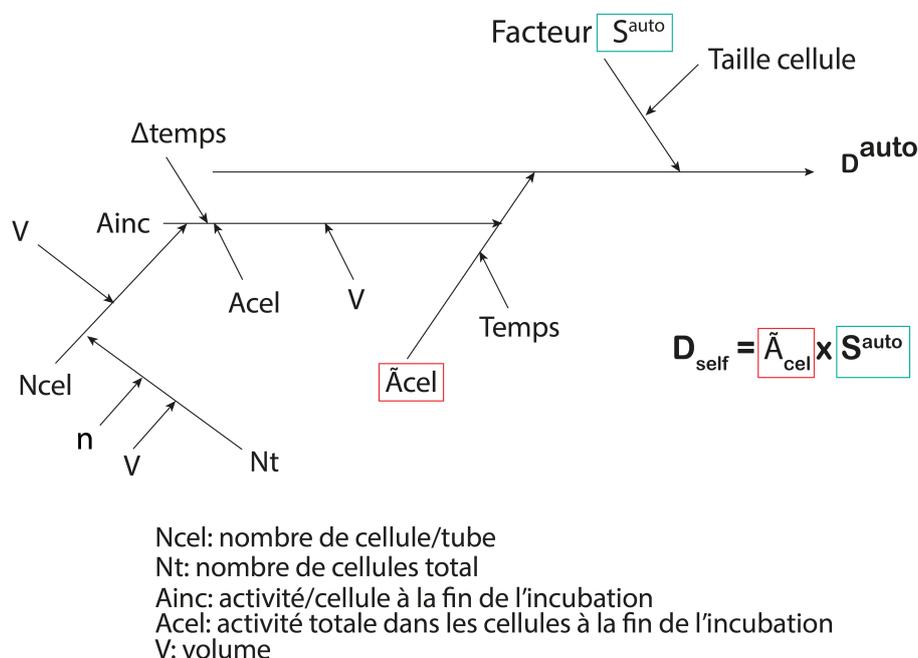


FIGURE 4.11 – Calcul des incertitudes-types. Diagramme de causes et effets illustrant la propagation de l'incertitude au travers des différentes grandeurs d'influence de l'auto-absorption.

Les incertitudes associées au paramètre volume ont été estimées par la méthode d'incertitude B à partir des caractéristiques de chaque instrument de mesure fournies par le fabricant, telles que la précision, l'exactitude, la sensibilité, la tolérance, etc. La loi uniforme a été considérée pour calculer l'incertitude-type. Concernant le facteur S^{auto} , une relation a été établie en fonction de la taille du noyau de la cellule. L'erreur sur les paramètres d'ajustement de la courbe empirique, **figure 4.10**, étant très faibles ($<1\%$), seule l'incertitude-type sur la taille des cellules a été considérée pour le calcul de l'incertitude composée du facteur S^{auto} . Comme dit précédemment, la mesure expérimentale de la moyenne et de l'écart-type du rayon total des cellules a été effectuée à partir d'un échantillon de $n=100$ cellules.

L'incertitude associée, calculée avec la méthode statistique, est alors égale à :

$$U(R_c) = k \cdot \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}} \quad (4.13)$$

avec σ_{n-1} l'écart-type expérimental, n le nombre d'échantillon, et k le facteur d'élargissement. Selon la loi statistique de Student, pour un échantillon de $n=100$, le facteur d'élargissement k vaut également 1,96 pour un niveau de confiance de 95%.

Par ailleurs, les incertitudes liées à la représentativité de la géométrie des cellules et au rapport de volume noyau/cellule ont été négligées dans notre étude.

Un résumé des méthodes utilisées pour calculer les incertitudes-types associées à chaque variable est montré dans le **tableau 4.7**.

Tableau 4.7 – Calcul des incertitudes-types. Tableau récapitulatif des grandeurs d'entrée et leur incertitude-type associée à partir desquelles l'incertitude finale sur l'auto-absorption sera estimée. (1) $\delta(\%)$ donnée par le fabricant. (2) Pour une micropipette, les données de précision et exactitude sont données. Pour une même grandeur, les incertitudes types se composent alors de manière quadratique. (3) Sensibilité donnée par le constructeur. Le facteur d'élargissement a été fixé à $k=1,96$, pour définir un intervalle de confiance de 95%.

Variable X	Méthode d'incertitude	Incertitude u(X)
n	Loi de poisson	$k \cdot \sqrt{n}$
V <i>Cas d'une pipette graduée</i> <i>Cas d'une chambre de malassez</i>	Loi rectangle	$k \cdot \frac{\delta(\%) \times V}{\sqrt{3}}$ (1)
V <i>Cas d'une micropipette</i>	Loi rectangle	$k \cdot \sqrt{\left(\frac{\text{precision}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{\text{exactitude}}{\sqrt{3}}\right)^2}$ (2)
A_m	Loi normale	$k \cdot \frac{\text{sensibilite}}{3}$ (3)
R_c	Statistique	$k \cdot \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$

3.2.2 Tir croisé

Pour évaluer le tir croisé reçu par les cellules en moyenne lors du radiomarquage, la méthode basée sur les fonctions de distribution radiale *rdf* (cf. Chapitre 3) a été utilisée.

Le tir croisé peut alors s'écrire :

$$D^{croisé} = \int_t dt \cdot A_{cel}(t) \cdot 4\pi\rho(t) \int_r dr \cdot S(r) \cdot r^2 \cdot F(r) \cdot g(r) \quad (4.14)$$

avec A_{cel} l'activité dans une cellule ; ρ la densité cellulaire ($/\text{cm}^3$) ; $S(r)$, en $\text{Gy}/\text{Bq} \cdot \text{s}^{-1}$, le facteur S pour une paire de cellule séparée de la distance r ; $g(r)$ la fonction de distribution radiale et $F(r)$ la fonction de correction pour la prise en compte des effets de bords.

Le calcul de l'activité cumulée \tilde{A}_{cel} a été détaillé dans le paragraphe 3.2.1. Le paramètre densité cellulaire en revanche est spécifique au tir croisé. Celui-ci varie également au cours de la procédure en raison des étapes successives de centrifugation et de remise en suspension des cellules. La **figure 4.12** montre l'évolution de ce paramètre au cours du temps et les configurations géométriques associées.

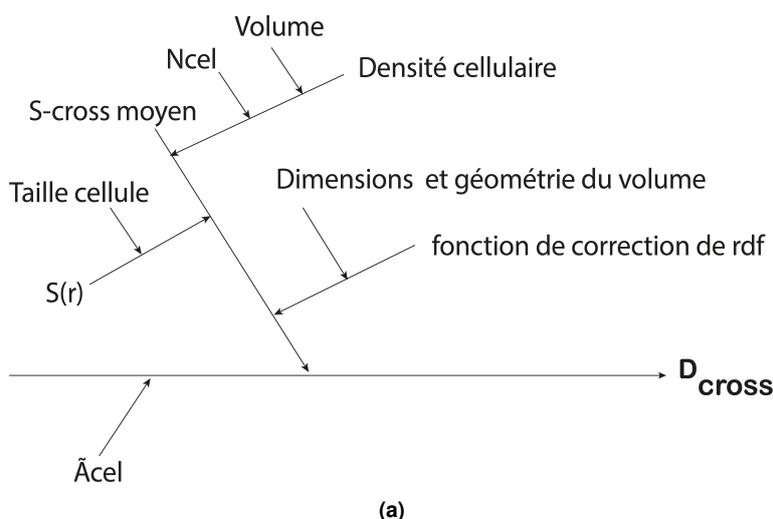
avec V_{culot} le volume du culot, que l'on peut expliciter ainsi :

$$V_{culot} \approx N_{cel} \times \frac{R_c^3}{compacité} \tag{4.16}$$

avec N_{cel} le nombre de cellules, R_c le rayon moyen d'une cellule. Scott *et al.* (228) ont estimé la compacité limite d'un empilement aléatoire de sphères égale à $0,637 \pm 0,001$. Cette valeur de compacité a été considérée pour nos calculs.

Pour les deux modèles, étant donné les ordres de grandeurs des dimensions de volume d'étude considérés, en accord avec les résultats du chapitre précédent, les distributions cellulaires ont pu être approximées par des distributions idéales uniformes ($g(r)=1$).

Enfin, les facteurs $S(r)$ reflètent la dose absorbée par une cellule d'une source placée à une distance r dans une autre cellule ; indépendamment de la configuration spatiale des cellules et de la densité du modèle. Ces facteurs ont été calculés par simulation Monte-Carlo avec le code MCNP6 pour des tailles de cellules fixées à $R_n=6 \mu\text{m}$, $R_c=7 \mu\text{m}$ pour les JURKAT et $R_n=9 \mu\text{m}$, $R_c=10 \mu\text{m}$ pour les adCSM.



Variable X	Type d'incertitude	Incertitude $u(X)$
R_{culot} (cm)	Loi rectangle	$\frac{d/2}{\sqrt{3}} = \frac{d}{\sqrt{12}}$ (1)
H_s (cm)	Loi rectangle	$\frac{d}{\sqrt{12}}$ (1)
Compacité	-	neg
$S(r)$	-	neg

(b)

FIGURE 4.13 – Calcul des incertitudes-types. (a) Diagramme de causes et effets pour le tir croisé. (b) Tableau récapitulatif des grandeurs d'entrée et leur incertitude-type associée. (1) d correspond à la plus petite graduation de l'instrument de mesure (1 mm dans notre cas).

Incertitudes. Les grandeurs d'entrée du tir croisé sont résumées **figure 4.13 (a)**. Le tableau de la **figure 4.13 (b)** présente les incertitudes-types des grandeurs spécifiques au calcul du tir croisé.

Pour le rayon du culot R_{culot} et hauteur du culot H_s , les valeurs de facteurs $S(r)$ dépendent davantage de la distance de la paire de cellules considérée que des dimensions des cellules.

Nous avons vérifié au préalable, pour plusieurs dimensions de cellules autour des valeurs moyennes des JURKAT et adCSM, que l'impact sur le $S^{croisé}$ moyen pouvait être considéré comme négligeable.

3.2.3 Dose non-spécifique provenant du milieu

La dose non-spécifique provenant de l'activité distribuée dans le milieu extra-cellulaire (*i.e.*, dans le volume de marquage) est délivrée lors des étapes 1 et 2 du radiomarquage, lors de l'incubation des cellules avec le ^{18}F -FDG puis au moment de la première centrifugation. On peut considérer que l'activité est répartie uniformément dans le milieu extra-cellulaire. Ainsi, pour le calcul de cette contribution, une dosimétrie conventionnelle a simplement été appliquée, telle que :

$$D_{milieu}^i = \tilde{A}_{milieu}^i \times S_{milieu}^i \quad (4.17)$$

avec \tilde{A}_{milieu} l'activité cumulée dans le milieu extra-cellulaire, S_{milieu} la dose moyenne déposée dans les cellules pour une désintégration et l'indice i la phase associée.

Le code Monte-Carlo MCNP6 a été utilisé pour calculer les facteurs S_{milieu}^i , à partir des deux modèles géométriques présentés sur la **figure 4.14**.

Dans la phase d'incubation, compte tenu du faible volume total occupé par les cellules par rapport au volume total de marquage (<0,05%), celles-ci n'ont pas été modélisées. Le facteur S_{milieu}^1 correspond alors à la dose auto-absorbée par le volume de marquage pour une activité répartie uniformément dans tout le volume, pour une désintégration.

Dans la phase de centrifugation, un cylindre de hauteur égale à 0,04 cm et de rayon égal à 0,3 cm au fond du tube a été considéré pour modéliser le culot cellulaire. Pour calculer le facteur S_{milieu}^2 , l'activité a été répartie dans tout le volume de milieu extra-cellulaire et l'énergie déposée dans le culot cellulaire a été considérée.

$$S_{milieu}^1 \prec \frac{E_t}{m_t} \quad (4.18)$$

$$S_{milieu}^2 \prec \frac{E_{culot}}{m_{culot}} \quad (4.19)$$

où E_t et E_{culot} représentent les énergies déposées respectivement dans le volume total et dans le culot

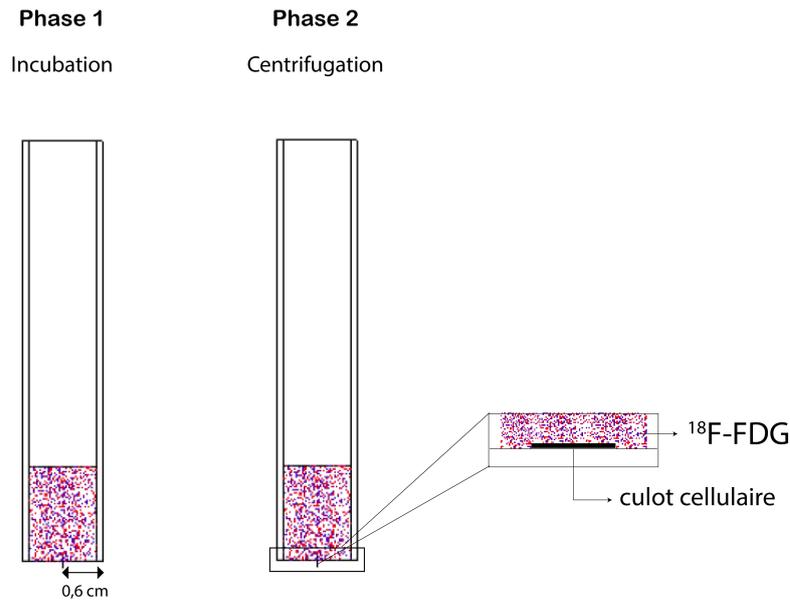


FIGURE 4.14 – Modélisation du tube de marquage avec le code de simulation MCNP6 pour le calcul du facteur S_{milieu} dans les deux premières phases du radiomarquage 1 (incubation) et 2 (centrifugation).

cellulaire.

Par ailleurs, l'activité cumulée dans le milieu peut être exprimée en fonction de l'activité cumulée totale dans le tube \tilde{A}_t et l'activité dans les cellules :

$$\tilde{A}_{milieu} = \tilde{A}_t - N_{cel} \times \tilde{A}_{cel} \quad (4.20)$$

avec N_{cel} le nombre de cellules et \tilde{A}_{cel} l'activité cumulée par cellule. De plus, l'activité cumulée totale dans le tube \tilde{A}_t est reliée à l'activité de la source mère $A_{mère}$, mesurée expérimentalement avec un activimètre, par :

$$\tilde{A}_t = A_{mère}/V_{mère} \times V_{aliquot} \times T_p/\ln(2) \times (1 - \exp(-\ln(2)/T_p \times T_{inc})) \quad (4.21)$$

avec $V_{aliquot}$ le volume d'activité ajouté dans un tube pour une condition de marquage, T_p la période physique du $^{18}\text{F-FDG}$, T_{inc} le temps d'incubation.

Incertitudes. L'incertitude-type de l'activité mère de $^{18}\text{F-FDG}$ ($A_{mère}$) a été estimée en se référant aux spécifications de calibration de l'activimètre utilisé (tolérance < 5%). L'incertitude sur le facteur S a été considérée comme négligeable. Les incertitudes-types des grandeurs d'influence du facteur S_{milieu} (volume ou masse) ont été évaluées dans les paragraphes précédents.

3.3 Applications

3.3.1 Calculs préliminaires

Le modèle dosimétrique a servi dans un premiers temps à la sélection des gammes d'activité de ^{18}F -FDG pour l'étude des effets biologiques *in vitro*, *i.e.*, 1,5-10,8 MBq/mL et 2,4-23 MBq/mL respectivement pour les JURKAT et les adCSM. Les activités ont été déterminées de façon à obtenir des doses absorbées dans les mêmes gammes de dose que celles utilisées pour les irradiations externes, soient 0,5-4 Gy et 1-10 Gy respectivement pour les JURKAT et les adCSM. Pour réaliser ces calculs préliminaires, nous avons considéré une augmentation linéaire de l'activité dans les cellules pendant la phase d'incubation et une rétention totale de l'activité dans les cellules. Le **tableau 4.8** récapitule les paramètres de marquages fixés pour le calcul et les gammes d'activité estimées.

Tableau 4.8 – Calculs préliminaires. Gammes de dose visées pour les JURKAT et adCSM et paramètres de marquage correspondants. ρ_{cel} = densité cellulaire ; T_{incub} = temps d'incubation ; V_m = volume de marquage ; T_{lavage} = temps de lavage ; Eff = efficacité ; Act. vol. = activité volumique. Les hypothèses de calcul considérées sont les suivantes : incorporation linéaire de l'activité dans les cellules, et rétention totale de l'activité après incorporation. (*) valeurs basées sur des mesures expérimentales réalisées lors d'expériences préliminaires de radiomarquage au ^{18}F -FDG.

	Doses (Gy)	Paramètres fixés					Paramètre estimé
		V_m (mL)	ρ_{cel} (/mL)	T_{incub} (min)	T_{lavage} (min)	Eff(*) (%)	Act. vol. (MBq/mL)
adCSM	0-1-2-5-10	1	$5 \cdot 10^6$	60	8	16	2,5-4,8-11,2-23
JURKAT	0-0,5-1-2-3-4	0,5	$5 \cdot 10^6$	60	8	6	1,5-2,8-5,1-8-10,8

3.3.2 Calcul des doses absorbées pour la corrélation aux différents tests fonctionnels

L'ensemble des étapes de calcul détaillé dans la partie 3.2 a été implémenté dans un programme Python (v2.7). Ce programme a été utilisé pour calculer spécifiquement la dose moyenne et l'incertitude associée à partir des paramètres de l'expérimentation (activité, volume, nombre de cellules, durée des étapes, etc). Comme décrit dans le protocole expérimental, des échantillons de cellules ont été fixés à 1h, 24h et 72h pour des immunomarquages ultérieurs. La procédure de fixation a impliqué de centrifuger de nouveau les cellules avant de les suspendre dans la solution de fixation.

Cette étape supplémentaire a été ajoutée au modèle dosimétrique pour estimer la dose absorbée à 1h post-marquage. Bien que les cellules continuent d'être irradiées une fois fixées, la dose délivrée associée n'aura plus d'impact sur celles-ci car leur activité métabolique est alors figée. De ce fait, la dose absorbée résiduelle au-delà de 1h n'a pas été prise en compte.

4 Résultats

4.1 Caractérisation du marquage

4.1.1 Efficacité de marquage

L'insuline est une hormone qui régule l'entrée du glucose dans les cellules. Nous avons voulu étudier, dans un premier temps, si son effet était transposable au cas du ^{18}F -FDG pour les cellules JURKAT et adCSM. Les données de la littérature montrent un effet très variable selon le type cellulaire. Par exemple, Forstrom *et al.* (202) a montré que l'insuline était inefficace dans le cas du marquage de leucocytes, tandis que Paik J *et al.* et Meier *et al.* ont relevé un effet très favorable de l'insuline dans le cas du marquage de monocytes et de cellules dites "tueuses naturelles" (NK), avec une augmentation de l'efficacité respectivement de 169% et 62% à 10 UI/mL (229, 65). Dans notre étude, plusieurs concentrations d'insuline allant de 1 à 20 UI/mL ont été testées pour les JURKAT et les adCSM.

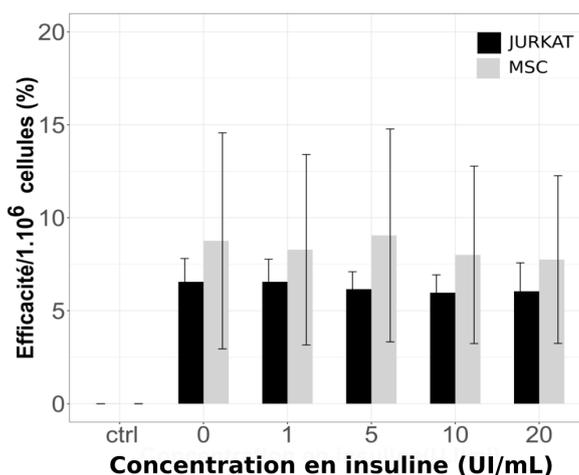


FIGURE 4.15 – Caractérisation du marquage. Effet de la concentration d'insuline sur l'efficacité de marquage normalisée à 1.10^6 de cellules. Chaque point indique la moyenne \pm écart-type pour $n=9$.

Comme le montre la **figure 4.15**, nous n'avons pas observé d'accroissement de l'incorporation du FDG dans les cellules lié à la présence d'insuline. En effet, pour toutes les concentrations d'insuline étudiées (1-20 UI/mL), les valeurs d'efficacité ne sont pas significativement différentes de celle de l'échantillon sans insuline. Ces résultats confirment le caractère cellule-dépendant de l'effet de l'insuline.

Pour évaluer l'effet de la densité cellulaire sur l'efficacité de marquage, un nombre croissant de cellules JURKAT a été incubé avec 20 MBq/mL de ^{18}F -FDG. Dans ces conditions, une augmentation linéaire de l'efficacité absolue en fonction de la densité cellulaire a été observée (**figure 4.16, A**). Cette corrélation

linéaire est liée à l'augmentation du nombre de cellules dans le volume de marquage captant le ^{18}F -FDG. En revanche, l'efficacité normalisée à 1.10^6 cellules ne varie pas significativement entre 2.10^6 ($6,7\pm 0,9\%$) et 5.10^6 ($7,2\pm 1,1\%$) puis diminue légèrement bien que significativement à 1.10^7 cellules/mL ($5,7\pm 0,4\%$) (**figure 4.16, B**). Autrement dit, à 1.10^7 cellules/mL, chaque cellule capte en moyenne un peu moins d'activité, suggérant une disponibilité limitée du ^{18}F -FDG pour la concentration étudiée (20 MBq/mL).

JURKAT

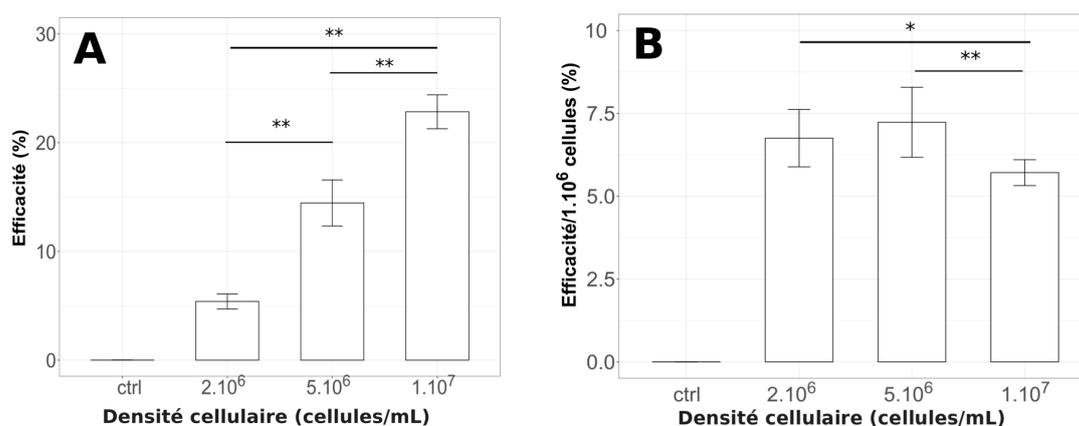


FIGURE 4.16 – Caractérisation du marquage. Effet de la densité cellulaire sur l'efficacité de marquage globale (A) et normalisée à 1.10^6 de cellules (B). ctrl = contrôle. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,001$; N=9.

La **figure 4.17** présente les valeurs d'activité et d'efficacité normalisées à 1.10^6 de cellules pour différentes conditions d'activités volumiques (5, 10, 20 et 40 MBq/mL). Les résultats mettent en évidence une proportionnalité entre l'activité contenue dans les cellules et l'activité volumique. En revanche, les valeurs d'efficacité, reflétant le taux d'activité contenue dans les cellules par rapport à la quantité totale d'activité, ne varient pas significativement avec l'activité volumique pour les deux types cellulaires ($p > 0,5$). Des valeurs moyennes d'efficacité de 9,2, 8,9, 8,1 et 8 % ont été mesurées pour les JURKAT, contre 10,6, 11,4, 9,6 et 9,5 % pour les adCSM.

La confrontation des valeurs absolues d'efficacité de marquage obtenues avec celles de la littérature est difficile, les conditions expérimentales (temps d'incubation, nombre de cellules, activité volumique, type cellulaire) étant variables d'une étude à l'autre. Une valeur de 2% d'efficacité pour 10 000 cellules et un temps d'incubation de 100 minutes avait été mesurée pour des cellules souches mésenchymateuses marquées au ^{18}F -FDG (85). Pour des cellules souches hématopoïétiques, des efficacités variant entre 46%–95% pour un nombre de cellules inconnu et une incubation de 40 minutes (13) et 5,6% pour 10 000 cellules (230) et 45 minutes d'incubation ont été mesurées. Pour les lymphocytes T, Botti *et al.* (87) ont mesuré une efficacité de marquage au ^{18}F -FDG de 68% pour $2,5.10^8$ cellules et 30 minutes d'incubation. Par ailleurs, il n'est

pas possible de normaliser ces valeurs d'efficacité à un nombre de cellules pour faciliter la comparaison, étant donné la potentielle interaction entre les effets de l'activité volumique et de la densité cellulaire sur la quantité d'activité incorporée dans les cellules (cf. **figure 4.16**).

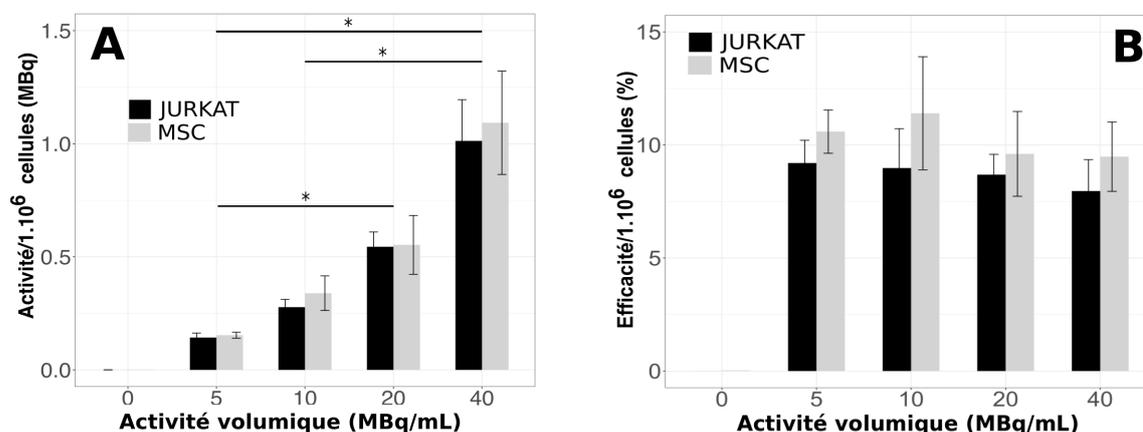


FIGURE 4.17 – Caractérisation du marquage. Effet de l'activité volumique sur (A) l'activité incorporée dans les cellules et (B) sur l'efficacité de marquage après 60 minutes d'incubation. Les données ont été normalisées à 1.10^6 de cellules. * $p < 0,05$, $n = 9$.

Enfin la cinétique d'incorporation de l'activité dans les cellules a été caractérisée sur une période de 150 minutes. Pour cette étude, une activité volumique de 20 MBq/mL a été fixée. Les résultats, présentés **figure 4.18 B**, montrent une augmentation continue de l'efficacité de marquage, corrigé de la décroissance, sur toute la période d'incubation jusqu'à 150 minutes, avec une rapidité plus importante les 45 premières minutes d'incubation.

Pour les deux types cellulaires, des différences significatives ont été mesurées entre l'efficacité de marquage à 15 minutes et 60 minutes ($p < 0,01$), et à 150 minutes et tous les temps antérieurs ($p < 0,001$). La courbe activité-temps sans correction de la décroissance est représentée **figure 4.18 A**. On observe que l'activité se stabilise très rapidement, autour des 15 minutes d'incubation, pour les deux types de cellules.

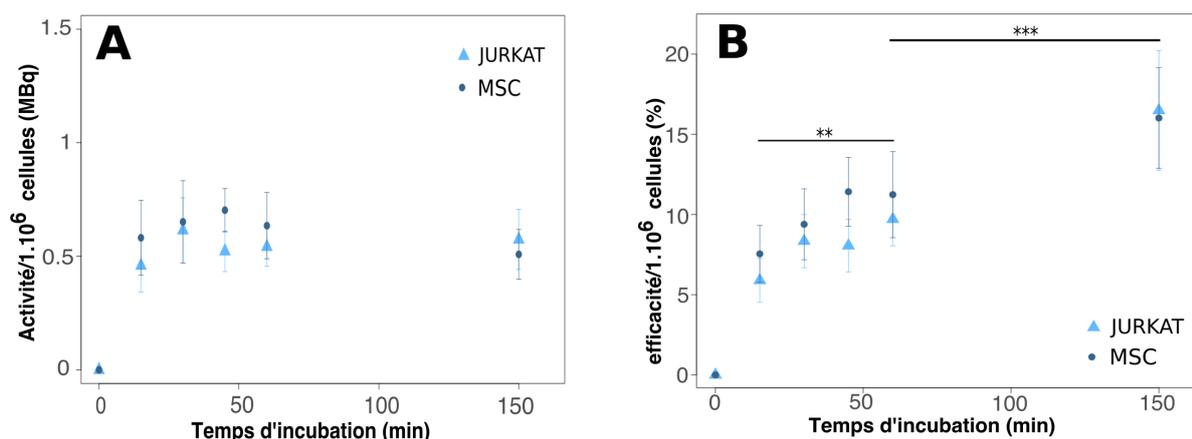


FIGURE 4.18 – Caractérisation du marquage. Cinétique d'incorporation du ¹⁸F-FDG dans les adCSM et JURKAT : (A) Activité mesurée dans les cellules normalisée à 1.10⁶ cellules, non corrigée de la décroissance radioactive, en fonction du temps d'incubation. (B) Efficacité de marquage normalisée à 1.10⁶ cellules et corrigée de la décroissance, en fonction du temps d'incubation. **p<0,001 ; ***p<0,0001. n=9.

4.1.2 Stabilité du marquage

Le processus d'éluion du ¹⁸F-FDG est visible sur la **figure 4.19**, avec un pourcentage de rétention qui diminue linéairement au cours du temps pour les deux types cellulaires. La perte d'activité a été significativement plus importante pour les adCSM que pour les cellules JURKAT. Les résultats montrent en effet que $84 \pm 8\%$ de l'activité incorporée dans les cellules JURKAT à la fin du radiomarquage est retenue dans les cellules après 90 minutes, contre $47 \pm 2\%$ pour les adCSM. Pour les JURKAT, des différences significatives ont été trouvées entre le temps T0 et tous les autres temps, et entre 30 minutes et 90 minutes ($p < 0,01$). Pour les adCSM, des différences significatives ont été trouvées entre tous les points ($p < 0,001$).

Comme évoqué précédemment, le modèle linéaire de stabilité utilisé pour les calculs dosimétriques a été établi à partir de ces données.

Les résultats de caractérisation du marquage du ¹⁸F-FDG sur des cellules mésenchymateuses issus d'une précédente étude par Wolfs *et al.* (85) confirment des valeurs élevées d'éluion du FDG au cours du temps. Une stabilité moyenne semblable de 50% avait été calculée 90 minutes après la fin du radiomarquage. Par ailleurs, la rétention du FDG dans des lymphocytes-T de porcins avait été mesurée à 94% à 30 minutes et 77% à 120 minutes, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus pour les JURKAT (88).

La rétention du FDG peut dépendre de l'expression de certains gènes, de la taille de la cellule ou encore des activités des enzymes hexokinases et phosphatases (231). Ces éléments qui décrivent un processus essentiellement cellule-dépendant, pourraient être à l'origine des différences entre les valeurs de stabilités des adCSM et des JURKAT. Il est possible également qu'une partie de l'activité relarguée dans le milieu

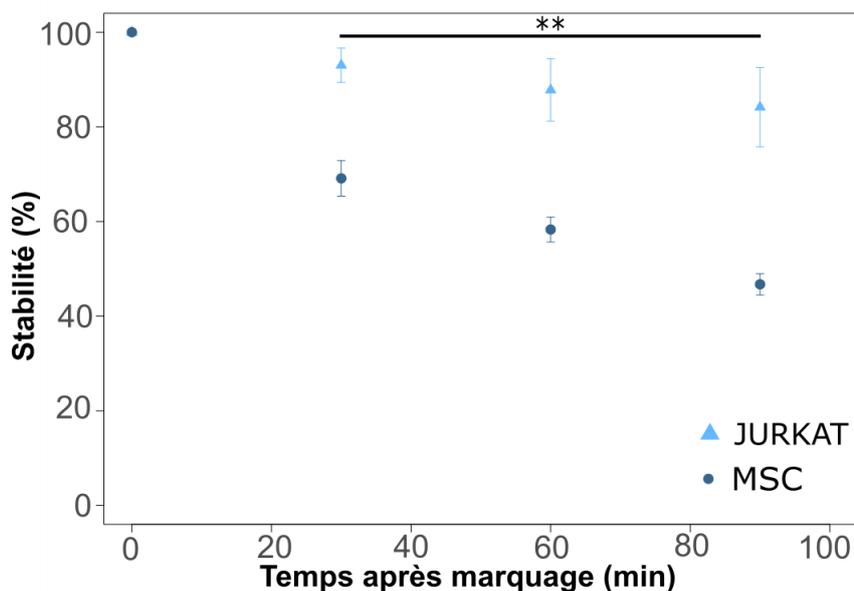


FIGURE 4.19 – Caractérisation du marquage. Rétention de l'activité dans les cellules suivant la période d'incubation (60 minutes), jusqu'à 90 minutes. ** $p < 0,001$

soit liée à une mortalité des cellules, du fait notamment que les cellules sont privées de glucose pendant une longue période (jusqu'à 150 minutes après la fin du radiomarquage). Cependant, cette hypothèse n'a pas été vérifiée dans cette série d'expériences.

4.1.3 Conclusion

Dans cette étude préliminaire, les paramètres pouvant influencer l'efficacité de marquage du ^{18}F -FDG et donc l'évaluation de la dose ont principalement été étudiés. Les résultats ont montré que la concentration en insuline et l'activité volumique n'avaient pas d'effet significatif sur l'efficacité de marquage. En revanche, l'efficacité de marquage est proportionnelle à la densité cellulaire et augmente avec le temps d'incubation. De plus, pour une activité volumique donnée, l'activité moyenne par cellule diminue à partir d'une certaine densité cellulaire qui dépend de l'activité initiale. Dans notre étude, pour une activité volumique de 20 MBq/mL, nous avons observé une diminution de l'activité moyenne par cellule à partir d'une densité cellulaire de $1 \cdot 10^7$ cellules/mL.

4.2 Calculs dosimétriques

4.2.1 Doses absorbées et incertitudes associées

Une évaluation dosimétrique précise a été réalisée, tenant compte des paramètres expérimentaux spécifiques à chaque radiomarquage, notamment l'efficacité, qui a varié de manière importante entre les différentes expériences, entre 2 et 7% pour les JURKAT et entre 11 et 34% pour les adCSM. Des intervalles de doses plus étendus que ceux prévus ont été obtenus, allant de $0,56 \pm 0,07$ à $7,87 \pm 1,27$ Gy pour les JURKAT ; de $1,67 \pm 0,27$ à $36,12 \text{ Gy} \pm 6,77$ Gy pour les adCSM.

La dose absorbée moyenne au noyau cellulaire, les trois contributions qui la composent et leurs incertitudes associées sont présentées dans les **tableaux 4.9** et **4.10**, en fonction de l'activité volumique initiale, de la densité cellulaire initiale et de l'efficacité de marquage.

Une comparaison de ces valeurs de doses avec celles obtenues avec le modèle dosimétrique simplifié, *i.e.*, avec une incorporation linéaire de l'activité dans les cellules et une rétention totale de l'activité dans les cellules, a montré des différences très faibles (<1%) (cf. Annexe 3, §1). Cela signifie que les hypothèses de modèles considérées ont eu peu d'impact sur l'estimation de la dose moyenne absorbée aux cellules.

La caractérisation des sources de variabilité impliquées dans la procédure de radiomarquage a permis d'aboutir, en suivant la méthode analytique du GUM, à la détermination de la dose absorbée moyenne et son incertitude associée, dans un intervalle de confiance de 95%, pour les trois contributions de dose (auto-absorption, tir croisé, dose non-spécifique) et la dose absorbée totale. Les écarts de doses relatifs sur la dose absorbée totale varient entre 11 et 16% pour les JURKAT et 16% et 19% pour les adCSM. Parmi les trois contributions de dose, les résultats montrent que les incertitudes sont les plus élevées pour la dose auto-absorbée, atteignant 50%. Les incertitudes associées au tir croisé sont de 18% en moyenne et entre 3% et 18% pour la dose non-spécifique.

Tableau 4.9 – JURKAT. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ^{18}F -FDG. Chaque grandeur X est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. Les paramètres d'entrée spécifiques à chaque expérimentation : activité volumique, densité cellulaire initiale (ρ) et efficacité de marquage normalisée à 1.10^6 cellules/mL sont indiquées.

	N° exp.	A_i (MBq/mL)	Eff/1e6 cellules (%)	ρ (cellules/mL)	\bar{D}^{auto} (Gy)	$\bar{D}^{croisé}$ (Gy)	\bar{D}^{milieu} (Gy)	\bar{D}_{tot}
JURKAT	1	1,60±0,21	2,02±0,45	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,04±0,02	0,35±0,06	0,17±0,02	0,56±0,07
		2,80±0,21	2,25±0,44	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,08±0,04	0,70±0,2	0,30±0,02	1,06±0,14
		5,10±0,21	2,13±0,40	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,14±0,07	1,22±0,22	0,54±0,02	1,88±0,25
		8,08±0,22	2,16±0,40	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,22±0,10	1,98±0,34	0,84±0,03	3,02±0,39
		10,9±0,24	1,52±0,28	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,20±0,10	1,90±0,33	1,15±0,03	3,22±0,38
JURKAT	2	1,50±0,14	4,20±0,86	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,08±0,04	0,68±0,12	0,15±0,02	0,90±0,14
		2,80±0,14	4,56±0,86	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,16±0,08	1,38±0,24	0,27±0,02	1,81±0,28
		5,0±0,14	4,36±0,80	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,27±0,14	2,36±0,40	0,48±0,02	3,11±0,47
		8,0±0,16	4,68±0,86	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,46±0,23	4,06±0,71	0,76±0,02	5,29±0,81
		10,8±0,18	3,76±0,69	$4,6.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,50±0,25	4,42±0,77	1,06±0,02	5,98±0,89
JURKAT	3	1,50±0,14	5,65±1,15	$4,8.10^6 \pm 0,8.10^6$	0,10±0,05	1,02±0,17	0,14±0,02	1,26±0,20
		2,80±0,14	6,29±1,17	$4,8.10^6 \pm 0,8.10^6$	0,22±0,11	2,10±0,36	0,25±0,02	2,56±0,40
		5,0±0,15	5,59±1,01	$4,8.10^6 \pm 0,8.10^6$	0,35±0,17	3,27±0,56	0,46±0,02	4,07±0,64
		8,0±0,17	7,07±1,27	$4,8.10^6 \pm 0,8.10^6$	0,70±0,35	6,49±1,11	0,68±0,03	7,87±1,27
		10,8±0,19	5,17±0,97	$4,8.10^6 \pm 0,8.10^6$	0,69±0,35	6,10±1,04	1,0±0,03	7,79±1,20

Tableau 4.10 – adCSM. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ^{18}F -FDG. Chaque grandeur X est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. Les paramètres d'entrée spécifiques à chaque expérimentation : activité volumique, densité cellulaire initiale (ρ) et efficacité de marquage normalisée à 1.10^6 cellules/mL sont indiquées.

	N° exp.	A_i (MBq/mL)	Eff/1e6 cellules (%)	ρ (cellules/mL)	\bar{D}^{auto} (Gy)	$\bar{D}^{croisé}$ (Gy)	\bar{D}^{milieu} (Gy)	\bar{D}_{tot}
adCSM	1	2,9±0,33	11,03±2,62	$3,7.10^6 \pm 0,6.10^6$	0,08±0,04	1,36±0,26	0,23±0,04	1,67±0,27
		4,80±0,34	10,92±2,23	$3,8.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,17±0,08	2,71±0,50	0,45±0,04	3,32±0,54
		11,20±0,41	11,17±2,17	$3,8.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,40±0,18	6,50±1,21	1,03±0,05	7,93±1,29
		23±0,65	15,76±3,03	$3,8.10^6 \pm 0,7.10^6$	1,5±0,54	19,02±1,54	1,92±0,07	22,09±3,77
adCSM	2	2,41±0,44	32,91±9,00	$3,8.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,25±0,12	3,70±0,72	0,15±0,05	4,09±0,77
		4,79±0,44	33,77±7,49	$3,8.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,51±0,24	7,56±1,47	0,28±0,05	8,36±1,58
		11,20±0,50	31,39±6,45	$3,8.10^6 \pm 0,7.10^6$	1,11±0,52	16,42±3,19	0,71±0,06	18,24±3,42
		23±0,70	30,39±6,11	$3,8.10^6 \pm 0,7.10^6$	2,19±1,03	32,43±6,30	1,49±0,11	36,12±6,77
adCSM	3	2,36±0,40	20,88±5,47	$4,2.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,16±0,07	2,28±0,43	0,18±0,05	2,62±0,47
		4,79±0,41	19,93±4,29	$4,3.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,30±0,14	4,36±0,82	0,38±0,05	5,03±0,89
		10,99±0,46	18,67±3,74	$4,2.10^6 \pm 0,7.10^6$	0,65±0,30	9,53±1,80	0,90±0,06	11,08±1,94
		22,47±0,66	15,96±3,16	$4,2.10^6 \pm 0,7.10^6$	1,14±0,53	16,73±3,16	1,95±0,08	19,82±3,40

Contributions à la dose. Comme le montre le **tableau 4.11** pour une expérience représentative, la contribution du tir croisé est majoritaire. Dans le cas du radiomarquage des cellules JURKAT, celle-ci atteint en moyenne 80%, contre 12 % pour la contribution du milieu et seulement 8% pour la dose auto-absorbée. Pour les adCSM, le pourcentage de tir croisé atteint 86% en moyenne, tandis que les contributions de la dose provenant du milieu et l'auto-absorption sont respectivement de 8% et 6%.

Tableau 4.11 – Pourcentages de contribution des composantes de la dose absorbée moyenne aux cellules. (a) JURKAT (exp n°3), (b) adCSM (exp n°3).

(a)			
\bar{D}_{tot}	Auto-absorption (%)	Tir croisé (%)	Non-spécifique (milieu) (%)
1,3	7,2	80,0	12,0
2,5	7,5	81,5	11,0
4,0	7,7	79,7	12,4
7,8	8,1	81,9	10,0
7,7	8,0	77,8	14,1

(b)			
\bar{D}_{tot}	Auto-absorption (%)	Tir croisé (%)	Non-spécifique (milieu) (%)
1,7	6,1	87,0	6,9
3,3	6,0	86,7	7,6
7,9	5,9	86,0	8,1
22,0	5,8	84,4	9,8

Sources d'incertitude. Pour mesurer la contribution des principales sources d'incertitude dans la dispersion finale des valeurs de dose absorbée, nous avons effectué des calculs de dose en fixant à zéro l'incertitude associée à chacune des sources considérées. Des calculs ont été réalisés en retirant du calcul successivement la variabilité associée (1) au nombre de cellules, (2) à la taille des cellules, (3) aux volumes prélevés, et finalement (4) aux activités. Les résultats sont présentés dans le **tableau 4.12**.

Source éliminée	\bar{D}_{tot}	U(\bar{D})
-	22,09	3,77
Nombre de cellules/tube	22,09	1,70
Volume	22,09	3,21
Taille des cellules	22,09	3,74
Activité	22,09	3,77

Tableau 4.12 – Sources d'incertitude. Effet de l'élimination de différentes sources de variabilité sur la dose absorbée totale aux cellules. Les calculs ont été réalisés à partir des données d'entrée de l'expérience n°3 (cf. **tableau 4.10**).

La prise en compte dans le calcul du nombre de cellules moyen, sans l'incertitude associée entraîne une

diminution de l'incertitude sur la dose absorbée totale d'un facteur 2,2, passant de 3,77 Gy à 1,70 Gy. La diminution de l'incertitude a été moins importante en enlevant la variabilité des volumes (3,77 Gy à 3,21 Gy). Enfin, en retirant la variabilité associée à la taille des cellules ou l'activité, la diminution de l'incertitude finale a été minime ou nulle.

Ces résultats montrent que l'estimation du nombre de cellules est un des paramètres ayant le plus d'incidence sur l'incertitude globale associée à la dose absorbée. Cela s'explique par le fait que l'activité intracellulaire (MBq/mL) moyenne dont dépendent beaucoup l'auto-absorption et le tir croisé est calculée en divisant l'activité totale dans un tube par le nombre de cellules, sous l'hypothèse d'une distribution uniforme de l'activité dans les cellules. Plus largement, le tir croisé étant la contribution majoritaire de la dose absorbée, les paramètres affectant l'activité intracellulaire ou le facteur moyen $S^{croisé}$ sont les plus susceptibles d'augmenter l'incertitude.

Corrélation dose absorbée-effets. Les doses absorbées présentées dans les **tableaux 4.9** et **4.10** ont été utilisées pour établir une corrélation avec la survie clonogénique et les données γ H2AX à 24h et 72h post-marquage. Comme nous avons vu dans la partie méthodologie (5.3.2), pour la corrélation avec les données γ H2AX à 1h, un calcul spécifique a été réalisé en ajoutant une étape supplémentaire de centrifugation des cellules à 1h. Le **tableau 4.13** montre les écarts pour une expérience représentative entre les doses induites par cette modification du modèle dosimétrique. Bien que le temps d'irradiation des cellules fixées à 1h soit plus court, le tableau montre que l'étape supplémentaire de centrifugation induit une augmentation de la dose absorbée par rapport à la dose totale, d'un facteur 1,2. Ces écarts sont indépendants du type cellulaire et de la dose.

Tableau 4.13 – Différences entre la dose absorbée totale et la dose absorbée pour les échantillons fixés à 1h, comprenant une étape supplémentaire de centrifugation. Les résultats présentés sont issus de calculs de dose à partir des données d'entrée de l'expérience (exp n°3).

\bar{D}_{tot}	\bar{D}_{1h}	Ratio
1,3	1,5	1,2
2,6	3,0	1,2
4,1	4,7	1,2
7,9	9,2	1,2
7,8	9,1	1,2

4.2.2 Débit de dose

Pour mieux évaluer l'implication des différentes étapes du radiomarquage ^{18}F -FDG dans la dose délivrée aux cellules, nous avons également évalué la variation du débit de dose au cours du temps, telle que :

$$\dot{D}(t) = A_{cel}(t).S^{auto} + A_{cel}(t).S^{croisé}(t) + A_{milieu}(t).S^{milieu}(t) \quad (4.22)$$

La **figure 4.20** présente, pour une expérimentation représentative, le profil de débit de dose en fonction du temps et, pour chaque phase du radiomarquage identifiée, le pourcentage de la dose totale déposée.

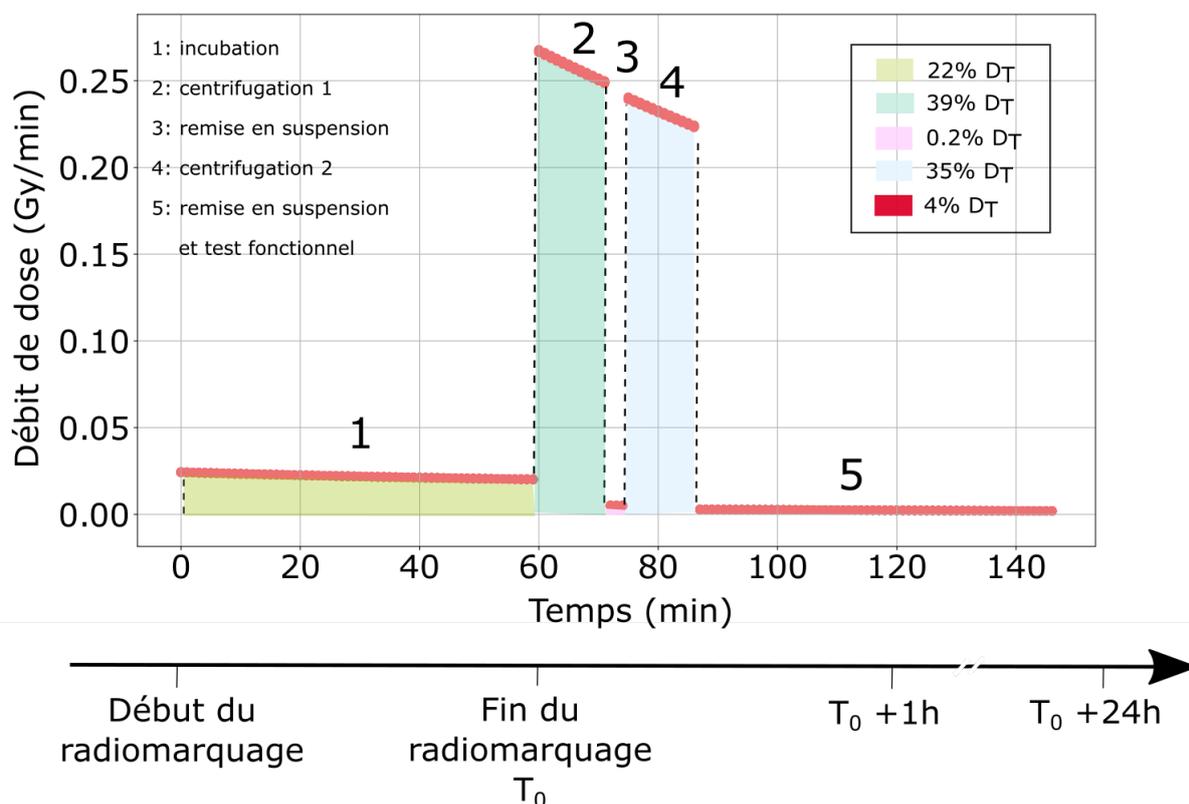


FIGURE 4.20 – Débit de dose associé au radiomarquage des cellules JURKAT au ^{18}F -FDG. Profil du débit de dose en fonction du temps le long de la procédure de radiomarquage, pour une expérience représentative à une activité initiale de 10,8 MBq, $5 \cdot 10^6$ cellules et une efficacité de 25%.

Les résultats montrent une variabilité importante du débit de dose au cours de la procédure de radiomarquage. Celle-ci est marquée par deux fortes augmentations du débit de dose au niveau des étapes 2 et 4, qui correspondent aux étapes de lavages des cellules. Ceci peut s'expliquer par la centrifugation des cellules qui se retrouvent alors compactées au fond du tube. Cela entraîne à la fois une forte augmentation de la densité cellulaire, qui contribue à l'augmentation du tir croisé, et une diminution considérable du volume d'étude qui contribue à faire baisser le tir croisé moyen en raison de l'échappement d'une partie de l'énergie des rayonnements en dehors du volume d'étude.

Cependant, l'effet de la réduction du volume est finalement relativement faible par rapport à celui liée à l'augmentation de la densité cellulaire. En effet, dans le cas des adCSM par exemple, sous les hypothèses de modèle d'un culot de géométrie cylindrique et d'une compacité maximale, la hauteur du culot vaut en moyenne 0,04 cm, ce qui reste deux fois plus grand que la portée moyenne du ^{18}F (0,2 cm).

Tableau 4.14 – Débit de dose associé au radiomarquage des cellules au ^{18}F -FDG. Valeurs moyennes de débit de dose sur les gammes d'activité utilisées pour les cellules (a) JURKAT et (b) adCSM.

(a)					
	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5
Débit de dose moyen (Gy/min)	$4,8 \cdot 10^{-3} - 0,02$	0,05 - 0,27	$9,5 \cdot 10^{-4} - 5,3 \cdot 10^{-3}$	0,04 - 0,24	$4,4 \cdot 10^{-4} - 2,47 \cdot 10^{-3}$
(b)					
	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5
Débit de dose moyen (Gy/min)	$4,71 \cdot 10^{-3} - 0,04$	0,10 - 0,71	$1,55 \cdot 10^{-3} - 0,01$	0,09 - 0,64	$5,21 \cdot 10^{-4} - 3,79 \cdot 10^{-3}$

Ainsi, globalement, dans cette configuration, une augmentation du tir croisé et, par la même, une augmentation du débit de dose global ont été obtenues (**figure 4.20**).

On observe que, lors de ces étapes d'une dizaine de minutes, environ deux tiers de la dose totale ont été déposés, contre 22% (dans l'exemple illustrée **figure 4.20**) lors de la période d'incubation des cellules avec le ^{18}F -FDG, qui représente pourtant l'étape la plus longue de la procédure (1h). Par ailleurs, la dose déposée aux cellules après les étapes de lavages est minimale (<5%).

Ainsi, par rapport aux calculs dosimétriques, les hypothèses formulées ont concerné la forme d'incorporation de l'activité dans les cellules lors de la phase d'incubation et la stabilité du ^{18}F -FDG après radiomarquage, soient deux étapes qui ont finalement peu d'impact sur la dose absorbée totale, ce qui explique les écarts de doses négligeables suivant les deux modèles dosimétriques testés.

Dans les **tableaux 4.14 (a) et (b)**, les valeurs minimales et maximales des débits de dose moyens associées à chaque étape du radiomarquage sont présentées. Pour la dose la plus élevée, le débit de dose a atteint 0,27 Gy/min pour les JURKAT et 0,71 Gy/min pour les adCSM lors de la première centrifugation des cellules. L'augmentation du débit de dose est la plus élevée entre la phase 3 et 4, qui peut atteindre un facteur supérieur à 40 et 60, respectivement pour les JURKAT et adCSM. Pour donner un point de référence, dans une précédente étude portant sur l'efficacité thérapeutique de ^{90}Y pour différents débits de dose, la gamme des hauts débits (HDR) se situait entre 0,006 à 0,012 Gy/min (172). Les niveaux de débit de dose impliqués dans notre étude sont donc relativement élevés, même s'ils restent significativement inférieurs au débit de dose de l'irradiation externe à 2,5 Gy/min.

4.3 Survie cellulaire

Les courbes de survie clonogénique pour les cellules JURKAT et adCSM, après radiomarquage au ^{18}F -FDG et irradiation externe ont été établies. Sur la **figure 4.21**, les données de survie pour le ^{18}F -FDG ont été corrélées aux valeurs de dose moyenne absorbée au noyau cellulaire calculées à partir du modèle dosimétrique complet et sont présentées en fonction du type d'exposition.

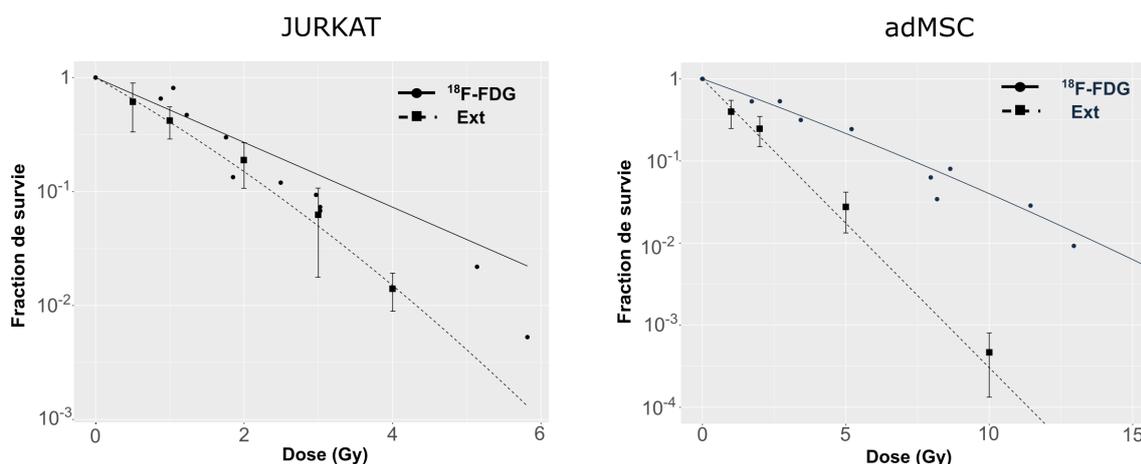


FIGURE 4.21 – Survie clonogénique. Courbes de survie des cellules radiomarquées au ^{18}F -FDG ou irradiées aux rayons X pour les JURKAT (gauche) et les adCSM (droite). Dans le cas de l'irradiation externe, les valeurs moyennes \pm écart-types de la survie sont présentées. Dans le cas du marquage au ^{18}F -FDG, les valeurs individuelles sont représentées.

Les paramètres radiobiologiques α et β ont pu être déterminés à partir du modèle linéaire quadratique (232) décrivant la survie clonogénique en fonction de la dose absorbée telle que :

$$\ln(SF) = -\alpha D - \beta D^2 \quad (4.23)$$

où SF est la fraction de survie cellulaire, α et β sont les paramètres radiobiologiques exprimés respectivement en Gy^{-1} et Gy^{-2} .

Les paramètres α et β , ainsi que la fraction de survie à 2 Gy SF_2 estimée à partir de ces paramètres sont indiqués dans le **tableau 4.15**.

Pour les adCSM, les courbes de survie sont significativement différentes selon le mode d'irradiation ($p < 0,05$). Une survie globalement plus élevée des adCSM suite au radiomarquage au ^{18}F -FDG a été observée en comparaison à l'irradiation externe, avec une fraction de survie à 2 Gy respectivement de 0,55 et 0,22. Pour les deux courbes de survie, la composante quadratique du modèle LQ est apparue nulle ($\beta=0$ pour l'irradiation externe) ou très faible ($\beta=0,003 \pm 0,006$ pour le ^{18}F -FDG). Dans le cas des cellules JURKAT, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre la survie des cellules après radiomarquage et après

Tableau 4.15 – Survie clonogénique. Comparaison des paramètres α et β et de la fraction de survie à 2 Gy SF₂ entre l'irradiation externe et le radiomarquage des cellules JURKAT et adCSM au ¹⁸F-FDG. ^a : p<0,001, ^b : p<0,05. Le coefficient de corrélation *cor* des ajustements est également indiqué.

	Irr. Ext.				¹⁸ F-FDG			
	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	SF ₂	cor	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	SF ₂	cor
JURKAT	0,85±0,10 ^a	0,05±0,09	0,17	0,96	0,65±0,07 ^b	-	0,22	0,95
adCSM	0,81±0,08 ^a	-	0,20	0,98	0,29±0,03 ^a	0,003±0,006	0,55	0,99

irradiation externe (p>0,3). Un léger épaulement de la courbe de survie d'irradiation externe est observé mais les incertitudes expérimentales semblent trop grandes pour obtenir un paramètre β avec une bonne précision.

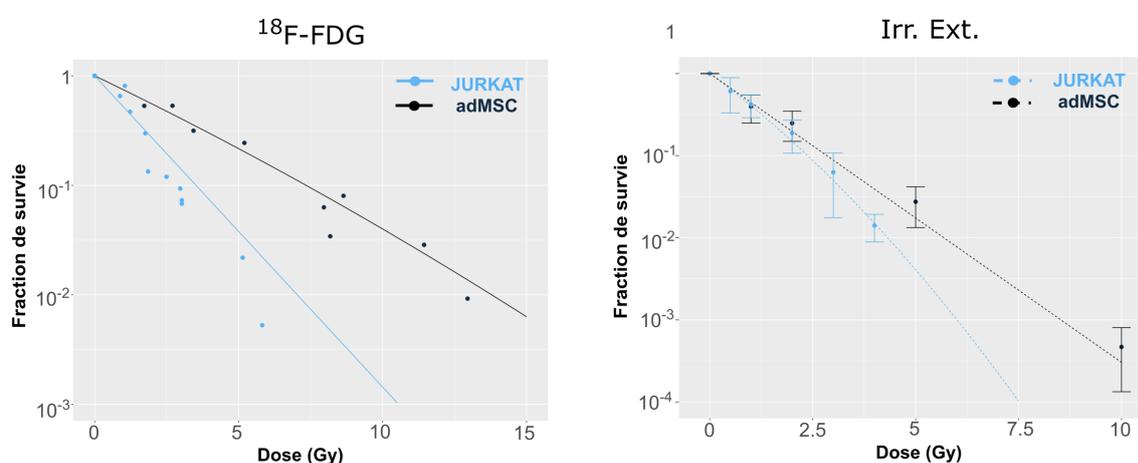


FIGURE 4.22 – Survie clonogénique. Courbes de survie des cellules JURKAT et adCSM radiomarquées au ¹⁸F-FDG (gauche) ou irradiées aux rayons X (droite). Dans le cas de l'irradiation externe, les valeurs moyennes ± écart-types de la survie sont présentées. Dans le cas du marquage au ¹⁸F-FDG, les valeurs individuelles sont représentées.

La comparaison des courbes de survie entre les cellules JURKAT et adCSM montre une réponse différentielle selon le mode d'irradiation. En effet, les résultats semblent indiquer une plus grande radiosensibilité des cellules JURKAT par rapport aux adCSM dans le cas du radiomarquage au ¹⁸F-FDG (p<0,05). La comparaison statistique globale des courbes de survie des JURKAT et adCSM (**figure 4.22**) n'a en revanche pas montré de différence significative pour la survie suite à l'irradiation externe. Néanmoins, le détachement des deux courbes visible de manière nette à partir de 2,5 Gy, suggère une survie globale élevée pour les adCSM pour les doses élevées.

4.4 Résultats de cytométrie en flux

Des analyses en cytométrie en flux ont ensuite été réalisées afin d'analyser conjointement le cycle cellulaire et les cassures doubles brins de l'ADN (à 1h, 24h et 72h) grâce à un double marquage de l'ADN des cellules et des *foci* γ H2AX.

4.4.1 Cycle cellulaire

Dans un premier temps, l'influence de la dose absorbée par les cellules JURKAT et adCSM après radio-marquage ou irradiation externe sur le cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux.

Cycle cellulaire des JURKAT. La **figure 4.23** montre la distribution dans le cycle cellulaire des JURKAT non irradiées et des cellules JURKAT à 1h, 24h et 72h après irradiation externe à 4 Gy et 5,1 Gy (^{18}F -FDG).

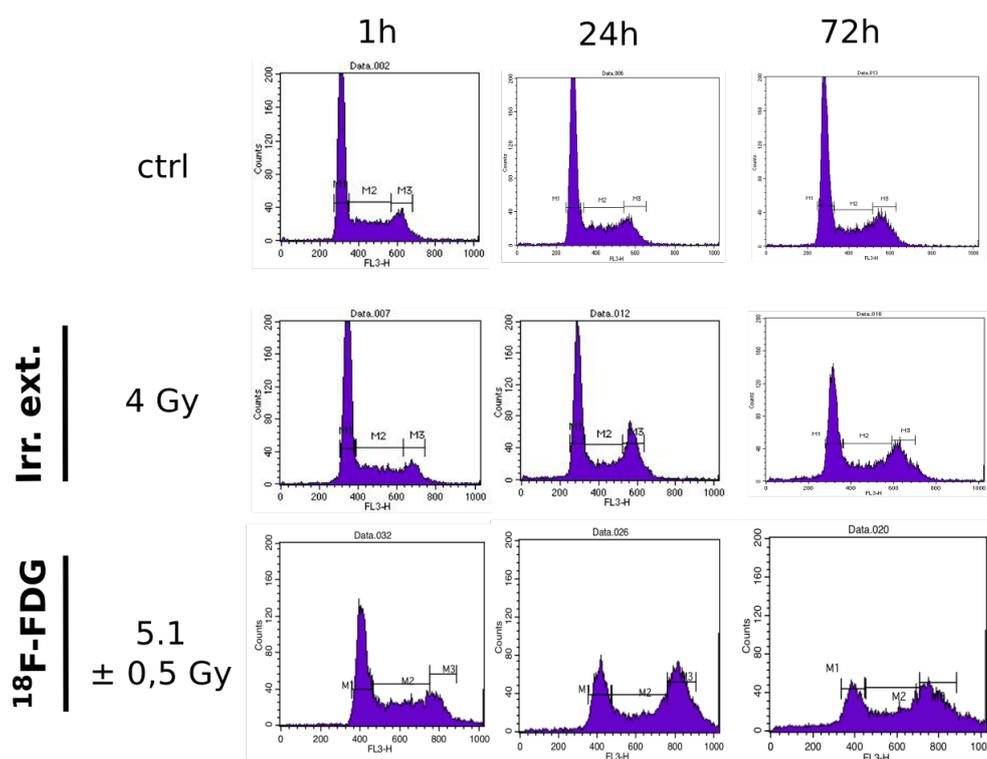


FIGURE 4.23 – Cycle cellulaire des JURKAT. Illustration de l'accumulation des cellules JURKAT en phase G2/M, après irradiation externe et marquage au ^{18}F -FDG. Les profils de distribution des cellules témoins non irradiés (*ctrl* pour contrôle), et irradiés à 4 Gy (par irradiation externe) et 5,1 Gy (^{18}F -FDG) issus d'une expérimentation représentative sont montrés.

La proportion des cellules dans les trois phases du cycle n'a pas varié significativement entre les échantillons témoins et les échantillons irradiés (^{18}F -FDG et irradiation externe) au temps 1h post-irradiation, avec en moyenne $48\pm 4\%$ des cellules en phase G0/G1, $37\pm 3\%$ des cellules en phase S et $16\pm 2\%$ en

phase G2/M. En revanche, un changement de profil du cycle cellulaire a été observé à 24h et 72h, qui se caractérise par une augmentation du nombre de cellules en phase G2/M et une diminution du nombre de cellules en phase G0/G1.

Une corrélation linéaire entre les pourcentages de cellules en G0/G1 et G2/M à 24h et 72h et la dose absorbée a été établie, **figure 4.24**.

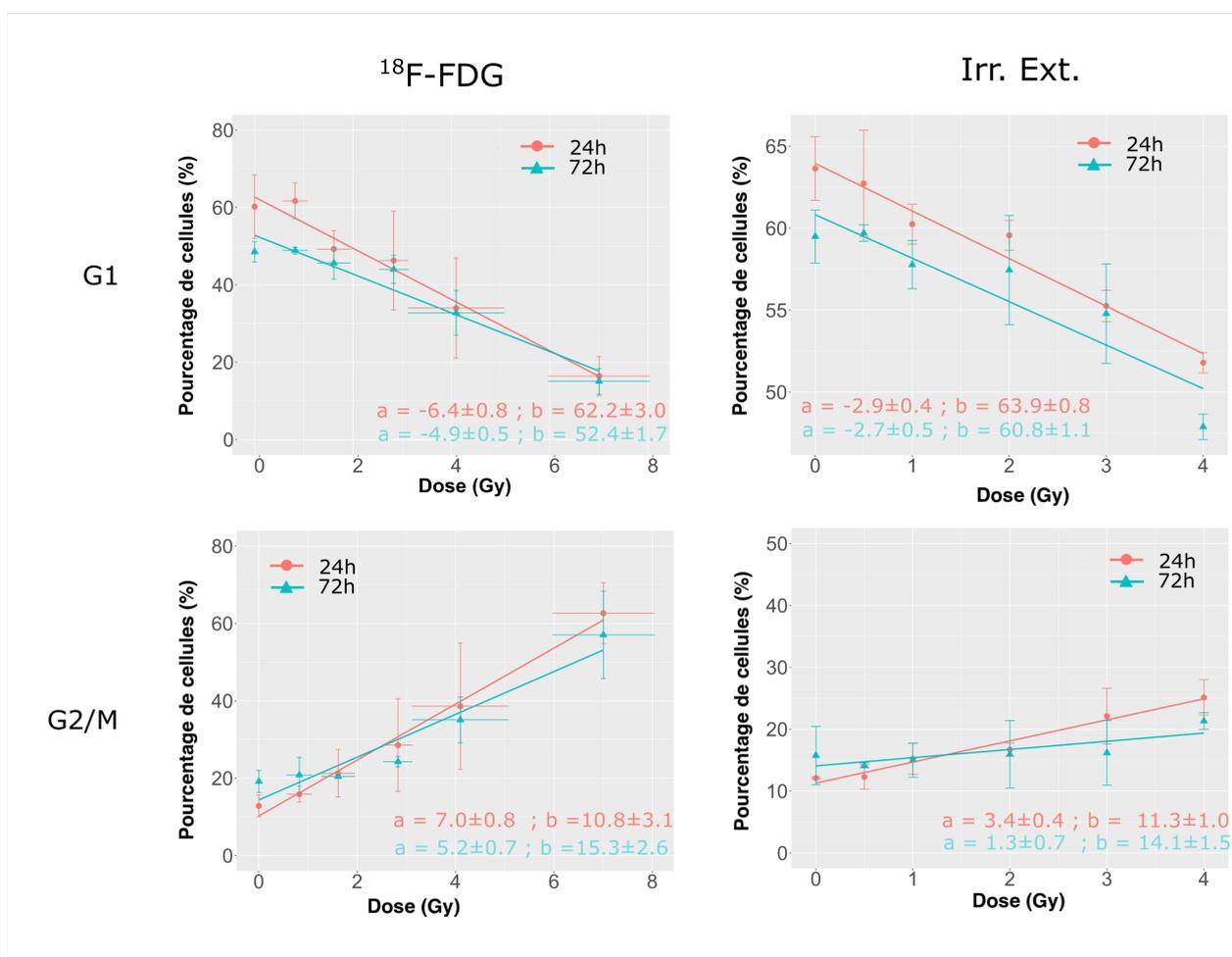


FIGURE 4.24 – Cycle cellulaire des cellules JURKAT. Corrélation entre la dose et le pourcentage de cellules en phase G0/G1 et G2/M à 24h et 72h pour les cellules JURKAT. Lorsque la dose augmente, la proportion des cellules en phase G0/G1 diminue tandis que le nombre de cellules en phase G2/M augmente. Les données relatives à l'irradiation externe sont représentées en moyenne \pm écart-type à partir de trois expérimentations indépendantes. Les valeurs de doses pour le radiomarquage au ^{18}F -FDG ont été regroupées par classe à partir de trois valeurs au minimum, et sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type.

À 24h, 25% des cellules radiomarquées au ^{18}F -FDG sont en phase G2/M après 2 Gy, et 40% après 4 Gy, ce qui représente respectivement 1,5 et 2,5 fois plus que la fréquence relative des cellules témoins. Une diminution de la proportion des cellules en G2/M et une augmentation de la proportion des cellules en G0/G1

sont observées conjointement à 72h par rapport à 24h, les différences de pentes étant respectivement de 1,3 et 1,5 ($p < 0,05$).

Les données du cycle cellulaire après irradiation externe semblent indiquer également un arrêt prolongé des cellules en phase G2/M avec une baisse significative du pourcentage de cellules en G0/G1 à 24h et 72h, et une augmentation en G2/M à 24h et 72h. Cependant, les coefficients de régression, environ deux fois plus faibles que ceux estimés pour les données de radiomarquage, suggèrent une accumulation des cellules en G2/M plus accentuée dans le cas du radiomarquage ^{18}F -FDG par rapport à l'irradiation externe.

Cycle cellulaire des adCSM. L'étude du contenu en ADN des cellules adCSM par cytométrie en flux a mis en évidence une proportion majoritaire des cellules en phase G0/G1, quel que soit le temps après radiomarquage et irradiation externe. L'histogramme des fréquences (moyenne \pm écart-type) dans les trois phases du cycle, pour une dose de 10 Gy, est montré **figure 4.25**.

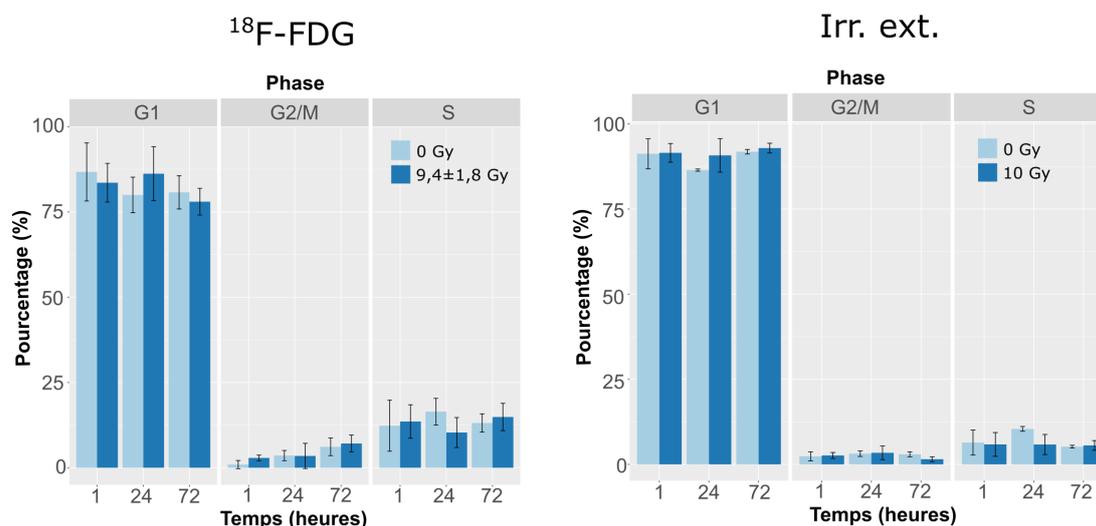


FIGURE 4.25 – Cycle cellulaire des cellules adCSM. Distribution du cycle cellulaire (moyenne et écart-type) des cellules adCSM à 1h, 24h et 72h après radiomarquage à $9,4 \pm 1,8$ Gy et irradiation externe à 10 Gy.

La distribution des cellules non irradiées dans le cycle cellulaire indique globalement une proportion de cellules majoritaire en phase G0/G1. À 24h par exemple, la proportion de cellules est de $80 \pm 5,1\%$ en phase G0/G1, $16,4 \pm 3,9\%$ en phase S et $3,6 \pm 1,5\%$ en phase G2/M (**figure 4.25** (gauche)). Aucune différence significative n'a été observée entre les pourcentages de cellules dans les trois phases, à 10 Gy et $9,4 \pm 1,8$ Gy et pour les trois temps. Le même résultat a été trouvé pour les autres doses.

Par comparaison avec les profils de cycle cellulaire des JURKAT, on observe que la proportion de cellules en phase G0/G1 du cycle à 1h heure post-irradiation est beaucoup plus élevée. Ce résultat est probablement dû à une confluence des cellules en flasque de culture avant décollement des cellules pour l'irradiation ou

fixation des cellules à 24h et 72h. En effet, pour garantir l'homéostasie, ce type de cellules possède une propriété d'inhibition de contact qui se traduit par une mise en phase des cellules en quiescence ou en G0/G1.

4.4.2 Evaluation des dommages à l'ADN *via* l'analyse de l'expression γ H2AX

Le double marquage réalisé sur les cellules nous a permis de détecter l'intensité de fluorescence exprimée par les *foci* γ H2AX en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle sont les cellules.

Les résultats suivants correspondent à l'analyse des CDB à 1h puis de la capacité des cellules à réparer efficacement les CDB à 24h et 72h post-irradiation externe et radiomarquage.

Fréquence de formation des *foci* γ H2AX au temps 1h après protocole d'exposition. La figure 4.26 illustre les différentes étapes d'analyse des données de cytométrie pour extraire le signal de fluorescence γ H2AX des cellules en fonction de leur position dans le cycle cellulaire.

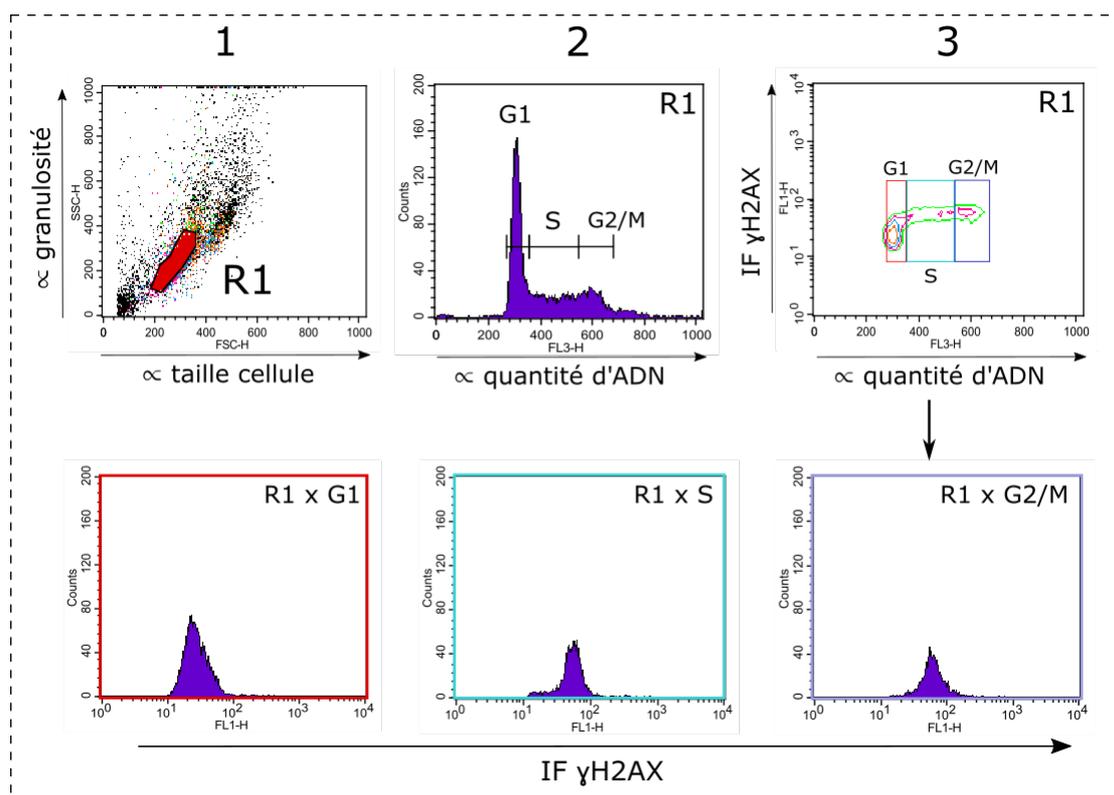


FIGURE 4.26 – Stratégie de fenêtrage pour exprimer l'intensité de fluorescence γ H2AX en fonction de la phase du cycle. (1) Les débris cellulaires sont d'abord exclus *via* la création d'une région R1 sur les paramètres de taille et de granulométrie des cellules. (2) Les trois phases du cycle cellulaire sont identifiées sur le profil de distribution de la fluorescence du signal 7-AAD. (3) Trois nouvelles régions sont créées sur le diagramme en contour du signal de fluorescence γ H2AX en fonction du cycle cellulaire. Les limites de régions en x sont celles définies à l'étape (2). Enfin, les histogrammes de fluorescence γ H2AX dans chaque phase du cycle cellulaire sont représentées. La quantité de fluorescence est proportionnelle au nombre et à la taille des *foci* γ H2AX.

Après élimination des débris, la population de cellules a été représentée en fonction de la fluorescence γ H2AX (en ordonnée) et de la quantité d'ADN (en abscisse). Trois régions ont ensuite été créées afin de distinguer les cellules en phase G0/G1, S et G2/M. L'exemple pour des cellules non-irradiées est montré sur le cadran 3 de la **figure 4.26**. L'intensité de fluorescence positive et proportionnelle à la quantité d'ADN est liée aux CDB induits par des processus endogènes associés par exemple au métabolisme oxydatif, aux erreurs durant la réplication de l'ADN ou à différentes formes de recombinaisons de l'ADN (233).

À partir de la définition de trois régions, les histogrammes d'intensité de fluorescence γ H2AX pour chaque phase du cycle ont pu être extraits.

Cette stratégie de fenêtrage a été appliquée à tous les échantillons de cellules afin d'estimer la fréquence radio-induite de γ H2AX dans les cellules.

Comme illustré sur la **figure 4.27**, un changement de la position relative des histogrammes décrivant les intensités de fluorescence γ H2AX est observée pour des cellules irradiées (à 4 Gy dans l'exemple sur la **figure 4.27** pour les cellules JURKAT) par rapport à la population de contrôle non-irradiée.

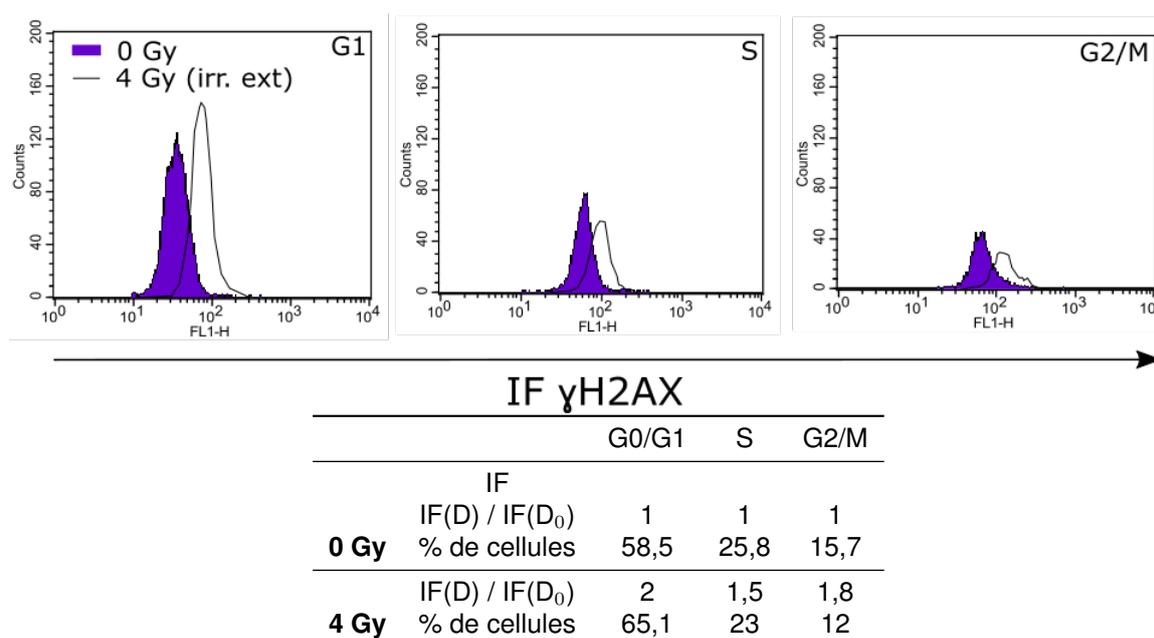


FIGURE 4.27 – Analyse de la fréquence relative de γ H2AX radio-induite. Illustration de l'augmentation relative de l'intensité de fluorescence γ H2AX avec la dose absorbée, avec un exemple représentatif de cellules JURKAT irradiées à 4 Gy à 1h post-irradiation. Le décalage du pic de fluorescence reflète l'augmentation de la quantité de *foci* γ H2AX dans les cellules à 4 Gy par rapport aux cellules non irradiées. La fréquence relative de fluorescence IF(D)/IF(D₀) pour une dose est calculée comme étant la médiane du signal de fluorescence γ H2AX normalisée par rapport à celle du témoin. Les valeurs de fréquence relative dans chaque phase à 0 Gy et 4 Gy, ainsi que le pourcentage de cellules correspondant sont indiqués dans le tableau.

Pour une dose et un temps donnés, l'augmentation relative de la fluorescence γ H2AX a été calculée en faisant le rapport des médianes d'intensité de fluorescence des cellules irradiées et des cellules témoins. L'intensité de fluorescence exprimée par les cellules témoins varie en fonction de la quantité d'ADN présente dans les cellules et donc en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. Ainsi, les cellules en phase S et G2/M présentent un niveau de *foci* plus élevé que celles en phase G0/G1 en absence d'irradiation. La fluorescence émise par les cellules témoins, associée à la présence de *foci* γ H2AX peut résulter de facteurs et processus endogènes liés au fonctionnement normal d'une cellule, la réplication de l'ADN étant l'une des principales sources d'induction de cassures doubles brins (234).

L'analyse de la fréquence relative des *foci* γ H2AX a été réalisée d'abord à un temps précoce *i.e.*, 1h après radiomarquage ou irradiation externe. Ainsi, l'intensité relative de fluorescence γ H2AX à 1h est présentée, **figure 4.28**, en fonction de la dose absorbée.

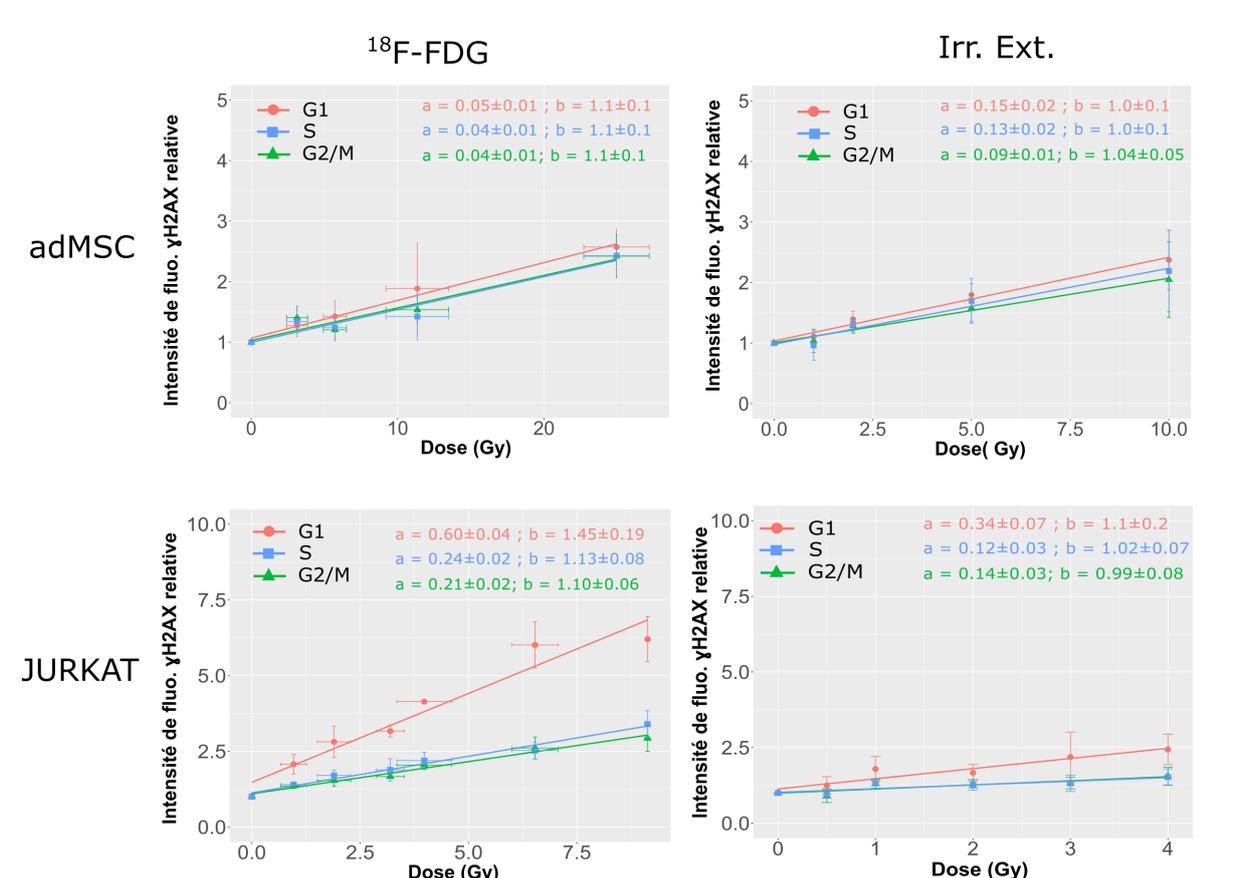


FIGURE 4.28 – Intensité relative de la fluorescence γ H2AX dans les cellules adCSM (en haut) et les cellules JURKAT (en bas) à 1h après radiomarquage au $^{18}\text{F-FDG}$ (gauche) ou irradiation externe (droite). Les données de fluorescence pour chaque dose ont été normalisées en fonction de l'intensité de fluorescence des cellules témoins, telles que à 0 Gy la fréquence relative vaut 1. Pour les résultats d'irradiation externe, les valeurs moyennes \pm écarts-types sont présentées pour trois expérimentations. Pour les résultats de radiomarquage, les doses absorbées et intensités de fluorescences associées ont été regroupées par classe à partir de trois valeurs au minimum.

Pour les deux types cellulaires, nous avons observé une augmentation linéaire de la fluorescence γ H2AX avec la dose absorbée, pour chaque phase du cycle. Ce résultat est en accord avec de nombreuses publications ayant établi une relation linéaire entre le nombre de cassures doubles brins et la dose absorbée pour une grande diversité de cellules et de conditions d'irradiation (149, 233, 175).

Une première différence entre la réponse des JURKAT et adCSM concerne les écarts de fluorescence γ H2AX entre les trois phases du cycle. Pour les JURKAT après radiomarquage au ^{18}F -FDG ou irradiation externe, le rapport de fluorescence est significativement plus élevé pour les cellules en phase G0/G1 que celui pour les cellules en phase S et G2/M ($p < 0,05$). L'irradiation externe des cellules JURKAT a également induit des différences d'intensités de fluorescence γ H2AX émises par les cellules en phase G1, avec un rapport de pente similaire entre G1 et les deux autres phases. Cependant, les intensités sont environ deux fois plus faibles que celles obtenues après radiomarquage.

Au contraire, pour les adCSM, on observe des valeurs d'intensité de fluorescence plus importantes après irradiation externe que par radiomarquage. Pour les adCSM, la réponse semble être équivalente pour les deux modes d'irradiation. À 10 Gy par exemple, le rapport d'intensité est légèrement supérieur à 2 pour l'irradiation externe et légèrement inférieur à 2 pour l'exposition au ^{18}F -FDG.

Enfin, une différence très marquée a été observée entre la fréquence relative γ H2AX induite par le radiomarquage au ^{18}F -FDG des JURKAT et des adCSM. En phase G1, les JURKAT présentent une intensité de fluorescence relative environ 12 fois plus élevée que celle des adCSM, et en phase S et G2/M, environ 6 fois plus. Nous avons également observé une différence significative d'intensité entre les JURKAT et adCSM en phase G1 après irradiation externe, avec un écart de pente de 2,3.

Evaluation de la cinétique de réparation de l'ADN. Pour analyser la cinétique de réparation des CDB, nous avons ensuite représenté, pour les deux types cellulaires, l'intensité de fluorescence relative γ H2AX en fonction de la dose absorbée à 1h, 24h et 72h pour chaque phase du cycle cellulaire (**figures 4.29 et 4.30**).

Le signal de fluorescence à 24h par rapport à 1h est un indicateur du niveau de réparation de l'ADN et à 72 heures, un indicateur du niveau de dommages résiduels.

Pour les cellules JURKAT et les deux modes d'irradiation, une diminution significative de la fréquence relative γ H2AX est observée à 24h et 72h, reflétant le fait qu'une quantité de CDB présente dans les cellules à 1h a été réparée dans ces intervalles de temps. À 24h après irradiation externe, on observe un retour des niveaux d'intensité de fluorescence à la normale pour toute la gamme de dose étudiée (0,5 Gy à 4

JURKAT

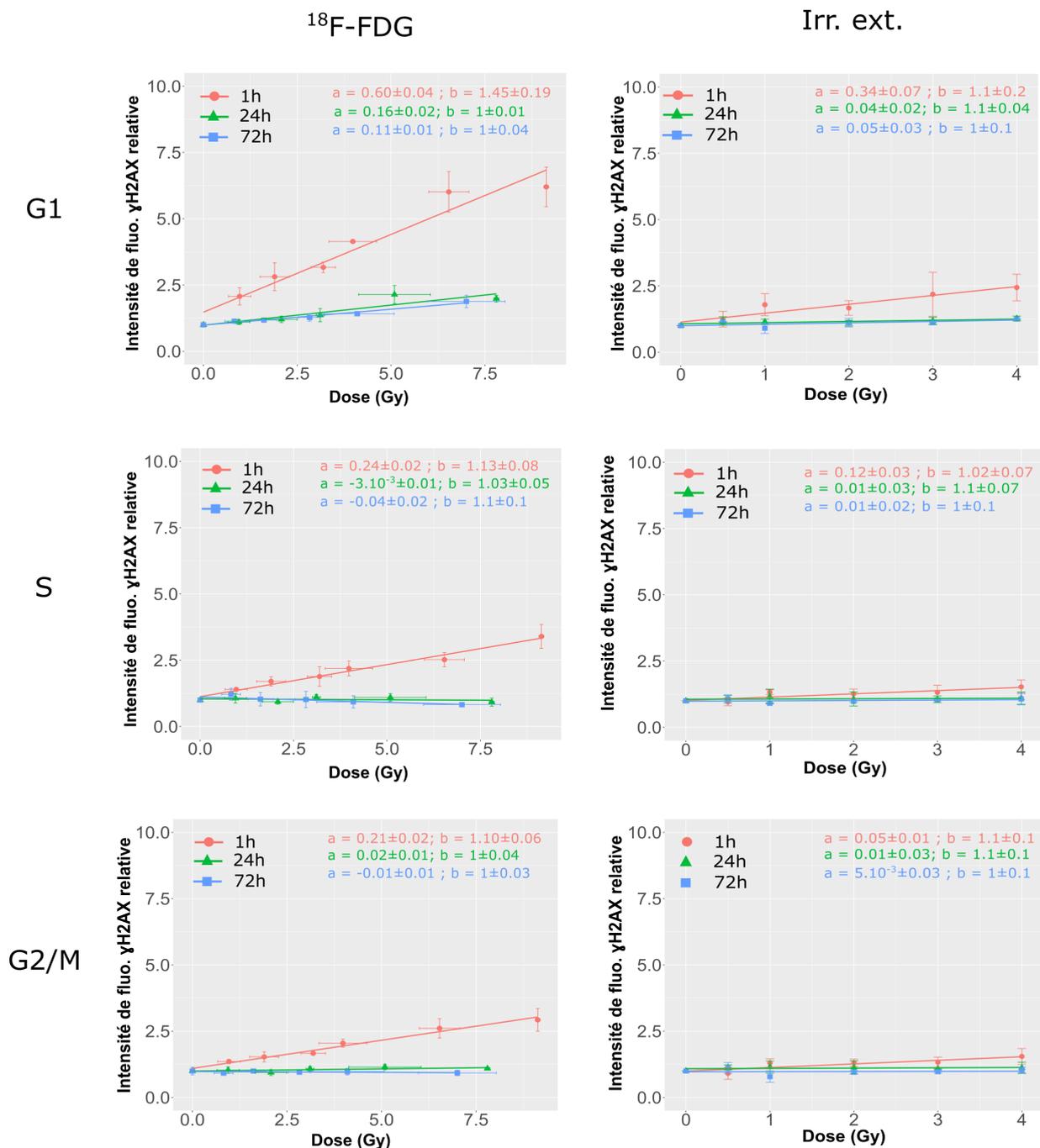


FIGURE 4.29 – Cinétique de réparation de l'ADN. Intensité relative de fluorescence γH2AX pour les cellules JURKAT à 1h, 24h et 72h après radiomarquage au ^{18}F -FDG et irradiation externe, en fonction de la position dans le cycle cellulaire.

adCSM

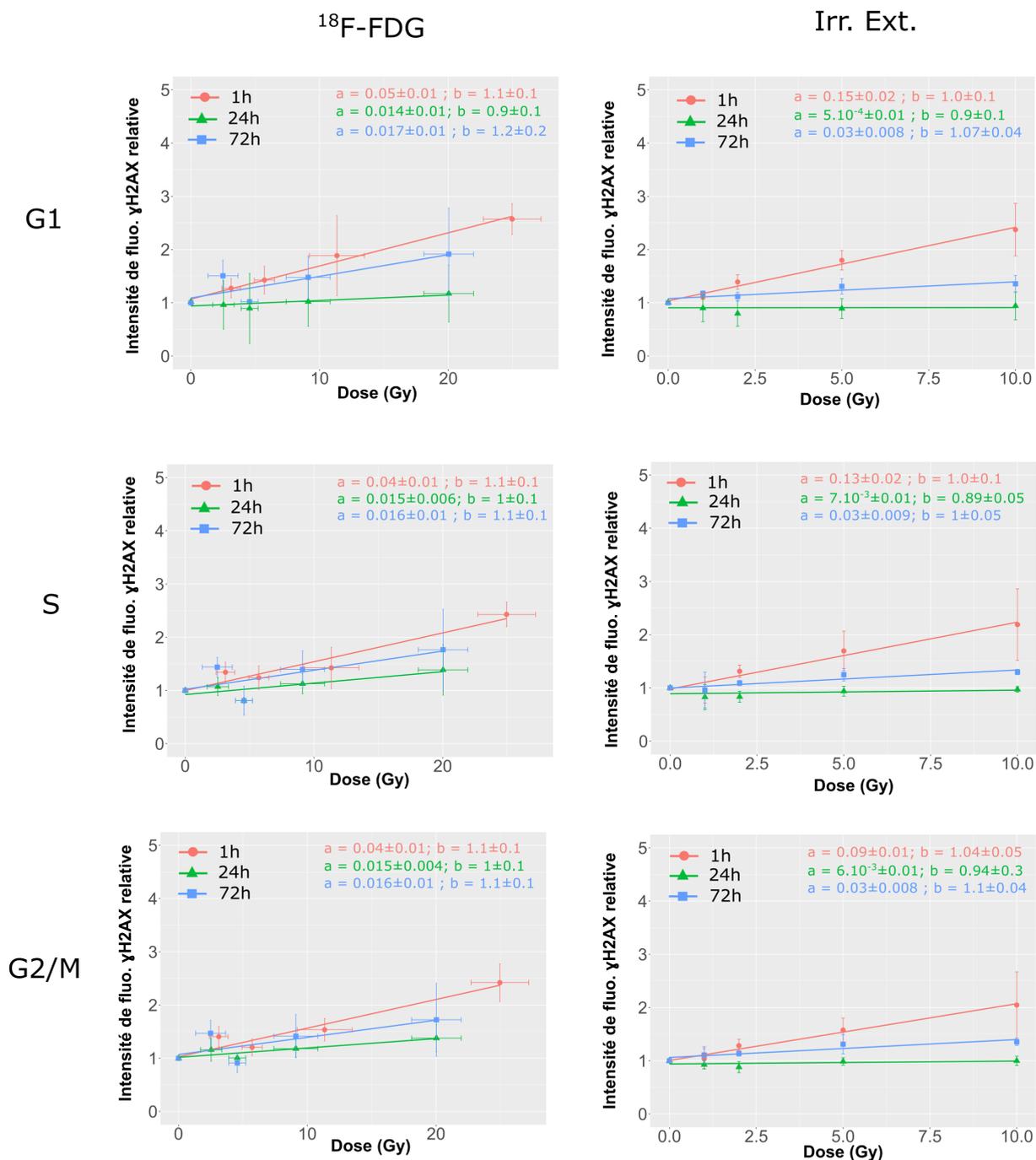


FIGURE 4.30 – Cinétique de réparation de l'ADN. Intensité relative de fluorescence γH2AX pour les cellules adCSM à 1h, 24h et 72h après radiomarquage au ^{18}F -FDG et irradiation externe, en fonction de la position dans le cycle cellulaire.

Gy) ($p > 0,05$). Concernant le radiomarquage au ^{18}F -FDG, la comparaison des valeurs de pente met en évidence une fréquence γH2AX résiduelle dépendant de la dose absorbée en phase G0/G1, avec à 5 Gy, une fréquence relative de 1,8.

Comme pour les JURKAT, les résultats de cinétique γH2AX pour les adCSM montrent une baisse significative de la fréquence relative γH2AX à 24h et 72h par rapport à 1h pour toutes les phases du cycle ($p < 0,05$) **figure 4.30**. En revanche, contrairement aux JURKAT, les régressions linéaires indiquent un niveau de dommages γH2AX à 72h plus élevé que celui à 24h. Pour les données relatives au radiomarquage au ^{18}F -FDG, en raison d'une forte dispersion des valeurs à 72h, la comparaison statistique des données n'a pas permis d'établir de différence significative entre les fréquences relatives à 24h et 72h, pour toutes les phases du cycle. Pour les données relatives à l'irradiation externe, une légère augmentation mais significative ($p < 0,01$) de la fréquence relative γH2AX a été observée à 72h par rapport à 24h, pour les cellules en phase G2/M. Pour les cellules en phase G0/G1 et S, aucune différence significative n'a été mise en évidence, au seuil de 5% entre les valeurs à 24h ($p = 0,07$) et 72h ($p = 0,06$).

5 Discussion et perspectives

Le travail présenté dans ce chapitre avait pour objectif d'étudier la réponse *in vitro* des cellules en fonction de la dose absorbée afin de mieux comprendre l'impact du radiomarquage dans le cadre d'une étude de suivi de cellules par imagerie TEP. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un radiomarquage au ^{18}F -FDG de cellules adCSM et JURKAT.

5.1 Dosimétrie

Comme déjà expliqué précédemment, contrairement à l'irradiation externe, où la dose est délivrée aux cellules avec une précision connue, l'évaluation de la dose absorbée qui suit l'ajout d'une solution radioactive est plus complexe et dépend d'un nombre important de paramètres dont certains, comme l'activité intracellulaire, sont affectés d'une variabilité importante et sont relativement difficiles à déterminer.

Pour évaluer la dose absorbée moyenne au noyau cellulaire, un programme Python a été implémenté, intégrant l'ensemble des variables impliquées dans les différentes étapes du marquage, à savoir, les phases de préparation des cellules (nombre de cellules, volume de marquage, etc), d'incubation (activité volumique), de lavages et de réalisation des tests fonctionnels.

Nous avons ainsi pu observer que la dose délivrée aux cellules lors de la phase d'incubation des cellules avec le ^{18}F -FDG, représentant l'étape centrale du radiomarquage, est similaire à celle délivrée lors de la centrifugation bien que celle-ci s'étende sur une période six fois plus longue (60 min *versus* 10 min). Ce résultat a pu être expliqué par la forte compacité des cellules lorsqu'elles forment un culot, produisant un tir croisé important et contribuant ainsi à une augmentation significative du débit de dose.

De plus, l'incertitude combinée associée à la dose absorbée au noyau a été évaluée en prenant en compte les erreurs associées aux différentes variables de calcul. Il faut souligner que le calcul des incertitudes associées à la dose absorbée moyenne au noyau se limite généralement à la prise en compte de l'incertitude associée à l'activité cumulée calculée à partir de l'écart-type de la valeur sur plusieurs expériences (118, 175, 103). L'originalité de notre travail est d'avoir évalué l'incertitude sur la dose absorbée totale pour chaque expérience en propageant les erreurs associées aux différentes variables intervenant au cours du processus du radiomarquage.

Il est apparu que l'incertitude associée au nombre de cellules par échantillon contribuait à plus de 50% à l'incertitude globale sur la dose absorbée moyenne au noyau (s'élevant à 15% environ), ce paramètre étant directement lié à l'activité intracellulaire moyenne. Dans nos expérimentations, une seule numération est réalisée, avant partage des cellules dans les différents tubes de marquage, tandis que le nombre de cellule déterminant dans le calcul de l'activité intracellulaire moyenne est celui présent dans le volume de suspension cellulaire au moment de la mesure expérimentale de l'activité. L'incertitude englobe bien les erreurs de précision associées au matériel de prélèvement de volume entre ces deux étapes. Toutefois, des possibles pertes de cellules ont pu avoir lieu et n'ont pas été prises en compte dans le modèle. Le risque d'une sur-estimation du nombre de cellules étant finalement une sous-estimation de la dose absorbée moyenne. Pour améliorer la précision du calcul, il faudrait effectuer une étape de numération des cellules supplémentaire au moment de la mesure de l'activité incorporée dans les différents échantillons.

Le calcul de la dose absorbée au noyau repose également sur des hypothèses de modèle pouvant introduire un biais dans le résultat. Lors de l'incubation, les cellules ont été mélangées à intervalle de 10/15 minutes sur les 1h d'incubation. Dans notre modèle dosimétrique, nous n'avons pas pris en compte le processus de sédimentation qui affecte les cellules dans cet intervalle de temps, ce qui a pu contribuer également à une sous-estimation de la dose absorbée moyenne aux cellules. Ceci étant dit, il semble peu probable que cette sous-estimation ait pu avoir un impact significatif sur la dose absorbée et *a fortiori* sur la corrélation dose-effet. Par ailleurs, l'estimation de la dose a reposé sur des hypothèses de modèle globalement maximisantes pour la dose avec, par exemple, la considération d'un changement immédiat de

la configuration de cellules compactes à la configuration de cellules en suspension ou la prise en compte d'une compacité maximale des cellules pour modéliser le culot cellulaire.

Enfin, il est à noter que dans notre modèle, en l'absence d'éléments de preuve sur l'hétérogénéité de l'activité dans les cellules, une distribution uniforme de l'activité a été supposée. Pour prendre en compte une hétérogénéité de distribution de l'activité, les cellules sont généralement assignées à une activité échantillonnée à partir d'une distribution lognormale de l'activité ou une fraction de cellules marquées est considérée. Dans le calcul de la dose moyenne, ce paramètre n'a pas d'impact significatif sur la valeur moyenne de la dose, donc notre hypothèse est satisfaisante pour le calcul. En revanche, il a été montré dans plusieurs études que ce type d'hétérogénéité pouvait conduire à une modification des courbes de survie (176, 199, 201).

Il serait intéressant d'évaluer expérimentalement la manière dont se répartie l'activité dans les différentes cellules. Dans le cas du ^{18}F -FDG, l'utilisation de techniques de spectroscopie comme le SIMS (pour *Spectrométrie de masse des ions secondaires*) pourrait être envisagée pour étudier la distribution du FDG froid (après décroissance radioactive) au sein d'une population de cellules. Pour réaliser une évaluation plus quantitative, d'autres approches sont à explorer. L'équipe de Pratz *et al.* (231) a par exemple mis au point une méthode innovante de microscopie par radioluminescence permettant de suivre la cinétique d'incorporation du ^{18}F -FDG à une résolution mono-cellulaire. La radioluminescence correspond au processus physique par lequel les particules chargées ionisantes produisent de la lumière dans certains matériaux. Les cellules sont placées en contact avec une plaque de scintillateur très fine de CdWO_4 (un matériau très dense), le signal optique émis par interaction des β^+ avec le matériau est amplifié et imagé à l'aide d'un microscope de haute sensibilité photonique et d'une caméra. Les premiers résultats obtenus sont prometteurs et invitent au développement de cette méthode pour la quantification précise de l'activité intracellulaire.

5.2 Relation dose-effet : interprétation des résultats

La cytotoxicité du ^{18}F -FDG a été évaluée en réalisant des tests de clonogénicité. La fraction de survie des cellules JURKAT et adCSM radiomarquées a été estimée en fonction de la dose absorbée moyenne au noyau cellulaire et a été comparée à l'irradiation externe. Les données ont été ajustées avec un modèle linéaire ou linéaire quadratique (corrélation $> 0,96$).

Dans le cas du ^{18}F -FDG, un ajustement a été réalisé à partir des doses individuelles, de façon à ce que chaque point représenté corresponde à un échantillon et une expérience spécifiques. La représentation des fractions de survie pour des doses moyennes \pm écart-types n'aurait pas été pertinente ici en raison d'un

nombre trop limitée de points de mesure. Comme vu dans les résultats, la gamme de doses calculée suite au radiomarquage a largement dépassé celle de l'irradiation externe et pour certains échantillons ($D > 15$ Gy pour les adCSM, $D > 6$ Gy pour les JURKAT), la survie cellulaire mesurée a été nulle. Ces observations donnent toutefois une indication sur la corrélation des doses absorbées aux données de survie qui apparaît cohérente par rapport à l'irradiation externe, permettant ainsi de valider indirectement notre modèle dosimétrique.

Pour la courbe de survie des adCSM irradiées par rayons X, un ajustement avec un modèle linéaire ($\beta=0$) a été le plus adapté, ce qui est cohérent avec la littérature. En effet, Rühle *et al.* (235) ont réalisé des tests de clonogéniques sur plusieurs types de CSMs humaines dont des adCSM irradiées aux rayons X (6-MeV) et ont obtenu une courbe de survie linéaire avec une fraction de survie à 2 Gy SF_2 équivalente à celle obtenue dans notre étude.

Concernant la survie des JURKAT irradiées par rayons X, une valeur de SF_2 de 0,17 a été obtenue. En comparaison, une valeur de SF_2 de 0,1 avait été obtenue précédemment pour des JURKAT irradiées par rayons γ par une source de ^{60}Co (236).

Pour les adCSM, le ^{18}F -FDG apparaît moins cytotoxique que les rayons X, les valeurs de SF_2 étant respectivement 0,55 et 0,2. Ce résultat peut s'expliquer par les différences de débit de dose pouvant affecter la quantité et la nature des dommages. En effet, dans le cas de l'irradiation externe, la dose a été délivrée à un débit de dose constant de 2,5 Gy/min tandis que, dans le cas du radiomarquage au ^{18}F -FDG, la dose a été délivrée à un débit globalement plus faible variant entre $5 \cdot 10^{-4}$ -0,7 Gy/min suivant la phase de marquage et l'activité initiale. La plus grande survie des adCSM après radiomarquage s'appuie sur le principe qu'à un plus faible débit de dose, la probabilité d'accumuler deux cassures simples brins (au niveau du même site) est plus faible. Quand un seul brin est endommagé, la cellule est en effet capable de se réparer dans les premières heures (0,5-3h) (232).

Outre le débit de dose, d'autres paramètres physiques tels que la nature des radiations et la distribution spatiale de la dose peuvent entraîner des réponses différentes selon le mode d'irradiation. Nous avons d'un côté les rayons X et de l'autre des β^+ émis par le ^{18}F -FDG d'énergie maximale à 632 keV (>97%), les deux étant considérés comme des rayonnements de faible TEL.

Pour les irradiations aux rayons X, un accélérateur Linac à 4 MV a été utilisé. Dans la thèse d'Amélie Fréneau réalisée à l'IRSN (237), le spectre énergétique des électrons secondaires avait été simulé pour ce même appareil à l'aide d'un code Monte-Carlo. L'énergie moyenne du spectre a été évaluée à 859 keV. Les différences de TEL sont donc relativement faibles et ont probablement peu d'impact sur la réponse des

cellules.

Dans certains cas, il peut être aussi intéressant d'explorer les différences dans la structure du dépôt d'énergie à l'échelle microscopique car ils peuvent jouer un rôle dans l'induction d'effets différentiels. C'est le cas lorsque les variations stochastiques de dépôt sont importantes, *i.e.*, lorsque la répartition de l'activité est fortement hétérogène ou que la dose déposée dans une cellule est très faible. Dans notre cas, du fait du faible TEL des particules β , un nombre important d'impacts dans une cellule est requis pour engendrer une dose létale. Ainsi l'étude de la structure de trace ne semble pas être pertinente ici.

En ce qui concerne la réponse des JURKAT, les courbes de survie associées aux deux modes d'irradiation sont similaires, le rapport entre les SF₂ étant de 1,3. Ainsi, en comparaison aux adCSM, nous n'avons pas observé de cytotoxicité significativement plus faible induite par le ¹⁸F-FDG par rapport à l'irradiation externe.

Du côté de la modélisation dosimétrique, il n'est pas exclu que la dose absorbée moyenne au noyau ait été sous-estimée, le plus probablement du fait d'une sur-estimation du nombre de cellules dans les échantillons comme discuté précédemment et la conséquence étant une sur-estimation de la cytotoxicité. Toutefois, les potentielles erreurs de calcul ne peuvent être suffisantes pour expliquer un tel différentiel Irradiation externe *versus* ¹⁸F-FDG dans la survie entre les deux types cellulaires.

Un questionnement peut alors se poser sur les différences de réponse liées aux caractéristiques propres à chacun des types cellulaires. Pour rappel, les adCSM sont des cellules primaires, avec un temps de cycle long tandis que les JURKAT ont un temps de cycle court (< 24 h) et sont immortalisées. Ceci induit une différence de métabolisme fondamentale, du fait que les mécanismes de réparation de l'ADN, qui sont les mêmes que les mécanismes de réplication de l'ADN au cours de la division cellulaire, sont activés en permanence dans les JURKAT par rapport aux adCSM.

La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est de plus un paramètre biologique important à considérer dans l'analyse de la réponse biologique. L'étude de la redistribution des cellules JURKAT dans les différentes phases du cycle cellulaire après irradiation externe et radiomarquage a mis en évidence un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, d'autant plus prononcé lorsque la dose augmente. Cela signifie qu'entre 1h et 24h, les cellules en G1 et S ont progressé dans le cycle cellulaire et sont arrêtées en phase G2/M, résultant ainsi en une augmentation significative de la proportion des cellules dans cette phase.

L'arrêt en G2/M de cellules irradiées est un phénomène connu qui est cellule-dépendant (238). Celui-ci a été notamment observé dans le cas de cellules irradiées dépourvues du gène suppresseur p53, ce qui est le cas de la lignée lymphoblastoïde JURKAT (239, 236, 240). Comme nous l'avons vu dans le chapitre

1, cette protéine joue un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire et plus particulièrement dans la régulation de la phase G1/S (163). Sans cette protéine, le point de régulation en G1 est défaillant et les cellules ont alors tendance à s'accumuler en phase G2/M. Ceci a été observé suite à une irradiation γ (241, 236, 53) et aux rayons X (242). Le point de régulation en G2/M serait davantage contrôlé par la kinase 2 dépendante de la cycline que par p53 (243, 244).

Il est possible qu'il y ait un lien entre cet arrêt en G2/M et une hyper-radiosensibilité des cellules, qui augmenterait la cytotoxicité du ^{18}F -FDG sur les JURKAT. Toutefois, ce sujet est débattu dans la littérature.

Plusieurs études ont en effet émis l'hypothèse d'un lien entre l'arrêt du cycle en G2/M et une hyper-radiosensibilité des cellules dans le cas d'une irradiation prolongée et à faible débit de dose. Ce phénomène appelé effet du débit de dose inverse repose sur l'observation que des faibles débits de dose sont finalement plus cytotoxiques par Gy que des doses délivrées avec un débit plus élevé (245). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène : un défaut dans la détection de faibles niveaux de dommages à l'ADN et/ou la synchronisation des cellules en phase G2/M, relativement radiosensible (3, 246). Ce phénomène entraîne typiquement une perte notable de la survie clonogénique et de CDB non-réparés après une faible dose entre 1 et 800 mGy qui n'est pas prédit par le modèle LQ (247).

D'autres études en revanche ont établi un lien entre l'arrêt en G2/M et une plus grande radiorésistance des cellules (248, 249, 241, 250). Dans une étude récente par Pichard *et al.* (251), les mécanismes impliqués dans l'efficacité thérapeutiques du radioimmunoconjugué ^{177}Lu -lilotomab (Betalutin) sur plusieurs lignées cellulaires dont la lignée RAMOS une autre lignée lymphoblastoïde ont été étudiés. Un lien entre l'arrêt des cellules en G2/M et l'induction de l'apoptose a été observé, contribuant ainsi à diminuer l'efficacité thérapeutique.

En complément de l'évaluation de la survie des cellules, un double marquage d'immunofluorescence a été réalisé afin de mesurer l'intensité de fluorescence du marquage γH2AX en fonction de la position des cellules dans le cycle cellulaire à 1h (temps précoce), 24h et 72h post-irradiation externe et radiomarquage. Pour rappel, la forme phosphorylée de l'histone variant H2AX, γH2AX , représente un des premiers témoins de la formation de cassures double brins. Quand les cellules sont exposées à un débit de dose élevé, le nombre de *foci* atteint un pic autour de 30 minutes et ensuite diminue après réparation des cassures (252, 253). Le nombre de *foci* γH2AX formés est proportionnel au nombre de cassures double brins formées et leur déphosphorylation au cours du temps reflète la cinétique de réparation des CDB (254).

La méthode de cytométrie en flux a permis de quantifier rapidement la fluorescence γH2AX pour un grand nombre de cellules et de discriminer les cellules en fonction de leur position dans le cycle cellulaire par un

marquage à l'ADN (233, 255). Cette technique a été développée par les équipes de Olive et MacPhail *et al.* (253) au début des années 2000 pour détecter et mesurer les dommages à l'ADN induits par des rayons X pour une dizaine de lignées cellulaires.

Nous avons obtenu une relation linéaire de la fluorescence entre la dose absorbée et la fluorescence relative γ H2AX à 1h après radiomarquage et irradiation externe, ce qui est en bon accord avec les données de la littérature (233, 253).

Pour les JURKAT, une pente plus élevée de l'intensité de fluorescence relative γ H2AX a été mise en évidence pour les cellules en G0/G1. Comme souligné précédemment, le point de régulation entre les phases G0/G1 et la phase S est déficient chez les JURKAT dû à l'absence de p53. Ainsi la probabilité des cellules en G0/G1 de poursuivre leur progression dans le cycle sans réparation complète des dommages à l'ADN est plus importante. Ceci semble donc cohérent avec l'observation d'un niveau de dommages plus important dans les cellules à cette phase.

Dans le cas du ^{18}F -FDG, la mesure des dommages à 1h post-marquage a démontré une intensité de fluorescence relative avec des différences significatives dans les pentes des courbes dose-réponse entre les deux types cellulaires. Une telle réponse cellule-dépendante dans l'expression γ H2AX à un temps précoce a été observée dans d'autres études (253, 256). Bien qu'il s'agisse d'un temps précoce, il est possible que les valeurs d'intensité de fluorescence relative γ H2AX significativement plus faibles pour les adCSM proviennent d'une réparation d'une partie des dommages à l'ADN.

D'autres facteurs biologiques peuvent contribuer aux différences observées entre les deux types cellulaires. D'abord, l'état des cellules au moment de l'exposition est susceptible d'avoir un impact sur les évaluations quantitatives des dommages et de leurs conséquences. Le cycle cellulaire entraîne une variation momentanée de la quantité et de l'organisation de la molécule d'ADN, indépendamment des différents processus de réparation qui sont associés à certaines phases du cycle cellulaire. Des différences dans l'organisation de la chromatine, entraînant des variations locales de l'ADN, peuvent aussi affecter l'accessibilité des anticorps aux *foci*.

Pour les deux types cellulaires, la pente de l'intensité de fluorescence γ H2AX en fonction de la dose absorbée a diminué significativement à 24h et 72h par rapport à 1h. Cette diminution en fonction du temps est un indicateur du niveau de réparation de l'ADN et du niveau de dommages résiduels.

Pour les adCSM, une réparation efficace des CDB était attendue. Celle-ci a été démontré dans plusieurs publications après irradiation γ ou aux rayons X mesurée par le niveau de *foci* γ H2AX (257, 258). Plus gé-

néralement, la radiorésistance des cellules souches mésenchymateuses aux RI et leur capacité à maintenir leur intégrité fonctionnelle ont été montrées dans plusieurs travaux (259, 260, 235).

Une réparation efficace des CDB a également été observée pour les JURKAT après radiomarquage au ^{18}F -FDG et irradiation externe, les résultats montrant une pente proche de 1 à 24h et 72h. De manière similaire, dans une étude de Klokov *et al.* pour une autre lignée lymphoblastoïde humaine TK6, des dommages résiduels γH2AX n'ont pas été observés à 24h après irradiation aux rayons X (250 kV, 5.1 Gy/min), en utilisant la même technique de détection par cytométrie en flux. Il est suggéré dans cet article que cela est dû à une apoptose rapide des cellules suivant l'irradiation et/ou que l'expression γH2AX induite par des facteurs endogènes qui contribuent à réduire la capacité à détecter les *foci* résiduels.

La question de la corrélation entre la radiosensibilité et la capacité de réparation d'un type cellulaire est complexe. Certains auteurs ont suggéré que le nombre de CDB non-réparées après irradiation pouvait être utilisé comme indicateur de la radiosensibilité. Dikomey *et al.* (261) et Wurm *et al.* (262) ont par exemple fait état d'une bonne corrélation entre la survie clonogénique et les CDB non-réparées pour une variété de lignées cellulaires avec différentes capacités de réparation des CDB après irradiation externe. Une corrélation entre la survie clonogénique et la quantité de *foci* résiduelle a pu également être établie dans le cas de marquage de cellules au ^{99m}Tc -HMPAO/pertechnetate/MIBI (175) ou à ^{111}In -oxine (106). On trouve en revanche d'autres études n'ayant pas mis en évidence de corrélation, pour une variété de lignées cellulaires après irradiation aux rayons X (253, 263, 264). Nos résultats vont plutôt dans le sens de ces derniers. En effet, les valeurs d'intensités de fluorescence obtenues aux temps tardifs ne permettent pas de prédire la radiosensibilité des JURKAT et adCSM après irradiation externe ou marquage au ^{18}F -FDG.

Finalement, la mise en perspectives des résultats de survie clonogénique par rapport aux calculs réalisés dans le chapitre 2 dans le cas d'un radiomarquage au ^{18}F -FDG (§3,5, tableau 2.2) et les niveaux de doses obtenus (>Gy), indique qu'il y a bien un risque de mortalité des cellules administrées pour l'imagerie. En complément, les données de cinétique de fluorescence γH2AX vont dans le sens d'une mort cellulaire assez précoce, ce qui expliquerait qu'une partie des cellules relargue du ^{18}F -FDG au cours de l'imagerie et induit ainsi une perte de signal, comme observé dans certains travaux (cf. Chapitre 1, §3.4).

Pour finir sur l'analyse des données radiobiologiques, il faut souligner que le paramètre débit de dose et ses conséquences au niveau des effets biologiques sont dans notre contexte difficiles à appréhender. Comme on l'a vu, le débit de dose est certes en moyenne significativement inférieur à celui de l'irradiation externe (2,5 Gy/min) mais celui-ci subit des variations importantes au cours du temps. On peut ainsi s'interroger sur les conséquences d'une telle variabilité du débit de dose sur la réponse cellulaire.

Dans une approche similaire, un phénomène de réponse adaptative est décrit dans la littérature, faisant suite à la délivrance de deux doses successives, une dose "d'amorçage" suivie d'une dose plus élevée. Le phénomène adaptatif, introduit en 1984 par Olivieri *et al.*, supporte l'hypothèse que les conséquences délétères d'une seule dose peuvent être atténuées par une première stimulation de RI, en considérant un intervalle de temps entre les deux doses (265). Le phénomène décrit donc un effet plutôt protecteur, ce qui est en apparence en contradiction avec ce que l'on observe pour les JURKAT. Ainsi notre cas ne semble pas répondre à celui d'un phénomène de réponse adaptative.

Afin d'apporter des éléments de compréhension relatifs aux conséquences biologiques de la variation du débit de dose au niveau cellulaire, il aurait été intéressant d'étudier le processus de réparation des lésions sub-létales intervenant au cours du radiomarquage, à travers le calcul analytique du facteur G de Lea et Catcheside, en considérant la superposition de plusieurs termes exponentiels pondérés.

En pratique, il serait intéressant de réaliser, pour les adCSM par exemple, un radiomarquage avec les cellules disposées en monocouche, adhérentes en surface d'une plaque pour limiter les changements abruptes de débit de dose qui complexifient l'analyse de la réponse des cellules. En effet, dans cette configuration, la contribution dosimétrique majoritaire attendue est celle provenant de l'activité dans le milieu lors de l'incubation, entraînant ainsi un débit de dose plus homogène, en comparaison à celui décrit dans nos conditions. Pour la même gamme de dose, il serait alors possible de comparer les effets radio-induits aux cellules dans la configuration de marquage en suspension et en adhérence.

Pour illustration, Gholami *et al.* (172) ont étudié l'effet du débit de dose en radiothérapie interne en comparant la survie cellulaire *in vitro* après exposition à ^{90}Y ($T_p=64,6\text{h}$) à différents débits de dose et par irradiation externe. Dans cette étude, la source d' ^{90}Y a été ajoutée dans des puits de cellules disposées en mono-couche, délivrant une dose à un débit qui décroît exponentiellement avec le temps et sur une durée prolongée (8 jours). Dans cette configuration, le débit de dose initial est déterminant et, au-delà des paramètres α et β , d'autres paramètres peuvent être intégrés à l'analyse de la cytotoxicité de ^{90}Y sur les cellules, tels que le temps critique T_{crit} ou le débit de dose critique R_{crit} , au-delà desquels la probabilité d'induire des dommages à l'ADN devient négligeable. Ils s'expriment ainsi :

$$T_{crit} = -\frac{1}{\lambda} \ln\left(\frac{0,693}{\alpha \cdot R_0 \cdot T_{av}}\right)$$

$$R_{crit} = \frac{0,693}{\alpha \cdot T_{av}}$$

où λ , α , R_0 et T_{av} sont respectivement la constante de décroissance, le paramètre radiobiologique de la lignée cellulaire, le débit de dose initial et le temps de doublement moyen de la lignée cellulaire.

Dans une étude récente menée par Lee *et al.* (266), par exemple, un lien entre la dose physique induite par ^{90}Y *in vitro* dans le cadre de la radiothérapie interne sélective (SIRT) et la dose équivalente en radiothérapie externe (EBRT) fractionnée en termes de mort cellulaire a pu être établi à partir des équations de BED prenant en compte les effets du débit de dose.

5.3 Perspectives générales sur la pratique du radiomarquage

Avant que l'on puisse envisager de définir une dose limite avant apparition de la toxicité du radiomarquage, il semble important d'évaluer d'autres paramètres biologiques pertinents par rapport au type de cellules étudié et à l'application visée. Dans le cadre d'une thérapie cellulaire notamment, l'imagerie *in vivo* n'est en effet pas seulement pensée pour évaluer la biodistribution des cellules mais aussi pour fournir des informations quantitatives sur la fonctionnalité et la viabilité des cellules greffées et sur la persistance des cellules *in-situ* après transplantation. Dans ce cadre, il semble important d'évaluer par exemple l'impact du radiomarquage sur les capacités de migration et de différenciation des cellules en fonction de la dose absorbée.

Par ailleurs, pour tous les types cellulaires, afin de s'assurer que les cellules potentiellement endommagées ne présentent pas de risque oncogénique, des tests de cytogénétiques pour évaluer les dommages chromosomiques pourraient être réalisés (mesure des aberrations chromosomiques et des micronoyaux par exemple).

L'évaluation de la dose absorbée au noyau cellulaire au cours du radiomarquage au ^{18}F -FDG a permis de mettre en évidence différents leviers d'optimisation pratiques de la procédure.

Comme discuté précédemment, la procédure de centrifugation qui permet de séparer les cellules radiomarquées du surnageant radioactif est particulièrement irradiante.

Dans le cas d'un radiomarquage en suspension, la dose absorbée pourrait être réduite de façon notable en diminuant le temps de centrifugation ou en se limitant à une seule étape de lavage. La quantité d'activité dans les cellule dépendant uniquement des paramètres d'incubation, l'efficacité de marquage resterait la même. De cette façon, il serait possible de conserver la même qualité d'image voire de l'améliorer grâce à une diminution de la dose globale et ainsi une diminution de la mortalité des cellules.

Dans le cas de cellules adhérentes, telles que les adCSM, pour limiter la dose délivrée aux cellules, une solution serait de réaliser le radiomarquage avec les cellules disposées en monocouche, adhérentes en surface d'une plaque. En effet, dans ce cas, la séparation du surnageant et des cellules ne nécessite

pas de centrifugation. En outre, cela permettrait de réduire la complexité du modèle dosimétrique et l'incertitude associée à la dose, en limitant le nombre de configurations et de paramètres à prendre en compte dans le modèle.

Une fois les optimisations *in vitro* réalisées et validées, il serait intéressant de poursuivre des études *in vivo* afin d'évaluer l'impact de l'optimisation du protocole de radiomarquage sur la qualité d'image. Il s'agirait, par exemple, de réaliser une analyse comparée d'images acquises chez le petit animal avec une caméra μ TEP après radiomarquage au ^{18}F -FDG pour un protocole de référence (au-dessus de la dose seuil) et un protocole optimisé.

Conclusion générale.

Le radiomarquage de cellules *in vitro* avec des émetteurs β^+ est développé en vue d'un suivi non-invasif et quantitatif de la biodistribution de cellules spécifiques par imagerie TEP. Cependant, l'utilisation de cette méthode impliquant l'incubation des cellules avec des activités pouvant atteindre des centaines de MBq soulève des interrogations quant aux potentiels effets radio-induits et aux conséquences sur la qualité et la pertinence de l'imagerie.

Ce travail de thèse s'est articulé autour de cette question dans le cas d'un radiomarquage avec des émetteurs β^+ . Nous avons pu observer en particulier deux limites aux études actuelles pour répondre de façon satisfaisante à cette problématique : le manque crucial d'une dosimétrie réaliste et le manque d'harmonisation dans les méthodes d'évaluation des effets concernant à la fois le choix des paramètres biologiques étudiés et des temps d'analyse définis.

Dans ce contexte, un premier versant de la thèse a été dédié au développement d'outils dosimétriques à l'échelle multi-cellulaire et à une analyse approfondie des paramètres influents, ceci afin de mieux comprendre l'implication des différentes variables de marquage dans le calcul de la dose absorbée et des contributions individuelles (tir croisé, auto-absorption, dose non-spécifique).

Un premier modèle dosimétrique a été développé en considérant une distribution de cellules selon un réseau pour évaluer l'effet de la densité cellulaire et de l'efficacité de marquage sur la dose absorbée moyenne au noyau cellulaire pour trois radiopharmaceutiques d'intérêt pour le marquage de cellules : le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM et le ^{68}Ga -DOTA peptide. Celui-ci a reposé sur une approche générique où les coordonnées spatiales des cellules sont générées puis les contributions de chaque cellule source à une cellule cible donnée sont sommées à partir de facteurs S calculés avec le code Monte Carlo MCNP6.

Pour le ^{64}Cu -PTSM, la contribution de l'auto-absorption à la dose absorbée totale est prépondérante par rapport au tir croisé du fait de l'émission d'électrons Auger dans le noyau, au-delà même de $50 \cdot 10^6$ cellules/mL et quelle que soit l'efficacité de marquage. Pour le ^{18}F -FDG, la dose auto-absorbée devient prédominante dès 20% d'efficacité à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL. Le radiomarquage au ^{68}Ga -DOTA peptide est en revanche associé à une prédominance du tir croisé et de la dose non-spécifique.

Une étude comparative de la dose absorbée moyenne obtenue avec la dosimétrie cellulaire et la dosimétrie conventionnelle a été réalisée et a mis en évidence des différences particulièrement élevées pour le ^{64}Cu -PTSM atteignant un facteur 30 à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL et à 50% d'efficacité de marquage.

Dans des conditions réalistes de radiomarquage au ^{18}F -FDG extraites de huit publications, il a été montré que la dose conventionnelle pouvait sous-estimer jusqu'à 5 fois la dose absorbée moyenne au noyau cellulaire. Dans cette étude de cas, les doses calculées allant de 0,5 Gy à plus de 20 Gy, une erreur d'un facteur 2 sur la valeur de la dose absorbée s'avère très importante.

De plus, nous avons montré que pour des valeurs d'activité par cellule équivalentes, des doses absorbées significativement différentes pouvaient être induites. Or, les effets biologiques sont encore souvent évalués en fonction de l'activité ou de l'activité par cellule. Ces résultats soulignent l'importance du calcul de la dose absorbée, d'une part pour fournir une donnée de référence tenant compte de l'ensemble des paramètres de marquage, ceux-ci pouvant varier considérablement d'une étude à l'autre et d'autre part pour évaluer de manière pertinente les effets biologiques.

Afin d'optimiser les temps de calcul, nous avons ensuite développé une nouvelle approche de calcul du tir croisé (méthode RDF) reposant sur l'utilisation de *fonction de distribution radiale* (rdf). Cette fonction reflète la distribution des distances inter-cellules dans l'espace et peut être aisément calculée par simulation numérique. Le tir croisé a été calculé pour le ^{18}F -FDG en considérant des configurations de cellules en réseau ou distribuées aléatoirement à partir de *rdfs* obtenues à l'aide du logiciel de dynamique moléculaire LAMMPS. Grâce à la rapidité de cet outil, la nouvelle méthode implémentée a permis de réduire le temps de calcul d'un facteur supérieur à 100 par rapport à la méthode de référence.

Une étude comparative des valeurs de tir croisé moyen a été réalisée afin d'évaluer l'influence de la configuration spatiale des cellules sur le tir croisé. Les doses ont été calculées pour les deux types de configurations cellulaires (réseau et aléatoire uniforme) en faisant varier la densité cellulaire et la taille du volume d'étude puis ont été confrontées à celles obtenues pour une distribution idéale uniforme. Des différences relatives $>5\%$ ont été observées entre la configuration réseau et la distribution idéale uniforme pour des densités cellulaires inférieures à $1 \cdot 10^6$ cellules/mL. Dans ces conditions, l'utilisation d'une seule configuration géométrique entraîne le risque de calculer une dose absorbée éloignée de la moyenne réelle.

Des écarts du même ordre ont été obtenus entre la distribution aléatoire de cellules moyenne et la distribution idéale uniforme pour des volumes de tailles très limitées ($<0,05$ cm de longueur) et de faibles densités cellulaires ($<5 \cdot 10^5$ cellules/mL). En dehors de ces cas, une distribution idéale uniforme peut être considérée pour le calcul du tir croisé, facilitant le calcul et offrant un gain de temps important.

L'intérêt d'une utilisation de l'outil LAMMPS dans le domaine de la dosimétrie cellulaire a finalement été démontré pour des calculs impliquant des géométries plus complexes avec plusieurs régions de densités ou pour la modélisation dynamique de cellules en cours de sédimentation. Ces applications encouragent à explorer davantage l'utilisation de cet outil pour la modélisation de distributions cellulaires réalistes dans divers processus dynamiques.

Dans un second temps, une étude expérimentale de radiomarquage au ^{18}F -FDG a été réalisée pour deux lignées cellulaires JURKAT et adCSM, afin d'évaluer la relation dose-dépendante des effets. Un programme de calcul a été spécialement développé en prenant en compte l'ensemble du dispositif expérimental avec notamment les changements de densité cellulaire et d'incorporation et rétention du ^{18}F -FDG dans les cellules au cours du temps. Le programme intègre l'ensemble des variables expérimentales avec leurs incertitudes associées, permettant ainsi d'estimer de façon réaliste la dose absorbée moyenne délivrée au noyau cellulaire et d'estimer l'incertitude globale pour chaque expérience effectuée.

A partir de ces estimations dosimétriques, nous avons pu montrer que la dose absorbée aux cellules était délivrée à un débit de dose très variable au cours du radiomarquage, celui-ci atteignant une valeur maximale lors des étapes de centrifugation qui visent à séparer le surnageant radioactif des cellules marquées. Ce calcul souligne l'importance de prendre en compte l'ensemble des étapes expérimentales dans le modèle dosimétrique.

Nous avons établi des courbes de survie clonogénique pour les deux types cellulaires en fonction de la dose absorbée et obtenu les paramètres radiobiologiques α , β et SF_2 à partir de l'ajustement des données par un modèle linéaire quadratique. De plus, un protocole de quantification des *foci* γH2AX et de l'ADN basée sur la technique de cytométrie en flux a été développé et ainsi permis d'évaluer les variations d'intensité de fluorescence γH2AX reflétant les CDB en fonction de la position dans le cycle cellulaire. Pour les deux types cellulaires, une relation linéaire a bien été observée entre la dose absorbée au noyau et l'intensité de fluorescence γH2AX à 1h post-radiomarquage et une réparation quasi-complète a été observée dès 24h. Au vu de la gamme de doses absorbées représentative des conditions standards de radiomarquage au ^{18}F -FDG (de l'ordre du Gy), l'ensemble des résultats suggèrent une mort des cellules relativement précoce qui expliquerait les défauts observés lors de l'imagerie suite à l'administration des cellules radiomarquées, *i.e.*, perte de signal, sous-estimation de la quantité de cellules au niveau de la niche de migration ou un bruit de fond important. Par ailleurs, la comparaison des effets biologiques *in vitro* induits par le radiomarquage des cellules au ^{18}F -FDG et par l'irradiation externe a montré une survie clonogénique des adCSM plus élevée après radiomarquage qu'après irradiation externe, qui peut s'expliquer par un débit de dose globalement plus faible lors du radiomarquage. Pour les JURKAT en revanche, une survie similaire a été observée entre les deux modes d'irradiation, suggérant une radiosensibilité accrue des cellules JURKAT au ^{18}F -FDG. Des études supplémentaires *in vitro* devront être mises en place afin d'évaluer plus précisément les conséquences de la variabilité du débit de dose sur la réponse des cellules et leur devenir.

En outre, d'un point de vue pratique, l'optimisation des étapes de lavage pourrait constituer une première solution pour diminuer la dose absorbée et ainsi limiter les effets délétères aux cellules sans impacter

sur l'efficacité de marquage. La standardisation des pratiques quant aux méthodes pour la dosimétrie et l'évaluation expérimentale des effets permettra de comparer les résultats de différentes équipes et *in fine* d'améliorer le processus d'imagerie pour le suivi de cellules. Dans cette perspective, il conviendrait de valider une dose seuil établie à partir des résultats *in vitro* en réalisant des acquisitions TEP *in vivo* et en comparant la qualité d'image pour différentes conditions de radiomarquage des cellules correspondantes à cette dose par rapport à une dose de référence.

Il sera aussi pertinent à l'avenir de réaliser ce type d'étude pour le radiomarquage *in vitro* des leucocytes autologues en vue de l'imagerie de l'infection en TEP qui est à ce jour l'unique application en routine clinique réalisé par imagerie TEMP. L'utilisation de ces cellules marquées chez l'homme impose de s'assurer que le radiomarquage n'induit pas d'effets cellulaires potentiellement dangereux, en particulier dans la sous-population lymphocytaire qui possède un pouvoir clonogène. Ainsi, il semblerait intéressant de corrélérer la dose reçue par les lymphocytes et la mort cellulaire ainsi que le niveau d'aberrations chromosomiques ou de micronoyaux.

En plus de la survie cellulaire, il semble aussi important de réaliser d'autres tests évaluant la conservation ou non des propriétés de chimiotactisme des cellules marquées pouvant impacter l'interprétation des images.

D'un point de vue général, les méthodes développées pour le radiomarquage ou l'évaluation des effets biologiques pourront s'appliquer à d'autres radiopharmaceutiques d'intérêt pour l'imagerie TEP, comme le ^{64}Cu -PTSM qui est envisagé pour les études de suivi à plus long-terme, jusqu'à 24–36 h après administration des cellules marquées. S'agissant également d'un émetteur Auger, les informations relatives à la biodistribution des sources et à la géométrie au niveau subcellulaire seront dans ce cas cruciales pour la dosimétrie. Il sera de plus intéressant d'étudier les contributions individuelles des particules β et des électrons Auger dans la mort cellulaire et les mécanismes radio-induits.

Enfin, cette thèse s'est concentrée sur l'évaluation de la relation dose-dépendante des effets de cellules radiomarquées dans le cadre de l'imagerie. Toutefois, les outils et les méthodes développées dans ce travail sont parfaitement adaptés à d'autres types d'études *in vitro*, notamment destinées à la radiothérapie interne vectorisée, à ^{90}Y et au ^{177}Lu notamment. En effet, l'établissement de courbes clonogéniques en fonction de la dose absorbée est nécessaire pour évaluer l'efficacité thérapeutique de nouveaux radiopharmaceutiques et comparer différents traitements. Ces évaluations *in vitro* devraient permettre notamment de générer de nouvelles données radiobiologiques (rapports α/β , facteur de Lea-Catcheside G, période de réparation, etc...) indispensables à l'amélioration de la prédiction de l'efficacité thérapeutique ou des risques associés dans le domaine de la médecine nucléaire.

Bibliographie

- [1] Patrick Couvreur, Barbara Stella, L. Harivardhan Reddy, Hervé Hillaireau, Catherine Dubernet, Didier Desmaëie, Sinda Lepêtre-Mouelhi, Flavio Rocco, Nathalie Dereuddre-Bosquet, Pascal Clayette, Véronique Rosilio, Véronique Marsaud, Jack Michel Renoir, and Luigi Cattel. Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics. *Nano Letters*, 6(11) :2544–2548, 2006.
- [2] Jean-Jacques Toulmé, Sonia Da Rocha, Eric Dausse, Laurent Azéma, Isabelle Lebars, and Serge Moreau. Les aptamères : du concept à l'outil. *Medecine Nucleaire*, 31(9) :478–484, 2007.
- [3] Jean-pierre Pouget, Catherine Lozza, Emmanuel Deshayes, and Vincent Boudousq. Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy. 2(March) :1–11, 2015.
- [4] Ashutosh Dash, F. F. Knapp, and M. Pillai. Targeted Radionuclide Therapy - An Overview. *Current Radiopharmaceuticals*, 6(3) :152–180, 2014.
- [5] Société Française de Physique Médicale. Enquete nationale 2016, 2016.
- [6] Nona Nora Adonai, Khoi N Nguyen, Joseph Walsh, M Iyer, Tatsushi Toyokuni, Michael E Phelps, Timothy McCarthy, Deborah W McCarthy, and Sanjiv Sam Gambhir. Ex vivo cell labeling with ^{64}Cu -pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5) :3030–5, 2002.
- [7] Bart Cornelissen and Katherine A Vallis. Targeting the Nucleus : An Overview of Auger-Electron Radionuclide Therapy. *Current Drug Discovery Technologies*, 7(4) :263–279, 2010.
- [8] C Bousis, D Emfietzoglou, P Hadjidoukas, and H Nikjoo. Monte Carlo single-cell dosimetry of Auger-electron emitting radionuclides. *Physics in medicine and biology*, 55(9) :2555–72, 2010.
- [9] Nadia Falzone, Boon Quan Lee, Sarah Able, Javian Malcolm, Samantha Terry, Yasir Alayed, and Katherine A Vallis. Targeting Micrometastases : The Effect of Heterogeneous Radionuclide Distribution on Tumor Control Probability. 60(2) :250–259, 2019.
- [10] Adriana Alexandre S. Tavares and João Manuel R.S. Tavares. Evaluating $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Auger electrons for targeted tumor radiotherapy by computational methods. *Medical Physics*, 37(7) :3551–3559, 2010.
- [11] Amin I. Kassis. Cancer therapy with Auger electrons : Are we almost there? *Journal of Nuclear Medicine*, 44(9) :1479–1481, 2003.

- [12] Cajetan Lang, Sebastian Lehner, Andrei Todica, Guido Boening, Wolfgang Michael Franz, Peter Bar-tenstein, Marcus Hacker, and Robert David. Positron emission tomography based in-vivo imaging of early phase stem cell retention after intramyocardial delivery in the mouse model. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 40(11) :1730–1738, 2013.
- [13] Won Jun Kang, Hyun-Jae Kang, Hyo-Soo Kim, June-Key Chung, Myung Chul Lee, and Dong Soo Lee. Tissue distribution of ^{18}F -FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 47(8) :1295–1301, 2006.
- [14] Hao Hong, Yunan Yang, Yin Zhang, and Weibo Cai. Non-Invasive Cell Tracking in Cancer and Cancer Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(12) :1237–1248, 2010.
- [15] Martin Vaegler, Jan K Maerz, Bastian Amend, Luis Arenas da Silva, Julia G Mannheim, Kerstin Fuchs, Susanne Will, Karl D Sievert, Arnulf Stenzl, Melanie L Hart Aicher, and Wilhelm K. Labelling and Tracking of Human Mesenchymal Stromal Cells in Preclinical Studies and Large Animal Models of Degenerative Diseases, 2014.
- [16] Roger J. Hajjar John V. Frangioni. Basic Science for Clinicians In Vivo Tracking of Stem Cells for Clinical Trials in Cardiovascular Disease. 2004.
- [17] Ali Gholamrezanezhad, Sahar Mirpour, Jalil Majd Ardekani, Mohammad Bagheri, Kamran Alimoghadam, Sarah Yarmand, and Reza Malekzadeh. Cytotoxicity of ^{111}In -oxine on mesenchymal stem cells : a time-dependent adverse effect. *Nuclear medicine communications*, 30(3) :210–216, mar 2009.
- [18] Erik F.J. De Vries, Manel Roca, Francois Jamar, Ora Israel, and Alberto Signore. Guidelines for the labelling of leucocytes with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37(4) :842–848, 2010.
- [19] Pannie Lafont, Isabelle Morelec, M. Fraysse, Philippe Got, Claire Houzard, Antoine Confavreux, Antoine Foucher, and Francesco Giammarile. ^{18}F -FDG labelled leukocytes in vitro functional tests : Viability, chemotaxis and phagocytosis assays. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 38 :25–29, 10 2011.
- [20] Brendan Doyle, Brad J. Kemp, Panithaya Chareonthaitawee, Cynthia Reed, Jeffrey Schmeckpeper, Paul Sorajja, Stephen Russell, Philip Araoz, Stephen J. Riederer, and Noel M. Caplice. Dynamic tracking during intracoronary injection of ^{18}F -FDG-labeled progenitor cell therapy for acute myocardial infarction. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(10) :1708–1714, 2007.

- [21] S. Osman and H. J. Danpure. The use of 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-d-glucose as a potential in vitro agent for labelling human granulocytes for clinical studies by positron emission tomography. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation.*, 19(2) :183–190, 1992.
- [22] M L Thakur, J P Lavender, R N Arnot, D J Silvester, and A W Segal. Indium-111-labeled autologous leukocytes in man. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 18(10) :1014–1021, oct 1977.
- [23] J G McAfee and M L Thakur. Survey of radioactive agents for in vitro labeling of phagocytic leukocytes. II. Particles. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 17(6) :488–492, jun 1976.
- [24] L. A. Forstrom, W. L. Dunn, B. P. Mullan, J. C. Hung, V. J. Lowe, and L. M. Thorson. Biodistribution and dosimetry of [¹⁸F]fluorodeoxyglucose labelled leukocytes in normal human subjects. *Nuclear Medicine Communications*, 23(8) :721–725, 2002.
- [25] Daniela Pellegrino, Ali A. Bonab, Stephen C. Dragotakes, Justin T Pitman, Giuliano Mariani, and Edward A. Carter. Inflammation and infection : imaging properties of ¹⁸F-FDG-labeled white blood cells versus ¹⁸F-FDG. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46 9 :1522–30, 2005.
- [26] Nicolas Dumarey, Dominique Egrise, Didier Blocklet, Bernard Stallenberg, Myriam Rimmelink, and P E T Ct. Imaging Infection with ¹⁸F-FDG – Labeled Leukocyte PET / CT : Initial Experience in 21 Patients. *Journal of Nuclear Medicine*, 47 :625–632, 2006.
- [27] Kuldeep K Bhargava, Raj K Gupta, Kenneth J Nichols, and Christopher J Palestro. In vitro human leukocyte labeling with ⁶⁴Cu : an intraindividual comparison with ¹¹¹In-oxine and ¹⁸F-FDG. *Nuclear medicine and biology*, 36(5) :545–9, 2009.
- [28] Inserm. Le Yin et Yang des irradiations à faibles doses sur l'hématopoïèse. pages 1–2, 2017.
- [29] Inserm. Inserm, jun 2009. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-cellulaire>.
- [30] Patricia K. Nguyen, Johannes Riegler, and Joseph C. Wu. Stem cell imaging : From bench to bedside. *Cell Stem Cell*, 14(4) :431–444, 2014.
- [31] Bodo E. Strauer and Ran Kornowski. Stem cell therapy in perspective. *Circulation*, 107(7) :929–934, 2003.

- [32] Olivier Detante, Julien Dimastromatteo, Marie-jeanne Richard, Laurent Riou, Emmanuelle Grillon, Emmanuel Barbier, Marie-dominique Desruet, Florence De Fraipont, Christoph Segebarth, Assia Jaillard, Marc Hommel, Catherine Ghezzi, and Chantal Remy. Intravenous Administration of 99m Tc-HMPAO-Labeled Human Mesenchymal Stem Cells After Stroke : In Vivo Imaging and Biodistribution. *18(28) :1369–1379*, 2009.
- [33] Israel M Barbash, Pierre Chouraqui, Jack Baron, Micha S Feinberg, Sharon Etzion, Ariel Tessone, Liron Miller, Esther Guetta, Dov Zipori, Laurence H Kedes, Robert A Kloner, and Jonathan Leor. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium : feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 108(7) :863–868, aug 2003.
- [34] Li-ying Chien, Jong-kai Hsiao, Szu-chun Hsu, Ming Yao, Chen-wen Lu, Hon-man Liu, Yao-chang Chen, Chung-shi Yang, and Dong-ming Huang. Biomaterials In vivo magnetic resonance imaging of cell tropism, trafficking mechanism, and therapeutic impact of human mesenchymal stem cells in a murine glioma model. *Biomaterials*, 32(12) :3275–3284, 2011.
- [35] Shideng Bao, Qiulian Wu, Roger E. McLendon, Yueling Hao, Qing Shi, Anita B. Hjelmeland, Mark W. Dewhirst, Darell D. Bigner, and Jeremy N. Rich. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120) :756–760, 2006.
- [36] Anastassia Karageorgis. *Utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines pour la thérapie cellulaire anti-cancéreuse dans un modèle de glioblastome*. PhD thesis, Université de Grenoble, 2010.
- [37] O. Eriksson, T. Eich, A. Sundin, A. Tibell, G. Tufveson, H. Andersson, M. Felldin, A. Foss, L. Kyllönen, B. Langstrom, B. Nilsson, O. Korsgren, and T. Lundgren. Positron emission tomography in clinical islet transplantation. *American Journal of Transplantation*, 9(12) :2816–2824, 2009.
- [38] Purnima Dubey, Helen Su, Nona Adonai, Shouying Du, Antonio Rosato, Jonathan Braun, Sanjiv S. Gambhir, and Owen N. Witte. Quantitative imaging of the T cell antitumor response by positron-emission tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3) :1232–1237, 2003.
- [39] Steven A. Rosenberg. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411(6835) :380–384, 2001.
- [40] M. Srinivas, E. H.J.G. Aarntzen, J. W.M. Bulte, W. J. Oyen, A. Heerschap, I. J.M. de Vries, and C. G. Figdor. Imaging of cellular therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(11) :1080–1093, 2010.

- [41] Frank M. Bengel, Volker Schachinger, and Stefanie Dimmeler. Cell-based therapies and imaging in cardiology. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32(SUPPL. 2), 2005.
- [42] W. Brenner, A. Aicher, T. Eckey, S. Massoudi, M. Zuhayra, U. Koehl, C. Heeschen, W.U. Kampen, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, and E. Henze. ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(3) :512–518, 2004.
- [43] Bernd Nowak, Christian Weber, Andreas Schober, Ute Zeiffer, Elisa A Liehn, Philipp Von Hundelshausen, Patrick Reinartz, Wolfgang M Schaefer, and Ulrich Buell. ¹¹¹In-oxine labelling affects the cellular integrity of haematopoietic progenitor cells. pages 715–721, 2007.
- [44] Dara L Kraitchman, Mitsuaki Tatsumi, Wesley D Gilson, Takayoshi Ishimori, Dorota Kedziorek, Piotr Walczak, W Paul Segars, Hunter H Chen, Danielle Fritzsche, Izlem Izbudak, Randell G Young, Michelle Marcelino, Mark F Pittenger, Meiyappan Solaiyappan, Raymond C Boston, Benjamin M W Tsui, Richard L Wahl, and Jeff W M Bulte. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation*, 112(10) :1451–1461, sep 2005.
- [45] Gerald Wisenberg, Katie Lekx, Pam Zabel, Huaifu Kong, Rupinder Mann, Peter R. Zeman, Sudip Datta, Caroline N. Culshaw, Peter Merrifield, Yves Bureau, Glenn Wells, Jane Sykes, and Frank S. Prato. Cell tracking and therapy evaluation of bone marrow monocytes and stromal cells using SPECT and CMR in a canine model of myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 11(1) :1–16, 2009.
- [46] Jinzhu Bai, Weimin Ding, Minjun Yu, Jin Du, Zhongjun Liu, Bing Jia, Lingsong Li, Li Shen, Jiahe Tian, and Fan Wang. Radionuclide imaging of mesenchymal stem cells transplanted into spinal cord. *NeuroReport*, 15(7), 2004.
- [47] B B Chin, Y Nakamoto, J W M Bulte, M F Pittenger, R Wahl, and D L Kraitchman. ¹¹¹In-oxine labelled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. *Nuclear medicine communications*, 24(11) :1149–1154, nov 2003.
- [48] Alexandra Aicher, Winfried Brenner, Maaz Zuhayra, Cornel Badorff, Schirin Massoudi, Birgit Assmus, Thomas Eckey, Eberhard Henze, Andreas M Zeiher, and Stefanie Dimmeler. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation*, 107(16) :2134–2139, apr 2003.
- [49] Ali Gholamrezanezhad, Sahar Mirpour, Mohammad Bagheri, and Mehdi Mohamadnejad. In vivo tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(7) :961–967, 2011.

- [50] Michael Hofmann, Kai C Wollert, Gerd P Meyer, Alix Menke, Lubomir Arseniev, Bernd Hertenstein, Arnold Ganser, Wolfram H Knapp, and Helmut Drexler. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 111(17) :2198–2202, may 2005.
- [51] Patricia Becerra, Miguel A. Valdés Vázquez, Jayesh Dudhia, Andrew R. Fiske-Jackson, Francisco Neves, Neil G. Hartman, and Roger K.W. Smith. Distribution of injected ^{99m}Tc-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(7) :1096–1102, 2013.
- [52] Franz Josef Gildehaus, Florian Haasters, Inga Drosse, Erika Wagner, Christian Zach, Wolf Mutschler, Paul Cumming, Peter Bartenstein, and Matthias Schieker. Impact of ¹¹¹In-oxine labelling on viability of human mesenchymal stem cells in vitro, and 3D cell-tracking using SPECT/CT in vivo. *Molecular imaging and biology*, 13(6) :1204–1214, dec 2011.
- [53] Joanne Huang, C Chang I Lee, Julie L Sutcliffe, Simon R Cherry, and Alice F Tarantal. Radiolabeling rhesus monkey CD34+ hematopoietic and mesenchymal stem cells with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for microPET imaging. *Molecular imaging*, 7(1) :1–11, 2008.
- [54] Torsten Eich, Olof Eriksson, Anders Sundin, Sergio Estrada, Daniel Brandhorst, Heide Brandhorst, Bengt Langstrom, Bo Nilsson, Olle Korsgren, and Torbjorn Lundgren. Positron emission tomography : a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model. *Transplantation*, 84(7) :893–898, oct 2007.
- [55] Su Jin Kim, Doris J. Doudet, Andrei R. Studenov, Cuilan Nian, Thomas J. Ruth, Sanjiv Sam Gambhir, and Christopher H.S. McIntosh. Quantitative micro positron emission tomography (PET) imaging for the in vivo determination of pancreatic islet graft survival. *Nature Medicine*, 12(12) :1423–1428, 2006.
- [56] Christian Toso, Habib Zaidi, Philippe Morel, Mathieu Armanet, Axel Andres, Nadine Pernin, Reto Baertschiger, Daniel Slosman, Leo H Bühler, Domenico Bosco, and Thierry Berney. Positron-emission tomography imaging of early events after transplantation of islets of Langerhans. *Transplantation*, 79(3) :353–355, feb 2005.
- [57] Yvette van Hensbergen, Laurus F. Schipper, Anneke Brand, Manon C. Slot, Mick Welling, Alma J. Nauta, and Willem E. Fibbe. Ex vivo culture of human CD34+ cord blood cells with thrombopoietin (TPO) accelerates platelet engraftment in a NOD/SCID mouse model. *Experimental Hematology*, 34(7) :943–950, 2006.
- [58] Kimberley J. Blackwood, Benoit Lewden, R. Glenn Wells, Jane Sykes, Robert Z. Stodilka, Gerald Wisenberg, and Frank S. Prato. In vivo SPECT quantification of transplanted cell survival after

engraftment using ^{111}In -tropolone in infarcted canine myocardium. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(6) :927–935, 2009.

- [59] Aditya Bansal, Mukesh K Pandey, Yunus E Demirhan, Jonathan J Nesbitt, Ruben J Crespo-Diaz, Andre Terzic, Atta Behfar, and Timothy R DeGrado. Novel ^{89}Zr cell labeling approach for PET-based cell trafficking studies. *EJNMMI research*, 5 :19, 2015.
- [60] Mikael J Pittet, Jan Grimm, Cedric R Berger, Takahiko Tamura, Gregory Wojtkiewicz, Matthias Nahrendorf, Pedro Romero, Filip K Swirski, and Ralph Weissleder. In vivo imaging of T cell delivery to tumors after adoptive transfer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30) :12457–12461, jul 2007.
- [61] J. M. Brand, B. Meller, K. Von Hof, J. Luhm, M. Bähre, H. Kirchner, and Christoph Frohn. Kinetics and organ distribution of allogeneic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells and Development*, 13(3) :307–314, 2004.
- [62] Lina Matera, Alessandra Galetto, Marilena Bello, Cinzia Baiocco, Isabella Chiappino, Giancarlo Castellano, Alessandra Stacchini, Maria A. Satolli, Michele Mele, Sergio Sandrucci, Antonio Mussa, Gianni Bisi, and Theresa L. Whiteside. In vivo migration of labeled autologous natural killer cells to liver metastases in patients with colon carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 4 :1–9, 2006.
- [63] Birgit Meller, Christoph Frohn, Jörg Matthias Brand, Isabel Lauer, Lutz F. Schelper, Katharina Von Hof, Holger Kirchner, Eckart Richter, and Manfred Baehre. Monitoring of a new approach of immunotherapy with allogenic ^{111}In -labelled NK cells in patients with renal cell carcinoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 31(3) :403–407, 2004.
- [64] Didier Blocklet, Michel Tounouz, Robert Kiss, Micheline Lambermont, Thierry Velu, Dominique Duriau, Michel Goldman, and Serge Goldman. ^{111}In -oxine and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO labelling of antigen-loaded dendritic cells : In vivo imaging and influence on motility and actin content. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 30(3) :440–447, 2003.
- [65] Reinhard Meier, Morand Piert, Guido Piontek, Martina Rudelius, Robert A. Oostendorp, Reingard Senekowitsch-Schmidtke, Tobias D. Henning, Winfried S. Wels, Christoph Uherek, Ernst J. Rummeny, and Heike E. Daldrup-Link. Tracking of ^{18}F -FDG-labeled natural killer cells to HER2/neu-positive tumors. *Nuclear Medicine and Biology*, 35(5) :579–588, 2008.
- [66] Edit B. Olasz, Lixin Lang, Jurgen Seidel, Michael V. Green, William C. Eckelman, and Stephen I. Katz. Fluorine-18 labeled mouse bone marrow-derived dendritic cells can be detected in vivo by high resolution projection imaging. *Journal of Immunological Methods*, 260(1-2) :137–148, 2002.

- [67] Christoph M Griessinger, Rainer Kehlbach, Daniel Bukala, Stefan Wiehr, Rüdiger Bantleon, Funda Cay, Andreas Schmid, Heidi Braumüller, Birgit Fehrenbacher, Martin Schaller, Martin Eichner, Julie L Sutcliffe, Walter Ehrlichmann, Oliver Eibl, Gerald Reischl, Simon R Cherry, Martin Röcken, Bernd J Pichler, and Manfred Kneilling. In vivo tracking of Th1 cells by PET reveals quantitative and temporal distribution and specific homing in lymphatic tissue. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 55(2) :301–307, feb 2014.
- [68] Putthiporn Charoenphun, Levente K. Meszaros, Krisanat Chuamsaamarkkee, Ehsan Sharif-Paghaleh, James R. Ballinger, Trevor J. Ferris, Michael J. Went, Gregory E D Mullen, and Philip J. Blower. ^{89}Zr -Oxinate4 for long-term in vivo cell tracking by positron emission tomography. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 42(2) :278–287, 2014.
- [69] Ken Matsui, Zheng Wang, Timothy J. McCarthy, Paul M. Allen, and David E. Reichert. Quantitation and visualization of tumor-specific T cells in the secondary lymphoid organs during and after tumor elimination by PET. *Nuclear Medicine and Biology*, 31(8) :1021–1031, 2004.
- [70] Robert J. Melder, David Elmaleh, Anna Liisa Brownell, Gordon L. Brownell, and Rakesh K. Jain. A method for labeling cells for positron emission tomography (PET) studies. *Journal of Immunological Methods*, 175(1) :79–87, 1994.
- [71] Guenther Koehne, Mikhail Doubrovin, Ekaterina Doubrovina, Pat Zanzonico, Humilidad F. Gallardo, Anna Ivanova, Julius Balatoni, Julie Teruya-Feldstein, Glenn Heller, Chad May, Vladimir Ponomarev, Shutian Ruan, Ronald Finn, Ronald G. Blasberg, William Bornmann, Isabelle Riviere, Michel Sadelain, Richard J. O'Reilly, Steven M. Larson, and Juri G. Gelovani Tjuvajev. Serial in vivo imaging of the targeted migration of human HSV-TK-transduced antigen-specific lymphocytes. *Nature Biotechnology*, 21(4) :405–413, 2003.
- [72] Priyanka Jha, Daniel Golovko, Sukhmine Bains, Daniel Hostetter, Reinhard Meier, Michael F. Wendland, and Heike E. Daldrup-Link. Monitoring of natural killer cell immunotherapy using noninvasive imaging modalities. *Cancer Research*, 70(15) :6109–6113, 2010.
- [73] M Fjälling, P Andersson, Eva Forssell-Aronsson, J Grétarsdóttir, Viktor Johanson, L E Tisell, Bo Wängberg, O Nilsson, G Berg, A Michanek, G Lindstedt, and H Ahlman. Systemic radionuclide therapy using ^{111}In -DTPA-D-Phe1-octreotide in midgut carcinoid syndrome. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 37 :1519–1521, 1996.
- [74] P M Chisholm, H J Danpure, G Healey, and S Osman. Cell damage resulting from the labeling of rat lymphocytes and HeLa S3 cells with ^{111}In -oxine. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 20(12) :1308–1311, dec 1979.

- [75] L. Mortelmans, A. Verbruggen, S. Malbrain, M. J. Heynen, C. de Bakker, M. Boogaerts, and M. de Roo. Evaluation of ^{111}In -labelled white blood cells by in vitro functional tests and electron microscopy - Comparison of three labelling methods. *European Journal of Nuclear Medicine*, 14(3) :159–164, 1988.
- [76] C de Labriolle-Vaylet, N Colas-Linhart, M Sala-Trepat, A Petiet, P Voisin, and B Bok. Biological consequences of the heterogeneous irradiation of lymphocytes during ^{99m}Tc -hexamethylpropylene amine oxime white blood cell labelling. *European journal of nuclear medicine*, 25(10) :1423–1428, oct 1998.
- [77] R J ten Berge, A T Natarajan, M R Hardeman, E A van Royen, and P T Schellekens. Labeling with ^{111}In has detrimental effects on human lymphocytes : concise communication. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 24(7) :615–620, jul 1983.
- [78] Sahar Mirpour and Ali Gholamrezanezhad. Clinical Stem Cell Imaging and In vivo Tracking.
- [79] Yuan Jin, Huaifu Kong, Rob Z. Stodilka, R. Glenn Wells, Pamela Zabel, Peter A. Merrifield, Jane Sykes, and Frank S. Prato. Determining the minimum number of detectable cardiac-transplanted ^{111}In -tropolone-labelled bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by SPECT. *Physics in Medicine and Biology*, 50(19) :4445–4455, 2005.
- [80] L Bindslev, M Haack-Sørensen, K Bisgaard, L Kragh, S Mortensen, B Hesse, A Kjaer, and J Kastrup. Labelling of human mesenchymal stem cells with ^{111}In for SPECT imaging : effect on cell proliferation and differentiation. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 33(10) :1171–1177, oct 2006.
- [81] T Merz, J Tatum, and J Hirsch. ^{99m}Tc -labeled lymphocytes : a radiotoxicity study. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 27(1) :105–110, jan 1986.
- [82] Chenxi Wu, Guotao Ma, Jing Li, Kun Zheng, Yonghong Dang, Ximin Shi, and Yi Sun. In vivo cell tracking via ^{18}F -FDG labeling : a review of the preclinical and clinical applications in cell-based diagnosis and therapy . *Journal of Clinical Imaging*, 37(1) :28–36, 2013.
- [83] Sabire Yilmaz Aksoy, Sertac Asa, Meftune Ozhan, Meltem Ocak, M. Sait Sager, Melih Engin Erkan, Metin Halac, Levent Kabasakal, Kerim Sönmezoglu, and Bedii Kanmaz. FDG and FDG-labelled leucocyte PET/CT in the imaging of prosthetic joint infection. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41(3) :556–564, 2014.

- [84] Elena Miñana, Marta Roldán, Tomás Chivato, Teresa Martínez, and Teodomiro Fuente. Quantification of the chromosomal radiation damage induced by labelling of leukocytes with ^{18}F -FDG. *Nuclear Medicine and Biology*, 42(9) :720–723, 2015.
- [85] Esther Wolfs, Tom Struys, Tineke Notelaers, Scott J Roberts, Abhishek Sohni, Guy Bormans, Koen Van Laere, Frank P Luyten, Olivier Gheysens, Ivo Lambrichts, Catherine M Verfaillie, and Christophe M Deroose. ^{18}F -FDG labeling of mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells for PET imaging : effects on ultrastructure and differentiation capacity. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 54(3) :447–454, mar 2013.
- [86] Esmat Elhami, Andrew L Goertzen, Bo Xiang, Jixian Deng, Chris Stillwell, Shadreck Mzengeza, Rakesh C Arora, Darren Freed, and Ganghong Tian. Viability and proliferation potential of adipose-derived stem cells following labeling with a positron-emitting radiotracer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 38(7) :1323–1334, jul 2011.
- [87] Carlo Botti, Donatella R M Negri, Ettore Seregni, Venkatesh Ramakrishna, Flavio Arienti, Lorenzo Maffioli, Claudia Lombardo, Anna Bogni, Claudio Pascali, Flavio Crippa, Simonetta Massaron, Federica Remonti, Silvia Nerini-Molteni, Silvana Canevari, and Emilio Bombardieri. Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes. *European Journal of Nuclear Medicine*, 24(5) :497–504, 1997.
- [88] Olof Eriksson, Arian Sadeghi, Björn Carlsson, Torsten Eich, Torbjörn Lundgren, Bo Nilsson, Thomas Tötterman, Olle Korsgren, and Anders Sundin. Distribution of adoptively transferred porcine T-lymphoblasts tracked by ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-d-glucose and position emission tomography. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(6) :827–833, 2011.
- [89] Bok Nam Park, Wooyoung Shim, Gwang Lee, Oh Young Bang, Young Sil An, Joon Kee Yoon, and Young Hwan Ahn. Early distribution of intravenously injected mesenchymal stem cells in rats with acute brain trauma evaluated by $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO labeling. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(8) :1175–1182, 2011.
- [90] Pat Zanzonico, Guenther Koehne, Humilidad F Gallardo, Mikhail Doubrovin, Ekaterina Doubrovina, Ronald Finn, Ronald G Blasberg, Isabelle Riviere, Richard J O'Reilly, Michel Sadelain, and Steven M Larson. [^{131}I]FIAU labeling of genetically transduced, tumor-reactive lymphocytes : cell-level dosimetry and dose-dependent toxicity. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 33(9) :988–997, sep 2006.
- [91] O. Aupée, N. Rizzo-Padoin, C. de Labriolle-Vaylet, and H. Foehrenbach. Radiomarquage in vitro

des leucocytes au [18F]-fludésoxyglucose : première expérience à l'hôpital d'instruction des armées Val-de-Grâce. *Medecine Nucleaire*, 35(7) :406–410, 2011.

- [92] Josephine N Rini, Kuldeep K Bhargava, Gene G Tronco, Carol Singer, Russell Caprioli, Scott E Marwin, Hugh L Richardson, Kenneth J Nichols, Paul V Pugliese, and Christopher J Palestro. PET with FDG-labeled leukocytes versus scintigraphy with ¹¹¹In-oxine-labeled leukocytes for detection of infection. *Radiology*, 238(3) :978–987, mar 2006.
- [93] Yan Zhang, Stephanie Thorn, Jean N. DaSilva, Marc Lamoureux, Robert A. DeKemp, Rob S. Beanlands, Marc Ruel, and Erik J. Suuronen. Collagen-based matrices improve the delivery of transplanted circulating progenitor cells : development and demonstration by ex vivo radionuclide cell labeling and in vivo tracking with positron-emission tomography. *Circulation. Cardiovascular imaging*, 1(3) :197–204, 2008.
- [94] Ws Snyder, Ford, Gg Warner, and S. Watson. MIRD pamphlet no. 11 : Absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and organs. 1975.
- [95] Lionel G. Bouchet, Wesley E. Bolch, H. Pablo Blanco, Barry W. Wessels, Jeffrey A. Siegel, Didier A. Rajon, Isabelle Clairand, and George Sgouros. MIRD Pamphlet No. 19 : Absorbed fractions and radionuclide S values for six age-dependent multiregion models of the kidney. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(7) :1113–1147, 2003.
- [96] Wesley E. Bolch, Lionel G. Bouchet, James S. Robertson, Barry W. Wessels, Jeffrey A. Siegel, Roger W. Howell, Alev K. Erdi, Bulent Aydogan, Sylvain Costes, Evelyn E. Watson, A. B. Brill, N. D. Charkes, D. R. Fisher, M. T. Hays, and S. R. Thomas. MIRD pamphlet no. 17 : The dosimetry of nonuniform activity distributions - Radionuclide S values at the voxel level. *Journal of Nuclear Medicine*, 40(1), 1999.
- [97] S Murty Goddu, RW Howell, LG Bouchet, WE Bolch, and DV Rao. *MIRD Cellular S values*. A publication of the society of nuclear medicine, 1997.
- [98] Wesley E. Bolch, Keith F. Eckerman, George Sgouros, Stephen R. Thomas, A. Bertrand Brill, Darrell R. Fisher, Roger W. Howell, Ruby Meredith, and Barry W. Wessels. MIRD pamphlet No. 21 : A generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry-standardization of nomenclature. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(3) :477–484, 2009.
- [99] S M Goddu, D V Rao, and R W Howell. Multicellular dosimetry for micrometastases : dependence of self-dose versus cross-dose to cell nuclei on type and energy of radiation and subcellular distribu-

- tion of radionuclides. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 35(3) :521–530, mar 1994.
- [100] E D Yorke, L E Williams, A J Demidecki, D B Heidorn, P L Roberson, and B W Wessels. Multicellular dosimetry for beta-emitting radionuclides : autoradiography, thermoluminescent dosimetry and three-dimensional dose calculations. *Medical physics*, 20(2 Pt 2) :543–550, 1993.
- [101] I. Gardin, N. C. Linhart, A. Petiet, and B. Bok. Dosimetry at the cellular level of Kupffer cells after ^{99m}Tc -sulphur colloid injection. *Journal of Nuclear Medicine*, 33(3) :380–384, 1992.
- [102] Prasad V.S.V. Neti and Roger W. Howell. Log normal distribution of cellular uptake of radioactivity : Implications for biologic responses to radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, 47(6) :1049–1058, 2006.
- [103] Giulia Tamborino, Marijke De Saint-Hubert, Lara Struelens, Dayana C Seoane, Eline A M Ruigrok, An Aerts, Wiggert A van Cappellen, Marion de Jong, Mark W Konijnenberg, and Julie Nonnekens. Cellular dosimetry of [(177)Lu]Lu-DOTA-[Tyr(3)]octreotate radionuclide therapy : the impact of modeling assumptions on the correlation with in vitro cytotoxicity. *EJNMMI physics*, 7(1) :8, feb 2020.
- [104] E L Rojas-calderón, E Torres-garcía, and O Ávila. Dose per unit cumulated activity (S-values) for e- and beta emitting radionuclides in cancer cell models calculated by Monte Carlo simulation. *Applied Radiation and Isotopes*, 90 :229–233, 2014.
- [105] Martin Šefl, Sébastien Incerti, George Papamichael, and Dimitris Emfietzoglou. Calculation of cellular S-values using Geant4-DNA : The effect of cell geometry. *Applied Radiation and Isotopes*, 104 :113–123, 2015.
- [106] Z. Cai, J.-P. Pignol, C. Chan, and R. M. Reilly. Cellular Dosimetry of ^{111}In Using Monte Carlo N-Particle Computer Code : Comparison with Analytic Methods and Correlation with In Vitro Cytotoxicity. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(3) :462–470, 2010.
- [107] K S Sastry. Biological effects of the Auger emitter iodine-125 : a review. Report No. 1 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Medical physics*, 19(6) :1361–1370, 1992.
- [108] R W Howell. The MIRD Schema : From Organ to Cellular Dimensions. *Journal of Nuclear Medicine*, 35(3) :531–533, 1994.
- [109] J. L. Humm and L. M. Cobb. Nonuniformity of tumor dose in radioimmunotherapy. *Journal of Nuclear Medicine*, 31(1) :75–83, 1990.

- [110] Vappu Reijonen, Liisa K Kanninen, Eero Hippeläinen, Yan-ru Lou, Eero Salli, Alexey Sofiev, Melina Malinen, Timo Paasonen, Marjo Yliperttula, Antti Kuronen, Sauli Savolainen, and Carlo Penelope. Physica Medica Multicellular dosimetric chain for molecular radiotherapy exemplified with dose simulations on 3D cell spheroids. *Physica Medica*, 40 :72–78, 2017.
- [111] Zhongli Cai, Niladri Chattopadhyay, Wenchao Jessica Liu, Conrad Chan, Jean-Philippe Pignol, and Raymond M Reilly. Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros : comparison with manual counting. *International journal of radiation biology*, 87(11) :1135–1146, nov 2011.
- [112] Zhongli Cai, Yongkyu Luke Kwon, and Raymond M. Reilly. Monte Carlo N-Particle (MCNP) Modeling of the Cellular Dosimetry of ^{64}Cu : Comparison with MIRDcell S Values and Implications for Studies of Its Cytotoxic Effects. *Journal of Nuclear Medicine*, 58(2) :339–345, 2017.
- [113] M Faraggi. Dosimétrie cellulaire en médecine nucléaire diagnostique : influence des émissions électroniques. *Radioprotection*, 33(3), 1998.
- [114] Robert Freudenberg, Maria Wendisch, Jörg Kotzerke, Universitätsklinikum Carl, and Gustav Carus. Geant4-Simulations for cellular dosimetry in nuclear medicine. *Zeitschrift für Medizinische Physik*, 21(4) :281–289, 2011.
- [115] Cheuk S. Kwok, William V. Prestwich, and Brian C. Wilson. Calculation of radiation doses for nonuniformly distributed β and γ radionuclides in soft tissue. *Medical Physics*, 12(4) :405–412, 1985.
- [116] Helena Uusijärvi, Peter Bernhardt, and Eva Forssell-Aronsson. Tumour control probability (TCP) for non-uniform activity distribution in radionuclide therapy. *Physics in medicine and biology*, 53(16) :4369–4381, aug 2008.
- [117] J L Humm and L M Chin. A model of cell inactivation by alpha-particle internal emitters. *Radiation research*, 134(2) :143–150, may 1993.
- [118] S Marcatili, A Pichard, A Courteau, R Ladjohounlou, I Navarro-Teulon, A Repetto-Llamazares, H Heyerdahl, J Dahle, J P Pouget, and M Bardiès. Realistic multi-cellular dosimetry for ^{177}Lu -labelled antibodies : model and application. *Physics in Medicine and Biology*, 61(19) :6935–6952, 2016.
- [119] E Hippeläinen, M Tenhunen, and A Sohlberg. Fast voxel-level dosimetry for ^{177}Lu labelled peptide treatments. *Physics in medicine and biology*, 60(17) :6685–6700, sep 2015.
- [120] R W Howell, D V Rao, and K S Sastry. Macroscopic dosimetry for radioimmunotherapy : nonuniform activity distributions in solid tumors. *Medical physics*, 16(1) :66–74, 1989.

- [121] Arthur Cole. Absorption of 20-eV to 50,000-eV Electron Beams in Air and Plastic. *Radiation Research*, 38(1) :7, 1969.
- [122] Panagiotis Papadimitroulas, George Loudos, George C Nikiforidis, and George C Kagadis. A dose point kernel database using GATE Monte Carlo simulation toolkit for nuclear medicine applications : comparison with other Monte Carlo codes. *Medical physics*, 39(8) :5238–5247, aug 2012.
- [123] Martin J. Berger. Improved point kernels for electron and beta-ray dosimetry. 1973.
- [124] E E Furhang, G Sgouros, and C S Chui. Radionuclide photon dose kernels for internal emitter dosimetry. *Medical physics*, 23(5) :759–764, may 1996.
- [125] F. Botta, A. Mairani, G. Battistoni, M. Cremonesi, A. Di Dia, A. Fassò, A. Ferrari, M. Ferrari, G. Paganelli, G. Pedroli, and M. Valente. Calculation of electron and isotopes dose point kernels with fluka Monte Carlo code for dosimetry in nuclear medicine therapy. *Medical Physics*, 38(7) :3944–3954, 2011.
- [126] D Emfietzoglou, K Kostarelos, P Hadjidoukas, C Bousis, a Fotopoulos, a Pathak, and H Nikjoo. Sub-cellular S-factors for low-energy electrons : a comparison of Monte Carlo simulations and continuous-slowing-down calculations. *International journal of radiation biology*, 84(12) :1034–44, 2008.
- [127] Behrooz Vaziri, Han Wu, Atam P. Dhawan, Peicheng Du, Roger W. Howell, Wesley E. Bolch, A. Bertrand Brill, Yuni K. Dewaraja, Mark P. Dunphy, Darrell R. Fisher, Ruby F. Meredith, George Sgouros, Barry W. Wessels, and Pat B. Zanzonico. MIRD pamphlet No. 25 : MIRDcell V2.0 software tool for dosimetric analysis of biologic response of multicellular populations. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(9) :1557–1564, 2014.
- [128] S Di Maria, A Belchior, Y Romanets, A Paulo, P Vaz, and Mcnp Monte Carlo. Monte Carlo dose distribution calculation at nuclear level for Auger-emitting radionuclide energies. *Applied Radiation and Isotopes*, 135(January) :72–77, 2018.
- [129] Mohammad Ali Tajik-Mansoury, Hossein Rajabi, and Hossein Mozdarani. Cellular s-value of beta emitter radionuclide's determined using Geant4 Monte Carlo toolbox, comparison to MIRD s-values. *Iranian Journal of Nuclear Medicine*, 24(1) :37–45, 2016.
- [130] T. André, F. Morini, M. Karamitros, R. Delorme, C. Le Loirec, L. Campos, C. Champion, J.-E. Groetz, M. Fromm, M.-C. Bordage, Y. Perrot, Ph. Barberet, M.A. Bernal, J.M.C. Brown, M.S. Deleuze, Z. Francis, V. Ivanchenko, B. Mascialino, C. Zacharatou, M. Bardiès, and S. Incerti. Comparison of Geant4-DNA simulation of S-values with other Monte Carlo codes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, 319 :87–94, 2014.

- [131] C. J. Tung, C. S. Liu, J. P. Wang, and S. L. Chang. Calculations of cellular microdosimetry parameters for alpha particles and electrons. *Applied Radiation and Isotopes*, 61(5) :739–743, 2004.
- [132] Christophe Champion, Paolo Zanotti-Fregonara, and Elif Hindié. CELLDOSE : a Monte Carlo code to assess electron dose distribution–S values for ^{131}I in spheres of various sizes. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 49(1) :151–157, jan 2008.
- [133] Wei Bo Li, Werner Friedland, Ekkehard Pomplun, Peter Jacob, Herwig G. Paretzke, Michael Lassmann, and Christoph Reiners. Track Structures and Dose Distributions from Decays of ^{131}I and ^{125}I in and around Water Spheres Simulating Micrometastases of Differentiated Thyroid Cancer . *Radiation Research*, 156(4) :419–429, 2001.
- [134] I. Gardin, M. Faraggi, E. Huc, and B. D. Bok. Modelling of the relationship between cell dimensions and mean electron dose delivered to the cell nucleus : application to five radionuclides used in nuclear medicine. *Physics in Medicine and Biology*, 40(6) :1001–1014, 1995.
- [135] Roger W Howell, Didier Rajon, and Wesley E Bolch. Monte Carlo simulation of irradiation and killing in three-dimensional cell populations with lognormal cellular uptake of radioactivity. *International journal of radiation biology*, 88(1-2) :115–122, jan 2012.
- [136] Manuel Bardies and Pascal Pihet. Dosimetry and Microdosimetry of Targeted Radiotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 6(14) :1469–1502, 2000.
- [137] Adriana Haimovitz-Friedman, Chu Cheng Kan, Desiree Ehleiter, Roger S. Persaud, Maureen Mc loughlin, Zvi Fuks, and Richard N. Kolesnick. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 180(2) :525–535, 1994.
- [138] Bas M. Bavelaar, Boon Q. Lee, Martin R. Gill, Nadia Falzone, and Katherine A. Vallis. Subcellular targeting of theranostic radionuclides. *Frontiers in Pharmacology*, 9(SEP) :1–17, 2018.
- [139] Jean Pierre Pouget, Alexandros G. Georgakilas, and Jean Luc Ravanat. Targeted and Off-Target (Bystander and Abscopal) Effects of Radiation Therapy : Redox Mechanisms and Risk/Benefit Analysis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(15) :1447–1487, 2018.
- [140] Lacave Roger. *Cancérologie fondamentale*. Collection Société française du cancer. John Libbey Eurotext, Montrouge, 2005.
- [141] C. Herskind and O. Westergaard. Variable Protection by OH Scavengers against Radiation-Induced Inactivation of Isolated Transcriptionally Active Chromatin : The Influence of Secondary Radicals. *Radiation Research*, 114(1) :28, 1988.

- [142] Elif Hindié. Radiobiologie radiopathologie radioprotection. Cours. <http://clement.ad.free.fr/fac/biophysique/coursradiobio.pdf>.
- [143] Lovisa Lundholm. Factors which influence cellular radiosensitivity, *CELOD lecture 2019*. Stockholm University.
- [144] Agnes Schipler and George Iliakis. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Research*, 41(16) :7589–7605, 2013.
- [145] Christophe Lavelle and Nicolas Foray. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage : From structural biology to radiobiology. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 49(1) :84–97, 2014.
- [146] Jan H.J. Hoeijmakers. Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(7-8) :460–462, 2007.
- [147] Stephen P Jackson and Jiri Bartek. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267) :1071–1078, oct 2009.
- [148] Travis H. Stracker, Ignasi Roig, Philip A. Knobel, and Marko Marjanović. The ATM signaling network in development and disease. *Frontiers in Genetics*, 4(MAR) :1–19, 2013.
- [149] Emmy P. Rogakou, Duane R. Pilch, Ann H. Orr, Vessela S. Ivanova, and William M. Bonner. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10) :5858–5868, 1998.
- [150] Michal Goldberg, Manuel Stucki, Jacob Falck, Damien D'Amours, Dinah Rahman, Darryl Pappin, Jiri Bartek, and Stephen P. Jackson. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature*, 421(6926) :952–956, 2003.
- [151] C Norbury. Animal Cell Cycles and Their Control. *Annual Review of Biochemistry*, 61(1) :441–470, 1992.
- [152] Kirsten Lauber, Anne Ernst, Michael Orth, Martin Herrmann, and Claus Belka. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Frontiers in oncology*, 2 :116, 2012.
- [153] Céline Bruyère and Laurent Meijer. Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6) :772–779, 2013.

- [154] H Christian Reinhardt and Björn Schumacher. The p53 network : cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in genetics : TIG*, 28(3) :128–136, mar 2012.
- [155] Bing Ma, Kurt D. Hankenson, James E. Dennis, Arnold I. Caplan, Steven A. Goldstein, and Michael R. Kilbourn. A simple method for stem cell labeling with fluorine 18. *Nuclear Medicine and Biology*, 32(7) :701–705, 2005.
- [156] Patrick Maier, Linda Hartmann, Frederik Wenz, and Carsten Herskind. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 2016.
- [157] Anthony V. D'Amico and W. Gillies McKenna. Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy. *Radiotherapy and Oncology*, 33(1) :3–10, 1994.
- [158] Scott W. Lowe, Earl H. Ruley, Tyler Jacks, and David E Housman. Measurement of intraocular pressure in healthy anesthetized horses during hoisting. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 44(3) :502–508, 1993.
- [159] Aldo Di Leonardo, Steven P. Linke, Kris Clarkin, and Geoffrey M. Wahl. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes and Development*, 8(21) :2540–2551, 1994.
- [160] Spiros Vamvakas, Esther H. Vock, and Werner K. Lutz. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, 27(2) :155–174, 1997.
- [161] Barry W Wessels, Mark W Konijnenberg, Roger G Dale, Hazel B Breitz, Marta Cremonesi, Ruby F Meredith, Alan J Green, Lionel G Bouchet, A Bertrand Brill, Wesley E Bolch, George Sgouros, and Stephen R Thomas. MIRD Pamphlet No . 20 : The Effect of Model Assumptions on Kidney Dosimetry and Response — Implications for Radionuclide Therapy *. 49(20), 2017.
- [162] George Sgouros, Susan J. Knox, Michael C. Joiner, William F. Morgan, and Amin I. Kassis. MIRD continuing education : Bystander and low-dose-rate effects : Are these relevant to radionuclide therapy? *Journal of Nuclear Medicine*, 48(10) :1683–1691, 2007.
- [163] Shoucheng Ning and Susan J. Knox. G 2 /M-Phase Arrest and Death by Apoptosis of HL60 Cells Irradiated with Exponentially Decreasing Low-Dose-Rate Gamma Radiation. *Radiation Research*, 151(6) :659, 1999.
- [164] Hideaki Takata, Tomo Hanafusa, Toshiaki Mori, Mari Shimura, Yutaka Iida, Kenichi Ishikawa, Kenichi Yoshikawa, Yuko Yoshikawa, and Kazuhiro Maeshima. Chromatin Compaction Protects Genomic DNA from Radiation Damage. *PLoS ONE*, 8(10) :1–11, 2013.

- [165] J. Nygren, M. Ljungman, and M. Ahnström. Chromatin structure and radiation-induced DNA Strand breaks in human cells : Soluble scavengers and DNA-bound proteins offer a better protection against single- than double-strand breaks. *International Journal of Radiation Biology*, 68(1) :11–18, 1995.
- [166] Peter Svoboda and Mats Harms-Ringdahl. Influence of Chromatin Structure and Radical Scavengers on Yields of Radiation-Induced 8-oxo-dG and DNA Strand Breaks in Cellular Model Systems. *Radiation Research*, 164(3) :303–311, 2005.
- [167] L. Schneider, M. Fumagalli, and F. D. Adda Di Fagagna. Terminally differentiated astrocytes lack DNA damage response signaling and are radioresistant but retain DNA repair proficiency. *Cell Death and Differentiation*, 19(4) :582–591, 2012.
- [168] T T PUCK and P I MARCUS. Action of x-rays on mammalian cells. *The Journal of experimental medicine*, 103(5) :653–666, may 1956.
- [169] Albrecht M. Kellerer and Harald A. Rossi. *The theory of dual radiation action*, volume 27. 1972.
- [170] L. Bodgi, A. Canet, A. Granzotto, M. Britel, A. Puisieux, M. Bourguignon, and N. Foray. L'énigme de l'interprétation biologique du modèle linéaire-quadratique enfin résolue ? Une synthèse pour les non-mathématiciens. *Cancer/Radiothérapie*, 20(4) :314–321, 2016.
- [171] D E Lea and D G Catcheside. The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Journal of Genetics*, 44(2) :216–245, 1942.
- [172] Yaser H Gholami, Kathy P Willowson, Nicholas J Forwood, Rozelle Harvie, Nicholas Hardcastle, Regina Bromley, HyunJu Ryu, Samuel Yuen, Viive M Howell, Zdenka Kuncic, and Dale L Bailey. Comparison of radiobiological parameters for (90)Y radionuclide therapy (RNT) and external beam radiotherapy (EBRT) in vitro. *EJNMMI physics*, 5(1) :18, sep 2018.
- [173] Suzanne Verwijnen, Astrid Capello, Bert Bernard, Gerard Van Den Aardweg, Mark Konijnenberg, Wout Breeman, Eric Krenning, and Marion De Jong. Low-dose-rate irradiation by ¹³¹I versus high-dose-rate external-beam irradiation in the rat pancreatic tumor cell line CA20948. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 19(3) :285–292, 2004.
- [174] Robert Freudenberg, Maria Wendisch, Roswitha Runge, Gerd Wunderlich, and Jörg Kotzerke. Reduction in clonogenic survival of sodium-iodide symporter (NIS)-positive cells following intracellular uptake of ^{99m}Tc versus ¹⁸⁸Re. *International Journal of Radiation Biology*, 88(12) :991–997, 2012.
- [175] Ute Maucksch, Roswitha Runge, Gerd Wunderlich, Robert Freudenberg, Anne Naumann, and Jörg Kotzerke. Comparison of the radiotoxicity of the (99m)Tc-labeled compounds (99m)Tc-pertechnetate,

- (99m)Tc-HMPAO and (99m)Tc-MIBI. *International journal of radiation biology*, 92(11) :698–706, nov 2016.
- [176] Nadia Falzone, José M Fernández-Varea, Glenn Flux, and Katherine A Vallis. Monte Carlo Evaluation of Auger Electron-Emitting Theranostic Radionuclides. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 56(9) :1441–1446, sep 2015.
- [177] Robert F Hobbs, Sébastien Baechler, De-Xue Fu, Caroline Esaias, Martin G Pomper, Richard F Ambinder, and George Sgouros. A model of cellular dosimetry for macroscopic tumors in radiopharmaceutical therapy. *Medical physics*, 38(6) :2892–2903, jun 2011.
- [178] R. Freudenberg, R. Runge, U. Maucksch, V. Berger, and J. Kotzerke. On the dose calculation at the cellular level and its implications for the RBE of 99mTc and 123I. *Medical Physics*, 41(6), 2014.
- [179] Tapan K. Nayak, Jeffrey P. Norenberg, Tamara L. Anderson, Eric R. Prossnitz, Michael G. Stabin, and Robert W. Atcher. Somatostatin-receptor-targeted α -emitting 213Bi is therapeutically more effective than β -emitting 177Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Nuclear Medicine and Biology*, 34(2) :185–193, 2007.
- [180] Ho Sze Chan, Erik De Blois, Alfred Morgenstern, Frank Bruchertseifer, Marion De Jong, Wouter Bree-man, and Mark Konijnenberg. In Vitro comparison of 213Bi- and 177Lu-radiation for peptide receptor radionuclide therapy. *PLoS ONE*, 12(7) :1–16, 2017.
- [181] L. Sokoloff, M. Reivich, C. Kennedy, M. H. Des Rosiers, C. S. Patlak, K. D. Pettigrew, O. Sakurada, and M. Shinohara. the [14C]Deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization : Theory, Procedure, and Normal Values in the Conscious and Anesthetized Albino Rat. *Journal of Neurochemistry*, 28(5) :897–916, 1977.
- [182] Wouter A P Breeman, Erik De Blois, Ho Sze Chan, Mark Konijnenberg, Dik J. Kwekkeboom, and Eric P. Krenning. 68Ga-labeled DOTA-peptides and 68Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography : Current status of research, clinical applications, and future Perspectives. *Seminars in Nuclear Medicine*, 41(4) :314–321, 2011.
- [183] Johannes Notni, Karolin Pohle, and Hans-Jürgen Wester. Comparative gallium-68 labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-peptides : practical consequences for the future of gallium-68-PET. *EJNMMI research*, 2(1) :28, jun 2012.
- [184] Krzysztof Kilian. Ga-DOTA and analogs : Current status and future perspectives. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 19 :S13–S21, 2014.

- [185] Hans Jürgen Biersack, Leonard M. Freeman, Lionel S. Zuckier, and Frank Grünwald. *Clinical nuclear medicine*. 2007.
- [186] J L Humm. dosimetry of auger-electron-emitting radionuclides : report 3 of AAPM nuc Med Task group 6, 1994.
- [187] John S Hendricks, Gregg W Mckinney, Michael L Fensin, Michael R James, Russell C Johns, Joe W Durkee, Joshua P Finch, Denise B Pelowitz, Laurie S Waters, M William Johnson, and Franz X Gallmeier. MCNPX 2.6.0 Extensions. *Los Alamos National Laboratory*, page 73, 2008.
- [188] M J Berger. Distribution of absorbed dose around point sources of electrons and beta particles in water and other media. *J. Nucl. Med., Suppl. 12 : No. 5, 5-23(Mar 1971)*.
- [189] Sophie Chiavassa. *Développement d'un outil dosimétrique personnalisé pour la radioprotection en contamination interne et la radiothérapie vectorisée en médecine nucléaire*. PhD thesis, Université Paul Sabatier, 2005.
- [190] Lev Davidovich Landau. On the energy loss of fast particles by ionization. *J. Phys.*, 8(4) :201–205, 1944.
- [191] O. Blunck and S. Leisegang. Zum Energieverlust schneller Elektronen in dünnen Schichten. *Zeitschrift für Physik*, 128(4) :500–505, 1950.
- [192] N. Reynaert, H. Palmans, H. Thierens, and R. Jeraj. Parameter dependence of the MCNP electron transport in determining dose distributions. *Medical Physics*, 29(10) :2446–2454, 2002.
- [193] Daniel Delacroix, Jean Paul Guerre, and Paul Leblanc. Daniel Delacroix, Jean-Paul Guerre, Paul Leblanc - Guide de radioprotection et des radionucléides.pdf.
- [194] ICRP. Radionuclide transformations : Energy and intensity of emissions annals of the icrp. *Oxford : Pergamon Press*, 1 1983.
- [195] Mike Makrigiorgos, James Adelstein, and Amin Kassis. Limitations of conventional internal dosimetry at the cellular level. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 30 :1856–64, 12 1989.
- [196] Laura Dean. Blood and the cells it contains. *Blood Groups and Red Cell Antigens*, (Md) :1–6, 2005.
- [197] C Parmentier, J Chavaudra, and M Meignan. Dose received by lymphocytes in the course of labeling techniques using Tc-99m., feb 1978.

- [198] S. J. Adelstein, A. J. Green, R. W. Howell, J. L. Humm, P. K. Leichner, J. A. O'Donoghue, S.-E. Strand, and B. W. Wessels. Absorbed-Dose Specification in Nuclear Medicine : Abstract. *Journal of the ICRU*, 2(1) :9–9, 2002.
- [199] Prasad V.S.V. Neti and Roger W. Howell. Isolating effects of microscopic nonuniform distributions of ¹³¹I on labeled and unlabeled cells. *Journal of Nuclear Medicine*, 45(6) :1050–1058, 2004.
- [200] Joseph A. O'Donoghue. Implications of nonuniform tumor doses for radioimmunotherapy. *Journal of Nuclear Medicine*, 40(8) :1337–1341, 1999.
- [201] PhD Prasad V.S.V. Neti, PhD and Roger W. Howell. When May a Nonuniform Distribution of ¹³¹I Be Considered Uniform ? An Experimental Basis for Multicellular Dosimetry. *Bone*, 23(1) :1–7, 2003.
- [202] L. A. Forstrom, B. P. Mullan, J. C. Hung, V. J. Lowe, and L. M. Thorson. ¹⁸F-FDG labelling of human leukocytes. *Nuclear Medicine Communications*, 21(7) :691–694, 2000.
- [203] B. J. Yoon, M. S. Jhon, and H. Eyring. Radial distribution function of liquid argon according to significant structure theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11) :6588–6591, 1981.
- [204] Jean Pierre Hansen and I.R. McDonald. *Theory of Simple Liquids, 3rd edition*. 1976.
- [205] Boris D Lubachevsky, Frank H Stillinger, and Elliot N Pinson. Disks vs . Spheres : Contrasting Properties of Random Packings. 64 :501–524, 2000.
- [206] Manon Jacquemin, David Broggio, and Didier Franck. Development of a dosimetric model for in vitro labelled cells with $\beta +$ emitters in PET tracking studies. 64(April), 2019.
- [207] Steve Plimpton. Fast Parallel Algorithms for Short – Range Molecular Dynamics. 117(June 1994) :1–42, 1995.
- [208] Kirill Lykov, Xuejin Li, Huan Lei, Igor V. Pivkin, and George Em Karniadakis. Inflow/Outflow Boundary Conditions for Particle-Based Blood Flow Simulations : Application to Arterial Bifurcations and Trees. *PLoS Computational Biology*, 11(8) :1–13, 2015.
- [209] Mark J. Stevens, Jan H. Hoh, and Thomas B. Woolf. Insights into the molecular mechanism of membrane fusion from simulation : Evidence for the association of splayed tails. *Physical Review Letters*, 91(18) :1–4, 2003.
- [210] Richard H. Gee, Naida Lacevic, and Laurence E. Fried. Atomistic simulations of spinodal phase separation preceding polymer crystallization. *Nature Materials*, 5(1) :39–43, 2006.

- [211] Anoosheh Niavarani and Nikolai V. Priezjev. Rheological study of polymer flow past rough surfaces with slip boundary conditions. *Journal of Chemical Physics*, 129(14) :1–10, 2008.
- [212] A. Yu Kuksin, G. E. Norman, V. V. Stegailov, and A. V. Yanilkin. Surface melting of superheated crystals. Atomistic simulation study. *Computer Physics Communications*, 177(1-2 SPEC. ISS.) :34–37, 2007.
- [213] James W. Landry, Gary S. Grest, Leonardo E. Silbert, and Steven J. Plimpton. Confined granular packings : Structure, stress, and forces. *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 67(4) :9, 2003.
- [214] Stephane Tesson. *Un champ de force polarisable pour l'étude des argiles à l'échelle moléculaire*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, 2016.
- [215] R J BELL. Pair Distribution Function for Particles in a Box. *Nature*, 218(5145) :985–986, 1968.
- [216] Michael Hofmann, Kai C. Wollert, Gerd P. Meyer, Alix Menke, Lubomir Arseniev, Bernd Hertenstein, Arnold Ganser, Wolfram H. Knapp, and Helmut Drexler. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 111(17) :2198–2202, 2005.
- [217] Tanmoy Mondal, Amit Nautiyal, Arnab Patwari, Amenti Ozukum, Deepanjan Mitra, and Alpana Goel. DNA double strand breaks , repair and apoptosis following 511 keV γ - rays exposure using 18 fluorine positron emitter : an in-vitro study DNA double strand breaks , repair and apoptosis following 511 keV γ -rays exposure using 18 fluorine positron emitter : an in-vitro study. 2018.
- [218] Corlien A. Aarnoudse, Margreet Krüse, Renate Konopitzky, Nathalie Brouwenstijn, and Peter I. Schrier. TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning. *International Journal of Cancer*, 99(1) :7–13, 2002.
- [219] Sandra Roskopf, Sabrina Jutz, Alina Neunkirchner, Martín R. Candia, Beatrice Jahn-Schmid, Barbara Bohle, Winfried F. Pickl, and Peter Steinberger. Creation of an engineered APC system to explore and optimize the presentation of immunodominant peptides of major allergens. *Scientific Reports*, 6(August) :1–16, 2016.
- [220] G. Stöcklin K. Hamacher, H.H. Coenen. Synthesis D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.*, 27(February) :235–238, 1986.
- [221] Fazekas de St Groth. The evaluation of limiting dilution assays. *Journal of immunological methods*, 49(2) :R11–23, 1982.

- [222] Vladimir Spielmann, Wei Bo Li, Maria Zankl, Uwe Oeh, and Christoph Hoeschen. Uncertainty quantification in internal dose calculations for seven selected radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(1) :122–128, 2016.
- [223] Johan Gustafsson, Gustav Brodin, Maurice Cox, Michael Ljungberg, Lena Johansson, and Katarina Sjögreen Gleisner. Uncertainty propagation for SPECT/CT-based renal dosimetry in ¹⁷⁷Lu peptide receptor radionuclide therapy. *Physics in Medicine and Biology*, 60(21) :8329–8346, 2015.
- [224] Michael G. Stabin. Uncertainties in internal dose calculations for radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(5) :853–860, 2008.
- [225] Jonathan I. Gear, Maurice G. Cox, Johan Gustafsson, Katarina Sjögreen Gleisner, Iain Murray, Gerhard Glatting, Mark Konijnenberg, and Glenn D. Flux. EANM practical guidance on uncertainty analysis for molecular radiotherapy absorbed dose calculations. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 45(13) :2456–2474, 2018.
- [226] Yuanming Feng, Ning Zhang, Kenneth M. Jacobs, Wenhuan Jiang, Li V. Yang, Zhigang Li, Jun Zhang, Jun Q. Lu, and Xin Hua Hu. Polarization imaging and classification of Jurkat T and Ramos B cells using a flow cytometer. *Cytometry Part A*, 85(9) :817–826, 2014.
- [227] Daniel A. Starr. HHS Public Access. *Physiology & behavior*, 176(1) :139–148, 2011.
- [228] G. D. Scott and Kilgour D. M. The density of random close packing of spheres. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 2(6) :863–866, jun 1969.
- [229] J. Y. Paik, K. H. Lee, S. S. Byun, Y. S. Choe, and B. T. Kim. Use of insulin to improve [¹⁸F]fluorodeoxyglucose labelling and retention for in vivo positron emission tomography imaging of monocyte trafficking. *Nuclear Medicine Communications*, 23(6) :551–557, 2002.
- [230] L. Faivre, M. Chaussard, L. Vercellino, V. Vanneaux, B. Hosten, K. Teixeira, V. Parietti, P. Merlet, L. Sarda-Mantel, N. Rizzo-Padoin, and J. Larghero. ¹⁸F-FDG labelling of hematopoietic stem cells : Dynamic study of bone marrow homing by PET/CT imaging and impact on cell functionality. *Current Research in Translational Medicine*, 64(3) :141–148, 2016.
- [231] Guillem Pratx, Kai Chen, Conroy Sun, Lynn Martin, Colin M Carpenter, Peter D Olcott, and Lei Xing. Radioluminescence Microscopy : Measuring the Heterogeneous Uptake of Radiotracers in Single Living Cells. *PLOS ONE*, 7(10) :e46285, oct 2012.
- [232] R. G. Dale. A graphical method to simplify the application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated radiotherapy. *British Journal of Radiology*, 59(707) :1111–1115, 1986.

- [233] Yasushi Kataoka, Vytautas P Bindokas, Ryan C Duggan, Jeffrey S Murley, and David J Grdina. Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells. *Journal of radiation research*, 47(3-4) :245–257, nov 2006.
- [234] T Kogoma. Stable DNA replication : interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(2) :212–238, 1997.
- [235] Alexander Rühle, Oliver Xia, Ramon Lopez Perez, Thuy Trinh, Wiltrud Richter, Anna Sarnowska, Patrick Wuchter, Jürgen Debus, Rainer Saffrich, Peter E Huber, and Nils H Nicolay. The Radiation Resistance of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Is Independent of Their Tissue of Origin. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 100(5) :1259–1269, apr 2018.
- [236] Randi G. Syljuåsen, William H. McBride, and Randi G. Syljuasen. Radiation-Induced Apoptosis and Cell Cycle Progression in Jurkat T Cells. *Radiation Research*, 152(3) :328, 1999.
- [237] Amelie Freneau. *Étude comparative des effets moléculaires et cellulaires induits par des rayonnements X de différentes énergies*. PhD thesis, Université Paris-Sud, 2019.
- [238] Andries R Jonkhoff, Erik B Dieren, Peter C Huijget, Richard T Versteegh, A V D Arjan, and G. J. J Teule. Biological effectiveness of 67-gallium decay in HL60 cells. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 30(1) :117–124, 1994.
- [239] Cataldi Amelia, Viviana Di Giacomo, Monica Rapino, Susi Zara, and Rosa Alba Rana. Ionizing radiation induces apoptotic signal through protein kinase C δ (delta) and survival signal through Akt and cyclic-nucleotide response element-binding protein (CREB) in Jurkat T cells. *Biological Bulletin*, 217(2) :202–212, 2009.
- [240] M Mori, M A Benotmane, D Vanhove, P Van Hummelen, E L Hooghe-peters, and C Desaintes. Effect of ionizing radiation on gene expression in CD4 + T lymphocytes and in Jurkat cells : unraveling novel pathways. 61 :1955–1964, 2004.
- [241] Mohammad Reza Ahmadianpour, Parviz Abdolmaleki, Seyed Javad Mowla, and Saman Hosseinkhani. Gamma radiation alters cell cycle and induces apoptosis in p53 mutant E6.1 Jurkat cells. *Applied Radiation and Isotopes*, 71(1) :29–33, 2013.
- [242] Amelia CATALDI, Viviana di GIACOMO, Monica RAPINO, Domenico GENOVESI, and Rosa Alba RANA. Cyclic Nucleotide Response Element Binding Protein (CREB) Activation Promotes Survival Signal in Human K562 Erythroleukemia Cells Exposed to Ionising Radiation/Etoposide Combined Treatment. *Journal of Radiation Research*, 47(2) :113–120, 2006.

- [243] B Furnari, N Rhind, and P Russell. Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331) :1495–1497, sep 1997.
- [244] Y Sanchez, C Wong, R S Thoma, R Richman, Z Wu, H Piwnica-Worms, and S J Elledge. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals : linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331) :1497–1501, sep 1997.
- [245] Susan J. Knox, William Sutherland, and Michael L. Goris. Correlation of Tumor Sensitivity to Low-Dose-Rate Irradiation with G₂/M-Phase Block and Other Radiobiological Parameters. *Radiation Research*, 135(1) :24, 1993.
- [246] R G Dale and B Jones. Review article The clinical radiobiology of brachytherapy. 71 :465–483, 1998.
- [247] Michael C. Joiner, Brian Marples, Philippe Lambin, Susan C. Short, and Ingela Turesson. Low-dose hypersensitivity : Current status and possible mechanisms. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 49(2) :379–389, 2001.
- [248] Timothy M. Pawlik and Khandan Keyomarsi. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 59(4) :928–942, 2004.
- [249] Natalia S. Pellegata, Ronald J. Antoniono, J. Leslie Redpath, and Eric J. Stanbridge. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest : A reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26) :15209–15214, 1996.
- [250] Hatsumi Nagasawa, Chuan Yuan Li, John B. Little, Amy C. Imrich, and Carl G. Maki. Relationship between Radiation-induced G₁ Phase Arrest and p53 Function in Human Tumor Cells. *Cancer Research*, 55(9) :1842–1846, 1995.
- [251] Alexandre Pichard, Sara Marcatili, Jihad Karam, Julie Constanzo, Riad Ladjohounlou, Alan Courteau, Marta Jarlier, Nathalie Bonnefoy, Sebastian Patzke, Vilde Stenberg, Peter Coopman, Guillaume Cartron, Isabelle Navarro-teulon Ada, Repetto-Illamazares Helen Heyerdahl, Jostein Dahle, Manuel Bardiès, and Jean-pierre Pouget. The therapeutic effectiveness of 177 Lu-lilotomab in B-cell non-Hodgkin lymphoma involves modulation of G₂ / M cell cycle arrest. *Leukemia*, pages 1315–1328, 2020.
- [252] Judit P. Banáth, Susan H. MacPhail, and Peggy L. Olive. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Research*, 64(19) :7144–7149, 2004.

- [253] S. H. Macphail, J. P. Banáth, T. Y. Yu, E. H.M. Chu, H. Lambur, and P. L. Olive. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *International Journal of Radiation Biology*, 79(5) :351–359, 2003.
- [254] Markus Löbrich, Atsushi Shibata, Andrea Beucher, Anna Fisher, Michael Ensminger, Aaron A Goodarzi, Olivia Barton, and Penny A Jeggo. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair : strengths, limitations and optimization. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(4) :662–669, feb 2010.
- [255] Zbigniew Darzynkiewicz, Xuan Huang, and Masaki Okafuji. Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 314 :81–93, 2006.
- [256] Peggy L. Olive. DNA organization affects cellular radiosensitivity and detection of initial DNA Strand breaks. *International Journal of Radiation Biology*, 62(4) :389–396, 1992.
- [257] Áine M. Prendergast, Séverine Cruet-Hennequart, Georgina Shaw, Frank P. Barry, and Michael P. Carty. Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or γ -irradiation. *Cell Cycle*, 10(21) :3768–3777, 2011.
- [258] Tara Sugrue, Noel F Lowndes, and Rhodri Ceredig. Mesenchymal stromal cells : radio-resistant members of the bone marrow. *Immunology and cell biology*, 91(1) :5–11, jan 2013.
- [259] Nils H Nicolay, Ramon Lopez Perez, Rainer Saffrich, and Peter E Huber. Radio-resistant mesenchymal stem cells : mechanisms of resistance and potential implications for the clinic. *Oncotarget*, 6(23) :19366–19380, aug 2015.
- [260] Miao Fen Chen, Ching Tai Lin, Wen Cheng Chen, Cheng Ta Yang, Chih Cheng Chen, Shuen Kuei Liao, Jacqueline Ming Liu, Chang Hsien Lu, and Kuan Der Lee. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 66(1) :244–253, 2006.
- [261] E. Dikomey, J. Dahm-Daphi, I. Brammer, R. Martensen, and B. Kaina. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double- strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International Journal of Radiation Biology*, 73(3) :269–278, 1998.
- [262] Reinhard Wurm, Neil G. Burnet, Nisha Duggal, John R. Yarnold, and John H. Peacock. Cellular radiosensitivity and dna damage in primary human fibroblasts. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 30(3) :625–633, 1994.

- [263] Fumio Suzuki, Yukimi Akimoto, Kaori Sasai, and Hirohiko Yajima. Cellular radiosensitivity and cell-type-specific activation of apoptosis signaling pathways. *International Congress Series*, 1258(C) :233–237, 2003.
- [264] Tomohiro Yoshikawa, Genro Kashino, Koji Ono, and Masami Watanabe. Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities. *Journal of Radiation Research*, 50(2) :151–160, 2009.
- [265] Clément Devic, Mélanie L. Ferlazzo, and Nicolas Foray. Influence of individual radiosensitivity on the adaptive response phenomenon : Toward a mechanistic explanation based on the nucleo-shuttling of ATM protein. *Dose-Response*, 16(3) :1–11, 2018.
- [266] Boon Q Lee, Elliot M Abbott, Sarah Able, James M Thompson, Mark A Hill, Christiana Kartsonaki, Katherine A Vallis, and Nadia Falzone. Radiosensitivity of colorectal cancer to 90 Y and the radiobiological implications for radioembolisation therapy. *Physics in Medicine & Biology*, 64 :ab23c4, 2019.

Annexe 1.

1 Auto-absorption du ^{18}F , ^{64}Cu et ^{68}Ga : pourcentage de contribution selon le type de particules

Tableau A1 – Pourcentage de contribution des différents rayonnements émis par les radionucléides ^{64}Cu , ^{18}F et ^{68}Ga à l'auto-absorption pour différentes combinaisons source←cible. N = noyau ; Cy = cytoplasme ; Sc = surface cellulaire.

	Auto-absorption - Contribution (%)								
	^{18}F			^{68}Ga			^{64}Cu		
	(N ← N)	(N ← Cy)	(N ← Sc)	(N ← N)	(N ← Cy)	(N ← Sc)	(N ← N)	(N ← Cy)	(N ← Sc)
Photons	1,07	0,90	1,05	1,53	1,07	1,35	0,49	0,78	1,52
Electrons Auger et Cl	0	0	0	40,85	21,56	6,18	76,73	51,77	11,33
β^+/β^-	98,93	99,10	98,95	58,25	77,37	92,47	22,78	47,46	87,15

2 Tir croisé du ^{18}F , ^{64}Cu et ^{68}Ga : pourcentage de contribution selon le type de particules

Tableau A2 – Pourcentage de contribution des différents rayonnements émis par les radionucléides ^{64}Cu , ^{18}F et ^{68}Ga au tir croisé pour un cluster compact de cellules dans un réseau cubique et pour différentes combinaisons source←cible. N = noyau ; Cy = cytoplasme ; Sc = surface cellulaire.

	Tir croisé - Contribution (%)								
	^{18}F			^{68}Ga			^{64}Cu		
	(N ← N)	(N ← Cy)	(N ← Sc)	(N ← N)	(N ← Cy)	(N ← Sc)	(N ← N)	(N ← Cy)	(N ← Sc)
Photons	2,17	2,15	2,15	1,8	1,8	1,8	2,62	2,65	2,62
Electrons Auger et Cl	0	0	0	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$4,9 \cdot 10^{-4}$
β^+/β^-	97,8	97,8	97,9	98,2	98,2	98,2	97,4	97,3	97,4

Annexe 2.

1 Application de la méthode RDF à une distribution hétérogène de cellules : simulation directe avec LAMMPS

Pour modéliser les différentes populations de cellules dans LAMMPS, nous avons procédé comme suit :

- Dans un premier script, $N_{clusters}$ coordonnées de clusters ont été générées de manière aléatoire et sauvées dans un fichier .XYZ
- Dans un second script, $N_{clusters}$ régions sphériques de rayon $r_{cluster}$ ont été définies aux coordonnées générées à partir du script 1. Les cellules ont ensuite été créées dans la région des clusters selon un réseau *cfc*, en utilisant les commandes *lattice* et *create atoms*. Le paramètre de réseau a été fixé à une valeur de $a = \sqrt{2}r_c$ ($\rho = 4a^3$) pour obtenir une configuration compacte. $N_{isolé}$ cellules isolées ont ensuite été créées dans une région définie par l'ensemble de la boîte de simulation à l'exception des zones où se trouvent les clusters, en utilisant la commande *out*.

Les cellules appartenant aux clusters et les cellules isolées ont été assignées à un type de particule différent : **1** et **2**, respectivement.

Le calcul de la dose absorbée moyenne a été réalisé en considérant deux types de cellule cible : (i) une cellule cible provenant d'un cluster ($\overline{D}_1^{croisé}$), et (ii) une cellule cible provenant de la population de cellules isolées ($\overline{D}_2^{croisé}$).

Chaque dose peut être décomposée en plusieurs contributions :

$$\overline{D}_1^{croisé} = \overline{D}_{1\leftarrow 2}^{croisé} + \overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé} \quad (4.24)$$

$$\overline{D}_2^{croisé} = \overline{D}_{2\leftarrow 1}^{croisé} + \overline{D}_{2\leftarrow 2}^{croisé} \quad (4.25)$$

où $i \leftarrow j$ représente la contribution de l'activité dans les cellules de type j aux cellules de type i .

A noter que la composante $\overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé}$ peut elle-même être séparée en deux contributions : la contribution provenant de l'activité dans le cluster auquel la cellule cible appartient (**TC**) et celle provenant de l'activité dans les cellules appartenant aux clusters avoisinants (**SC**) :

$$\overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé} = \overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé}(TC) + \overline{D}_{1\leftarrow 1}^{croisé}(SC) \quad (4.26)$$

le tir croisé peut s'écrire en fonction des fonctions de distribution radiale $g_{1\leftarrow 2}$, $g_{1\leftarrow 1}$, $g_{2\leftarrow 1}$ and $g_{2\leftarrow 2}$ tel que :

$$\overline{D}_1^{croisé} = 4\pi\rho\tilde{a}_{cell} \int dr.r^2 S(r)(g_{1\leftarrow 1}^{TC}(r) + g_{1\leftarrow 1}^{SC}(r) + g_{1\leftarrow 2}(r)) \quad (4.27)$$

$$\overline{D}_2^{croisé} = 4\pi\rho\tilde{a}_{cell} \int dr.r^2 S(r)(g_{2\leftarrow 2}(r) + g_{2\leftarrow 1}(r)) \quad (4.28)$$

où ρ est la densité globale du système, égale à $\rho = \frac{N_1.N_2}{V}$.

LAMMPS permet de calculer des *rdfs* "partielles" en spécifiant en argument de la commande *compute rdf* les types de cellules à considérer, de façon à ce que seules les distances par paires entre les cellules de type i les cellules de type j soient comptabilisées.

Sur cette base, trois *rdf* partielles ont été générées avec des conditions aux limites périodiques : g_{11} , g_{22} et g_{12} .

A noter que LAMMPS normalise systématiquement les histogrammes par le nombre total de cellules dans le système.

Ainsi, nous avons pu calculer les fonctions $g_{i\leftarrow j}$ dérivées de g_{ij} avec les relations suivantes :

$$g_{1\leftarrow 1} = g_{11} * \frac{N_1 + N_2}{N_1} \quad (4.29)$$

$$g_{2\leftarrow 2} = g_{22} * \frac{N_1 + N_2}{N_2} \quad (4.30)$$

$$g_{1\leftarrow 2} = g_{12} * \frac{N_1 + N_2}{N_1} * \frac{1}{2} \quad (4.31)$$

$$g_{2\leftarrow 1} = g_{12} * \frac{N_1 + N_2}{N_2} * \frac{1}{2} \quad (4.32)$$

où N_1 et N_2 représentent le nombre de cellules de type 1 et 2, respectivement. Les fonction partielles g_{ij} sont normalisées par le nombre de cellules cibles impliquées. De plus, comme g_{ij} inclut à la fois les contributions $i \rightarrow j$ et $j \rightarrow i$, le nombre de paires est doublé. Un facteur 12 a donc été spécifiquement appliqué à g_{12} pour corriger cela. La composante $g_{1\leftarrow 1}$ inclut à la fois les contributions **TC** et **SC**.

2 Cinétique des distributions cellulaires

Dans le schéma simplifié du MIRD utilisé tout au long de ce travail, le paramètre temps est contenu dans l'activité cumulée dans la région source \tilde{A}_{r_s} tandis que le facteur S qui dépend de la géométrie est supposé indépendant au cours du temps.

Si on souhaite calculer la dose absorbée en prenant en compte l'évolution réaliste des distributions de cellules au cours du temps, il faut alors exprimer la dose ainsi :

$$\bar{D}^{croisé} = \int_0^T dt \bar{D}(t) \quad (4.33)$$

où la dose moyenne absorbée en un temps t vaut :

$$\bar{D}(t) = 4\pi\rho \int dt dr . r^2 a_{cel}(t) S(r) g(r, t) \quad (4.34)$$

Considérons à présent le cas du radiomarquage de cellules *in vitro* au ^{18}F -FDG de période physique T_p , supposant qu'à un instant $t = 0$ une activité A_0 est administrée dans une culture de N cellules en suspension durant un temps d'incubation T_{incub} . Si l'on suppose que l'efficacité d'incorporation à $t = T_{incub}$ vaut eff , et que l'activité s'incorpore linéairement en fonction du temps, alors l'activité présente dans une cellule à un instant t quelconque vaut :

$$a_{cel}(t) = eff \frac{t}{T_{incub}} \frac{A_0}{N} \exp\left(-\frac{\ln(2) T_{incub}}{T_p}\right) \quad (4.35)$$

Dans le cas concret d'une incubation de cellules en suspension dans une solution radioactive, on peut imaginer deux scénarios :

- La solution est régulièrement agitée : dans ce cas, la modélisation du système par une distribution aléatoire uniforme sera appropriée, exceptée qu'on ne travaillera plus à partir d'une moyenne statistique sur un échantillon de configurations aléatoires, mais sur un ensemble configurations reflétant leur évolution au cours du temps.
- Les cellules ne sont pas agitées : soumises à la pesanteur, celles-ci sédimenteront progressivement au fond du tube.

Nous nous sommes intéressés à la modélisation de la sédimentation des cellules et à l'impact de la considération ou non de ce processus dans le calcul du tir croisé.

Sédimentation des cellules dans un milieu liquide

2.1 Aspects théoriques

Considérons une cellule suspendue dans une solution aqueuse. Si l'on néglige les mouvements du fluide contenant la cellule, alors trois forces seront appliquées à celle-ci selon l'axe vertical : la force de gravité p , la poussée d'Archimède A ainsi que les forces de frottement f engendrées par le mouvement de la cellule.

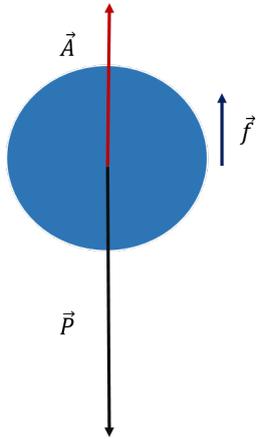


FIGURE A1 – Représentation des forces appliquées à une cellule dans le cas d'une sédimentation dans un milieu

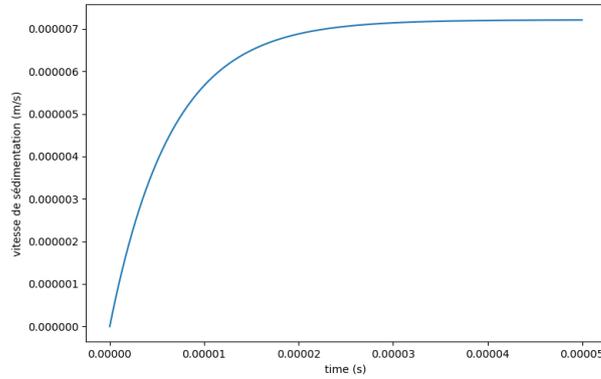


FIGURE A2 – Vitesse de sédimentation

Le poids de la cellule vaut simplement sa masse multipliée par l'accélération de la pesanteur terrestre g , tandis que la poussée d'Archimède viendra appliquer une force de sens opposé à la gravité, et qui correspond au poids du fluide déplacé par la présence de la cellule :

$$p = \frac{4\pi}{3} r_c^3 \rho_c g \quad (4.36)$$

$$A = -\frac{4\pi}{3} r_c^3 \rho_{milieu} g \quad (4.37)$$

où ρ_c est la densité massique d'une cellule, et ρ_{milieu} celle du fluide. La force de frottement dépend de la viscosité du fluide η , de la vitesse de la cellule v et de sa surface de contact effective avec le fluide telle que :

$$f = -Kv^n \quad (4.38)$$

Pour des petites vitesses, l'ordre de proportionnalité n vaut souvent 1. Pour des corps sphériques, le facteur K est donné par :

$$K = 6\pi r_c \eta \quad (4.39)$$

L'équation principale de la dynamique nous donne alors :

$$\frac{dv}{dt} = (1 - \alpha) g - \omega v \quad (4.40)$$

où α est la fraction de la densité massique du milieu sur celle de la cellule, et $\omega = \frac{m_c}{K}$. La solution générale

de cette équation est alors :

$$v(t) = \frac{g}{\omega} (1 - \alpha) (1 - \exp(-\omega t)) \quad (4.41)$$

Comme on peut le voir sur la **figure A2**, la cellule atteint à un temps t_{lim} dans sa chute une vitesse terminale v_{lim} qu'elle gardera jusqu'à ce qu'elle atteigne le fond du tube. Pour des cellules de rayon $r_c = 5\mu m$ et de densité $\rho_c = 1.125\rho_{eau}$ dans un milieu aqueux, on trouve :

$$\begin{aligned} v_{lim} &= 72\mu m.s^{-1} \\ t_{lim} &\approx 50\mu s \end{aligned} \quad (4.42)$$

Si on considère un temps d'incubation $T_{incubation} = 1h \gg t_{lim}$, alors on peut considérer que la cellule atteint instantanément sa vitesse terminale, simplifiant ainsi le modèle.

Considérons à présent N cellules réparties dans un volume initial rectangulaire de base $L \times L$ et de hauteur H_0 à l'instant $t=0$, à cet instant la densité vaut donc $\rho_0 = \frac{N}{L^2 H}$. Soit t_{sed} le temps nécessaire pour que toutes les cellules aient sédimentées au fond du volume, au-delà de ce temps, les cellules seront empilées avec une densité ρ_f supérieure à la densité initiale dans un nouveau volume $L \times L \times h_f$ tel que :

$$h_f = \frac{n_0}{n_s} H_0 \quad (4.43)$$

Si l'on suppose que le fond est infiniment dissipatif, *i.e.*, que les cellules s'immobilisent instantanément au moment de leur contact avec le fond, et que leur vitesse est constante v_{lim} , alors à un instant t quelconque entre $t = 0$ et t_{sed} la hauteur totale du volume occupée par les cellules sera donnée par :

$$H(t) = H_0 - v_{lim} t \quad (4.44)$$

On peut distinguer deux compartiments. Un premier de hauteur $h(t)$ correspondant aux cellules ayant sédimentées, à une densité ρ_f , et un second compartiment de densité ρ_0 et de hauteur $H(t) - h(t)$. Bien que la densité et le volume varient, le nombre de cellules reste quant à lui invariant. On peut donc écrire :

$$h(t) L^2 \rho_f + (H(t) - h(t)) L^2 \rho_0 = \rho_f L^2 h_f \quad (4.45)$$

En injectant 4.44, on retrouve :

$$h(t) = \frac{\rho_0}{\rho_s - \rho_0} v_{lim} t \quad t \leq t_{sed} \quad (4.46)$$

2.2 Modélisation et calcul de $g(r)$

Dans le cadre de notre étude, deux approches ont été utilisées pour modéliser la sédimentation des cellules et estimer la dose moyenne cellulaire.

2.2.1 Approche 1 : modèle binaire.

Dans cette approche, on suppose que selon l'instant t considéré, le système n'est défini que par deux fonctions de distribution radiale :

- g_0 , avant que les cellules n'aient eu le temps de sédimer,ter,
- g_f , lorsqu'elles ont toutes sédimentées.

La première *rdf* $g_0(r)$ correspond à une densité ρ_0 pour un volume égal au volume initial L^2H_0 tandis que la seconde *rdf* correspond à la densité compacte des cellules sédimentées au fond du tube ρ_s . Dans ce modèle simplifié, il est donc fait abstraction de la phase transitoire dans la courbe de la vitesse, et le volume occupé par les cellules passe directement d'une hauteur H_0 à la hauteur compacte h_f .

$$\rho(t) = \begin{cases} \rho_0 & t < t_{sed} \\ \rho_s & t \geq t_{sed} \end{cases} \quad (4.47)$$

Nous modélisons alors deux distributions aléatoires sur LAMMPS, associées à chacune des densités caractéristiques. En conditions périodiques, il faut également estimer le facteur de corrections des effets de bords pour les deux volumes L^2H_0 et L^2h_f . Une fois que l'on dispose des deux fonctions $g_0(r)$ et $g_f(r)$, du tir croisé en moyenne par une cellule pendant T_{incub} est donnée par :

$$\bar{D}(t) = 4\pi\rho \int r^2 dr S(r) \left[\int_0^{t_{sed}} dt a_{cellule}(t) g_0(r) + \int_{t_{sed}}^{T_{incub}} dt a_{cellule}(t) g_f(r) \right] \quad (4.48)$$

2.2.2 Approche 2 : modèle dynamique simplifié.

La seconde méthode, plus nuancée, considère qu'à chaque instant t , la distribution cellulaire est définie par une densité globale $\rho(t)$ égale à la moyenne des deux densités ρ_0 et ρ_s pondérée par les hauteurs des deux régions : celle de la couche de cellules ayant sédimentées (cf. **équation 4.46**), et celle des cellules en suspension en cours de sédimentation (cf. **équation 4.44**) :

$$\rho(t) = \frac{h(t)\rho_s + (H(t) - h(t))\rho_0}{H(t)} \quad (4.49)$$

On dispose ainsi pour chaque temps t d'une distribution aléatoire de volume $L^2H(t)$ et de densité $\rho(t)$, que l'on peut sans difficulté modéliser avec LAMMPS et en estimer la fonction de distribution radiale. Sur LAMMPS, les distributions cellulaires sont générées pour plusieurs pas temporels t . Le culot de cellules formé au fond du tube est caractérisé par une hauteur $h(t)$ et une densité ρ_s , tandis que la région de suspension des cellules est caractérisée par une hauteur $H(t) - h(t)$ et une densité initiale n_0 .

Le calcul du tir croisé a ainsi été réalisé selon trois cas de figure : (1) sans prise en compte de la sédimentation, (2) prise en compte de la sédimentation, selon le modèle binaire et (3) prise en compte de la sédimentation, selon le modèle dynamique simplifié. La **figure A3** récapitule les hypothèses de calcul relatives à ces trois cas et le **tableau A3** indique les valeurs des paramètres d'entrée pour le calcul.

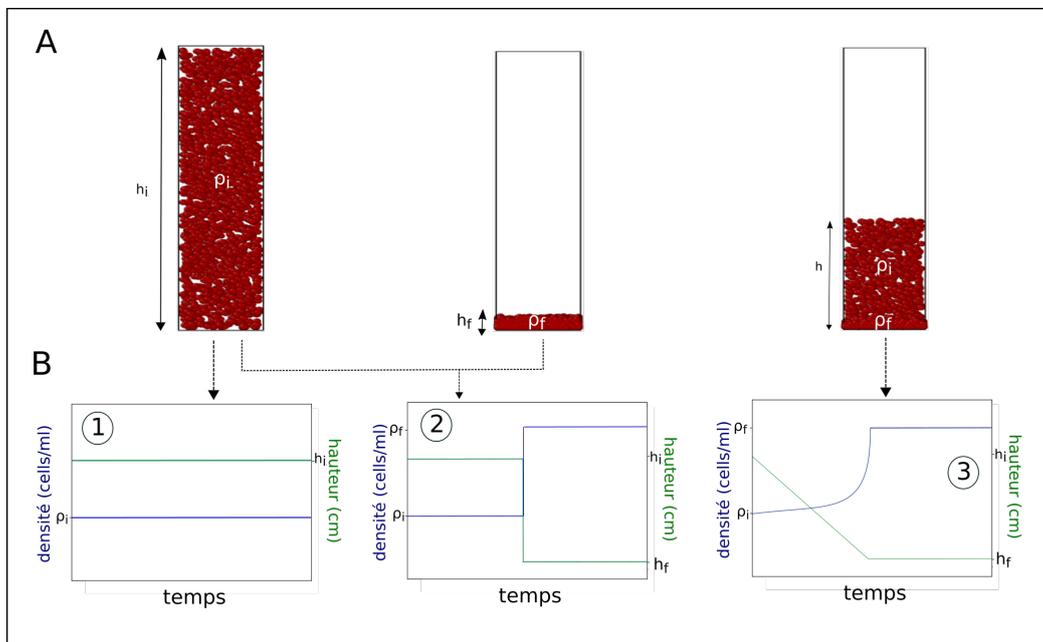


FIGURE A3 – Sédimentation des cellules

A) Représentation schématique d'une distribution de cellules aléatoire uniforme dans un tube dans trois configurations différentes : configuration initiale avec cellules en suspension, configuration finale avec cellules sédimentées formant un culot cellulaire au fond du tube, et configuration dynamique avec cellules en cours de sédimentation. **B)** Courbes d'évolution de la hauteur et de la densité selon trois cas : 1. Sédimentation non prise en compte (configuration 1), 2. Sédimentation en utilisant le modèle binaire (configuration 1 et 2), 3. Sédimentation en utilisant le modèle de sédimentation dynamique simplifié (configuration 3)

2.2.3 Résultats

Nous avons fait l'approximation de la distribution idéale et toutes les fonctions de distribution radiale ont été rapportées à un $g_h(r)$, nous n'avons donc pas utilisé LAMMPS. Ceci nous permet d'exprimer la valeur de

Tableau A3 – Sédimentation : choix des paramètres de simulation pour le calcul du tir croisé

Paramètre	Valeur
densité initiale ρ_0 ($cellulescm^3$)	10^7
densité de sédimentation ρ_s ($cellulescm^3$)	5.10^8
Hauteur initiale (cm)	0,9
Largeur (cm)	1.14
Densité massique de la cellule $\rho_{cellule}$	1,125
Activité initiale A_0 (MBq)	1
Efficacité d'incorporation eff (%)	15
Temps d'incubation T_{incub} (s)	3600

tir croisé à un instant t , quelque soit la méthode utilisée, comme :

$$\bar{D}(t) = 4\pi\rho \int dt dr . r^2 \tilde{a}_{cellule}(t) S(r) g_h(r, t) \quad (4.50)$$

où $\tilde{a}_{cellule}(t)$ est définie par l'équation 4.35. La fonction de distribution radiale uniforme $g_h(r, t)$ dépend implicitement du temps car elle dépend du volume qui diminue au cours de la sédimentation. L'évolution de tir croisé au cours du temps est schématisée pour les deux modèles de sédimentation dans la **figure A4**. Nous avons considéré un volume cubique correspondant aux dimensions de tubes standard utilisés pour le

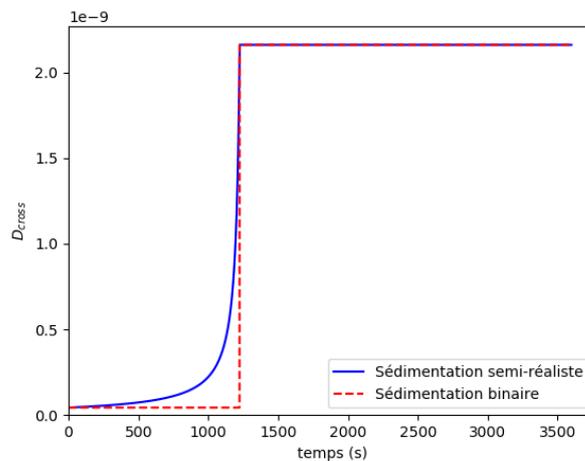


FIGURE A4 – Sédimentation : évolution de la dose absorbée en fonction du temps en considérant l'approche binaire et dynamique simplifiée (semi-réaliste)

marquage *in vitro* de cellules. Les paramètres initiaux considérés ainsi que les résultats sont résumés dans le **tableau A4**, les écarts relatifs sont calculés par rapport à la dose estimée avec le modèle dynamique simplifié.

L'écart de dose de 190% observé entre le calcul réalisé en considérant une distribution cellulaire statique et un modèle dynamique montre que la prise en compte de la sédimentation est importante. Par ailleurs, les résultats semblent montrer que le modèle binaire avec les paramètres considérés est suffisant, et permet

Tableau A4 – Tableau comparatif des valeurs de tir croisé en fonction du modèle utilisé

Modèle	$\bar{D}^{croisé}$	écart relatif (%)
Sans sédimentation	$7,12.10^{-8}$	-97,7
Avec sédimentation (approche binaire)	$3,05.10^{-8}$	-1,34
Avec sédimentation (approche dynamique simplifiée)	$3,09.10^{-8}$	

d'obtenir des valeurs de doses proches de celles obtenues avec le modèle plus réaliste, à moins de 2% d'erreur.

Annexe 3.

1 Calculs de la dose totale déposée aux cellules

Tableau A5 – JURKAT. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ^{18}F -FDG. Chaque grandeur X est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. **Modèle réduit** : incorporation linéaire de l'activité dans les cellules, sans prise en compte de l'éluion. **Modèle complet** : incorporation plus réaliste de l'activité dans les cellules et prise en compte de l'éluion de l'activité.

					Modèle réduit				Modèle complet			
	N° exp.	A_i (MBq/mL)	Eff (%)	\bar{D}_{auto} (Gy)	$\bar{D}_{croisé}$ (Gy)	\bar{D}_{milieu} (Gy)	\bar{D}_{tot}	\bar{D}_{auto} (Gy)	$\bar{D}_{croisé}$ (Gy)	\bar{D}_{milieu} (Gy)	\bar{D}_{tot}	
JURKAT	1	1,60±0,21	9,3±1,4	0,036±0,018	0,35±0,06	0,18±0,02	0,56±0,07	0,04±0,02	0,35±0,06	0,17±0,02	0,56±0,07	
		2,8±0,21	10,3±1,1	0,07±0,035	0,69±0,12	0,31±0,02	1,06±0,14	0,08±0,04	0,70±0,12	0,30±0,02	1,07±0,14	
		5,1±0,21	9,77±0,91	0,12±0,06	1,21±0,21	0,55±0,02	1,88±0,24	0,14±0,07	1,22±0,22	0,54±0,02	1,89±0,25	
		8,1±0,21	9,87±0,86	0,19±0,10	1,95±0,34	0,87±0,03	3,01±0,39	0,22±0,10	1,98±0,34	0,84±0,03	3,04±0,39	
		10,9±0,21	6,94±0,59	0,18±0,09	1,87±0,33	1,18±0,03	3,24±0,37	0,20±0,10	1,90±0,33	1,15±0,03	3,26±0,38	
JURKAT	2	1,50±0,14	19,2±2,4	0,07±0,03	0,67±0,12	0,16±0,02	0,90±0,13	0,08±0,04	0,68±0,12	0,15±0,02	0,90±0,14	
		2,80±0,14	20,9±2,0	0,14±0,07	1,36±0,24	0,29±0,02	1,79±0,27	0,16±0,08	1,38±0,24	0,27±0,02	1,81±0,28	
		5,0±0,14	19,9±1,75	0,24±0,12	2,32±0,40	0,52±0,02	3,08±0,47	0,27±0,14	2,36±0,40	0,48±0,02	3,11±0,47	
		8,0±0,14	21,4±1,82	0,42±0,21	4,0±0,70	0,82±0,02	5,24±0,80	0,46±0,23	4,06±0,71	0,76±0,02	5,29±0,81	
		10,8±0,14	17,20±1,45	0,45±0,23	4,35±0,76	1,12±0,02	5,92±0,87	0,50±0,25	4,42±0,77	1,06±0,02	5,98±0,89	
JURKAT	3	1,50±0,14	26,82±3,42	0,09±0,05	1,0±0,17	0,15±0,02	1,25±0,20	0,10±0,05	1,02±0,17	0,14±0,02	1,26±0,20	
		2,80±0,14	29,87±2,93	0,19±0,10	2,07±0,36	0,28±0,02	2,54±0,40	0,22±0,11	2,10±0,36	0,25±0,02	2,56±0,40	
		5,0±0,14	26,56±2,34	0,31±0,16	3,22±0,56	0,50±0,02	4,04±0,63	0,35±0,17	3,27±0,56	0,46±0,02	4,07±0,64	
		8,1±0,15	33,60±2,87	0,63±0,31	6,39±1,10	0,78±0,02	7,80±1,25	0,70±0,35	6,49±1,11	0,68±0,03	7,87±1,27	
		10,8±0,15	24,57±2,08	0,62±0,31	6,0±1,03	1,09±0,02	7,71±1,18	0,69±0,35	6,10±1,04	1,0±0,03	7,79±1,20	

Tableau A6 – adCSM. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ^{18}F -FDG. Chaque grandeur X est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. **Modèle réduit** : incorporation linéaire de l'activité dans les cellules, sans prise en compte de l'éluion. **Modèle complet** : incorporation plus réaliste de l'activité dans les cellules et prise en compte de l'éluion de l'activité.

				Modèle réduit				Modèle complet			
	N° exp.	A_i (MBq/mL)	Eff (%)	\bar{D}_{auto} (Gy)	$\bar{D}_{croisé}$ (Gy)	\bar{D}_{milieu} (Gy)	\bar{D}_{tot}	\bar{D}_{auto} (Gy)	$\bar{D}_{croisé}$ (Gy)	\bar{D}_{milieu} (Gy)	\bar{D}_{tot}
adCSM	1	2,39±0,33	20,20±3,31	0,07±0,035	1,34±0,25	0,24±0,04	1,66±0,27	0,08±0,04	1,36±0,26	0,23±0,04	1,67±0,27
		4,80±0,34	20±2,18	0,15±0,07	2,68±0,50	0,48±0,04	3,31±0,53	0,17±0,08	2,71±0,50	0,45±0,04	3,32±0,54
		11,20±0,41	20,46±1,81	0,35±0,17	6,43±1,21	1,11±0,04	7,89±1,28	0,40±0,18	6,50±1,21	1,03±0,05	7,93±1,29
		23±0,65	28,86±2,45	1,03±0,48	18,80±3,53	2,13±0,07	21,96±3,74	1,15±0,54	19,02±1,54	1,92±0,07	22,09±3,77
adCSM	2	2,41±0,44	62,54±12,69	0,22±0,11	3,65±0,72	0,20±0,05	4,07±0,77	0,25±0,12	3,70±0,72	0,15±0,05	4,09±0,77
		4,79±0,44	64,2±8,01	0,46±0,21	7,45±1,46	0,39±0,05	8,30±1,56	0,51±0,24	7,56±1,47	0,28±0,05	8,36±1,58
		11,20±0,50	59,65±5,52	0,99±0,47	16,19±3,18	0,93±0,06	18,11±3,39	1,11±0,52	16,42±3,19	0,71±0,06	18,24±3,42
		23±0,70	57,36±4,92	1,96±0,92	31,97±6,27	1,94±0,08	35,90±6,70	2,19±1,03	32,43±6,30	1,49±0,11	36,12±6,77
adCSM	3	2,36±0,40	44,2±8,47	0,14±0,06	2,24±0,43	0,22±0,05	2,60±0,46	0,16±0,07	2,28±0,43	0,18±0,05	2,62±0,47
		4,79±0,41	42,21±5,07	0,26±0,12	4,28±0,82	0,45±0,05	5,00±0,88	0,30±0,14	4,36±0,82	0,38±0,05	5,03±0,89
		10,99±0,46	39,53±3,61	0,58±0,27	9,37±1,79	1,05±0,05	11,00±1,92	0,65±0,30	9,53±1,80	0,90±0,06	11,08±1,94
		22,47±0,66	33,79±2,89	1,01±0,47	16,45±3,15	2,22±0,08	19,68±3,37	1,14±0,53	16,73±3,16	1,95±0,08	19,82±3,40

Table des figures

1.1	Les radiopharmaceutiques utilisés en médecine nucléaire sont constitués d'un radionucléide seul ou lié à un vecteur, par exemple, une molécule, un anticorps, un peptide, une cellule. Les rayonnements émis par désintégration des radionucléides peuvent être utilisés pour réaliser une imagerie (γ) ou pour détruire des cellules pathologiques (β^- , α , Auger).	16
1.2	Principe de l'imagerie nucléaire pour le suivi <i>in vivo</i> de cellules d'intérêt radiomarquées. Exemple d'un radiomarquage direct de cellules avec un radiopharmaceutique émetteur β^+ pour une imagerie TEP : (1) les cellules sont prélevées de l'organisme, (2) et (3) les cellules sont mises en culture et radiomarquées, puis (4) les cellules radiomarquées sont ré-injectées dans l'organisme (petit animal ou patient). (4) Une image de la biodistribution des cellules marquées est obtenue. La première image (haut) montre l'accumulation de cellules souches embryonnaires (CSE) au niveau du coeur après transplantation dans une souris avec un infarctus du myocarde (12). L'image patient (bas) montre l'accumulation de cellules souches hématopoïétiques marquées au ^{18}F -FDG dans le myocarde 2h après administration (13).	21
1.3	Principe des stratégies de radiomarquage direct et indirect. Exemples de radiomarquage direct : les vecteurs ^{99m}Tc -HMPAO ou ^{111}In -oxine sont des complexes lipophiles qui entrent dans les cellules de manière passive à travers la membrane. Le ^{18}F -FDG est incorporé dans les cellules de manière active <i>via</i> les transporteurs de glucose. Le ^{68}Ga -DOTATOC se lie à l'extérieur de la membrane au niveau des récepteurs de la somatostatine. Exemple de radiomarquage indirect : un gène rapporteur est intégré au génome de la cellule, ce qui permet la production d'une protéine spécifique capable de phosphoryler le substrat radiomarké ^{18}F -FHGB.	22
1.4	Potentielles conséquences de la mort de cellules ou de l'endommagement de cellules induites par le radiomarquage dans le cadre d'un suivi de cellules par imagerie nucléaire. . . .	35
1.5	Modèle de cellule à géométrie sphérique composée de trois compartiments : le noyau, le cytoplasme et la surface cellulaire.	40
1.6	Principaux modèles multi-cellulaires utilisés pour les évaluations dosimétriques à cette échelle. r représente la distance entre les deux cellules ; a correspond au paramètre de réseau. . . .	42
1.7	Le facteur géométrique est la probabilité moyenne qu'un vecteur de longueur x aléatoirement dirigé, à partir d'une position aléatoire dans la région source r_S , finisse dans la région cible r_T . 43	

1.8	Chronologie des évènements induits par les RI dans l'organisme, aux différentes échelles de temps et de dimensions, et les principaux risques consécutifs. <i>Source : Lundholm et al. (143)</i>	49
1.9	Principaux dommages de l'ADN radio-induits et leurs spécifications physiques et biologiques (145) : le dépôt d'énergie minimal nécessaire pour la formation des cassures simple brin (CSB), cassures double brins (CDB) et dommages de bases, leur incidence par Gray de rayons X, leur demi-vie de réparation et la voie de réparation activée par ce type de dommage.	50
1.10	Système de réponse au niveau cellulaire de CDB de l'ADN radio-induits. Réponse aux dommages de l'ADN induite par les cassures double brin (CDB). Les complexes senseurs MRN détectent les CDB et recrutent les protéines ATM. Le complexe ATM phosphoryle l'histone variant H2A, formant γ H2AX. γ H2AX entraîne une cascade de signalisation et la réponse s'amplifie. Une variété de protéines effectrices impliquées dans la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et la mort cellulaire s'active. <i>Figure inspirée de (53, 147).</i>	52
1.11	Cycle cellulaire. La phase G1 est une phase de croissance cellulaire où la cellule accroît sa taille ; la phase S est une phase de duplication de l'ADN ; lors de la phase G2, la cellule finalise la duplication de l'ADN et la croissance cellulaire ; dans la dernière phase du cycle cellulaire, la phase M, la division cellulaire se produit (mitose), générant deux cellules filles. La progression du cycle cellulaire est suivie en continu <i>via</i> plusieurs points de contrôle.	53
1.12	Distribution typique des cellules dans les différentes phases obtenue par cytométrie en flux.	55
1.13	Devenir d'une cellule lésée suite à une irradiation. Les facteurs physiques et biologiques influençant la réponse cellulaire sont indiqués.	56
1.14	Comparaison entre le mode d'irradiation externe (rayons X dans cet exemple) et le mode d'irradiation interne après incorporation d'un radionucléide.	60
1.15	Survie de la capacité de reproduction des cellules HeLa en fonction de la dose de rayons X. <i>Source : Puck et al. (168)</i>	60
1.16	Illustration du modèle linéaire-quadratique. La fraction de survie cellulaire est représentée avec une échelle semi-logarithmique. (A) différentes contributions des composants linéaires αD et quadratique βD^2 . (B) Influence des paramètres α et β sur la survie. <i>Source : Bodgi et al. (170).</i>	61
2.1	Représentation du modèle cellulaire et multi-cellulaire considéré pour notre étude.	69
2.2	Courbe des facteurs S de paires obtenue par simulation Monte-Carlo avec le code MCNP6 (exemple du ^{64}Cu). Pour les grandes distances, les facteurs S ont été estimés à partir de DPKS.	78
2.3	Méthodologie employée pour le calcul du tir croisé.	79

2.4	Résumé schématique des calculs réalisés pour l'analyse paramétrique. Les paramètres qui varient sont encadrés en pointillés. (§2.7.1) Calcul du facteur $\bar{S}^{croisé}$ pour différents volumes d'étude et nombre de cellules. (§2.7.2 A) Calcul de la dose absorbée moyenne au noyau en fonction de la densité cellulaire. (§2.7.2. B) Calcul de la dose absorbée moyenne aux noyaux en fonction de l'efficacité de marquage. (§2.7.2 C) Calcul du rapport D_N/D_{conv} en fonction du paramètre k et de la densité cellulaire. Radionuc = radionucléide ; loc.source = localisation sub-cellulaire des sources ; densité cell = densité cellulaire ; Eff (%) = efficacité de marquage ; k = rapport des activités volumiques dans les cellules et dans le milieu extra-cellulaire.	81
2.5	Variation des paramètres de modélisation pour le calcul du tir croisé, pour un paramètre k fixe. 1 couleur = 1 valeur de concentration d'activité.	83
2.6	Effet de la taille du volume d'étude sur le facteur $S^{croisé}$ moyen pour une distribution de cellules dans un réseau cubique compact. Pour les trois radionucléides, la source a été placée dans le noyau.	85
2.7	Effet de la densité cellulaire sur les valeurs moyennes de $S^{croisé}$. La source a été distribuée dans le noyau (N) pour le ^{64}Cu , dans le cytoplasme (Cy) pour le ^{18}F et au niveau de la surface cellulaire (Cs) pour le ^{68}Ga	86
2.8	Pour le ^{18}F (A), ^{64}Cu (B) et ^{68}Ga (C) : courbe de la dose moyenne absorbée totale aux cellules et de ses trois contributions (auto-absorption, tir croisé et dose non-spécifique) en fonction de l'efficacité de marquage et du paramètre k correspondant, pour une densité cellulaire de 1.10^6 cellules/mL (gauche) et 50.10^6 cellules/mL (droite).	87
2.9	Pour le ^{18}F (A), ^{64}Cu (B) et ^{68}Ga (C) : (gauche) courbe du rapport de la dose absorbée moyenne au noyau calculée avec le modèle cellulaire et de la dose conventionnelle D_N/D_{conv} en fonction de la densité cellulaire, pour quatre valeurs de k (1, 100, 1000, $+\infty$). (droite) somme des contributions du tir croisé et du milieu extra-cellulaire (dose non-spécifique) à la dose absorbée totale en fonction de la densité cellulaire, pour quatre valeurs de k (1, 100, 1000, $+\infty$).	89
3.1	Représentation schématique 2D d'une distribution de cellules. Les cellules dont les centres sont compris dans la coquille sphérique d'épaisseur dr à une distance r sont colorées en rouge.	102

3.2	Représentation de trois configurations spatiales (gauche) et leur fonction de distribution radiales correspondantes (droite). Une distribution idéale uniforme correspond à une distribution de points aléatoirement répartis dans un milieu infini se caractérisant par une <i>rdf</i> $g(R)=1$. La <i>rdf</i> pour une distribution de cellules selon un réseau se compose de pics à des positions périodiques. La <i>rdf</i> pour une distribution aléatoire de cellules est proche de 1 à faible densité cellulaire et oscille à faibles distances autour de 1 lorsque la densité cellulaire augmente.	104
3.3	Diagramme des étapes à implémenter pour le calcul du tir croisé avec la méthode RDF.	106
3.4	Représentation des conditions aux limites périodiques : particules fantômes créées par réplique de la boîte de simulation dans une dimension. <i>Source : Thèse Stéphane Tesson (214)</i>	107
3.5	Représentation d'une maille de réseau cubique simple et d'une maille de réseau de cubique face centrée.	109
3.6	Illustration de la prise en compte des effets de bords. Pour calculer le nombre de paires autour d'une particule à une distance r contenues dans un volume V défini, un facteur de correction F_{ref} est appliqué afin de n'intégrer les particules que sur la surface à l'intersection avec le volume d'étude.	111
3.7	Paramètres de simulation du MIRDCell. Les encadrés représentent les onglets du logiciel. Capture d'écran de la sortie du logiciel : Facteurs S pour différentes distances cellule-cellule et dose absorbée moyenne.	113
3.8	Représentation 3D du système cellulaire composé de clusters (type 1) et cellules isolées (type 2) réparties de manière aléatoire dans un volume d'étude.	115
3.9	Représentation schématique des cinq combinaisons cible←source possibles selon le type attribué à chaque cellule. SC se réfère aux clusters voisins, TC se réfère au cluster cible.	115
3.10	Courbes des facteurs S de paires en fonction de la distance cellule-cellule calculés avec le code Monte-Carlo MCNP6 et le MIRDCell (gauche). Pourcentage de différence relative entre les facteurs S (droite).	120
3.11	Différence relative en % entre le facteur $\bar{S}^{croisé}$ pour une configuration de cellules en réseau <i>cfc</i> ou <i>cs</i> versus une distribution idéale uniforme (référence) en fonction de la longueur L (haut) et en fonction du rapport d_{moy}/L (bas) ; L étant la longueur du volume d'étude cubique ; d_{moy} étant la distance moyenne inter-cellulaire égale au paramètre a dans le cas d'un réseau <i>sc</i> et égale à $a.\sqrt{2}/2$ dans le cas d'un réseau <i>cfc</i>	121
3.12	$\bar{S}^{croisé}$ en fonction du nombre de configurations de distribution aléatoire uniforme pour quatre valeurs de densité cellulaire. Les valeurs de $\bar{S}^{croisé}$ ont été normalisées par la valeur maximale, pour chaque densité cellulaire.	123

3.13	Différence relative en % entre le facteur $\bar{S}^{croisé}$ pour une configuration de cellules aléatoire uniforme <i>versus</i> une distribution idéale uniforme (référence) en fonction du rapport d_{moy}/L ; L étant la longueur du volume d'étude cubique; d_{moy} étant la distance moyenne inter-cellulaire et égal à $1/d^{1/3}$ avec d la densité cellulaire.	123
3.14	Exemple d'un réseau cubique simple. La distribution périodique des cellules crée des variations globales de la densité pour certains volumes, à cause des espacements au niveau des bords.	129
3.15	Exemple de pics artificiels dans la fonction de distribution radiale induits par les conditions aux limites périodiques.	131
4.1	Mécanisme d'internalisation du FDG dans les cellules (181).	140
4.2	Représentation des principales étapes pour la mesure de l'efficacité de marquage pour un échantillon. Après incubation des cellules avec le ^{18}F -FDG dans un tube, les cellules et le surnageant (SN) sont séparés par centrifugation afin de mesurer l'activité contenue dans chacune des composantes et déterminer l'efficacité de marquage.	141
4.3	Plan expérimental. Chronologie des étapes expérimentales pour l'étude comparée des effets biologiques du radiomarquage et de l'irradiation externe aux cellules JURKAT et aux cellules adCSM.	144
4.4	Illustration de la méthode de dilution limite pour calculer la fraction de survie des cellules JURKAT, pour une dose donnée. (A) Les cellules sont réparties en très faibles quantités dans les puits (de 0,5 cellules à 4 cellules dans cet exemple), à raison de 30 puits pour chaque nombre. La réponse en absorbance de chaque puits est quantifiée et le nombre de puits positifs, par rapport au seuil de détection pour des puits contrôles sans cellule, est compté. (B) La fréquence de puits négatifs est représentée en fonction du nombre de cellules, en échelle semi-logarithmique. L'efficacité de survie est calculée pour $y=0,37$ et la fraction de survie correspond au ratio de l'efficacité de survie pour la dose considérée sur l'efficacité de survie pour les cellules témoins.	148
4.5	Marquages immunofluorescents pour l'analyse des cassures doubles brins et du cycle cellulaire. Les cellules sont d'abord incubées avec l'anticorps primaire anti- γH2AX (étape 1), qui vont cibler spécifiquement les <i>foci</i> γH2AX , marqueurs des cassures doubles brins de l'ADN. Les anticorps primaires sont ensuite eux-même marqués avec un fluorochrome <i>via</i> une seconde étape d'incubation avec l'anticorps secondaire Alexa fluor 488 (étape 2). Enfin, pour étudier le cycle cellulaire, les cellules sont incubées avec un intercalant fluorescent de l'ADN, la 7-AAD (étape 3).	149

4.6	Représentation de la population de cellules en fonction de la taille des cellules (FSC) et granulosité (SSC). Chaque point représente une cellule. Les débris cellulaires sont exclus de l'analyse <i>via</i> la définition d'un contour (R1).	151
4.7	Description des étapes de radiomarquage et modèle dosimétrique utilisé pour le calcul de la dose auto-absorbée, du tir croisé et de la dose non-spécifique absorbée aux cellules (provenant de l'activité dans le milieu).	153
4.8	Evaluation d'une incertitude de type B. Guide d'utilisation pour des lois de probabilité usuelles.	155
4.9	Courbe de l'activité par cellule A_{cel} en fonction du temps. Les numéros 1-5 indiquent les étapes de radiomarquage associées à chaque tronçon d'activité. 1 : Incubation ; 2-4 : lavages ; 5 : remise en suspension des cellules. Pendant la phase d'incubation, deux hypothèses ont été prises sur la forme de l'incorporation d'activité dans les cellules. Une augmentation linéaire (trait plein) ou basée sur les mesures expérimentales de caractérisation du marquage (pointillés bleus).	156
4.10	Facteurs S^{auto} en fonction du rayon du noyau en échelle log-log, pour un modèle sphérique de cellule de densité unitaire.	158
4.11	Calcul des incertitudes-types. Diagramme de causes et effets illustrant la propagation de l'incertitude au travers des différentes grandeurs d'influence de l'auto-absorption.	159
4.12	Calcul du tir croisé : évolution de la densité cellulaire en fonction du temps et géométries associées.	161
4.13	Calcul des incertitudes-types. (a) Diagramme de causes et effets pour le tir croisé. (b) Tableau récapitulatif des grandeurs d'entrée et leur incertitude-type associée. (1) <i>d</i> correspond à la plus petite graduation de l'instrument de mesure (1 mm dans notre cas).	162
4.14	Modélisation du tube de marquage avec le code de simulation MCNP6 pour le calcul du facteur S_{milieu} dans les deux premières phases du radiomarquage 1 (incubation) et 2 (centrifugation).	164
4.15	Caractérisation du marquage. Effet de la concentration d'insuline sur l'efficacité de marquage normalisée à 1.10^6 de cellules. Chaque point indique la moyenne \pm écart-type pour $n=9$	166
4.16	Caractérisation du marquage. Effet de la densité cellulaire sur l'efficacité de marquage globale (A) et normalisée à 1.10^6 de cellules (B). ctrl = contrôle. * $p<0,05$ et ** $p<0,001$; $N=9$	167
4.17	Caractérisation du marquage. Effet de l'activité volumique sur (A) l'activité incorporée dans les cellules et (B) sur l'efficacité de marquage après 60 minutes d'incubation. Les données ont été normalisées à 1.10^6 de cellules. * $p<0,05$, $n=9$	168

4.18 Caractérisation du marquage. Cinétique d'incorporation du ^{18}F -FDG dans les adCSM et JURKAT : (A) Activité mesurée dans les cellules normalisée à 1.10^6 cellules, non corrigée de la décroissance radioactive, en fonction du temps d'incubation. (B) Efficacité de marquage normalisée à 1.10^6 cellules et corrigée de la décroissance, en fonction du temps d'incubation. $**p<0,001$; $**p<0,0001$. n=9.	169
4.19 Caractérisation du marquage. Rétention de l'activité dans les cellules suivant la période d'incubation (60 minutes), jusqu'à 90 minutes. $**p<0,001$	170
4.20 Débit de dose associé au radiomarquage des cellules JURKAT au ^{18}F-FDG. Profil du débit de dose en fonction du temps le long de la procédure de radiomarquage, pour une expérience représentative à une activité initiale de 10,8 MBq, 5.10^6 cellules et une efficacité de 25%.	176
4.21 Survie clonogénique. Courbes de survie des cellules radiomarquées au ^{18}F -FDG ou irradiées aux rayons X pour les JURKAT (gauche) et les adCSM (droite). Dans le cas de l'irradiation externe, les valeurs moyennes \pm écart-types de la survie sont présentées. Dans le cas du marquage au ^{18}F -FDG, les valeurs individuelles sont représentées.	178
4.22 Survie clonogénique. Courbes de survie des cellules JURKAT et adCSM radiomarquées au ^{18}F -FDG (gauche) ou irradiées aux rayons X (droite). Dans le cas de l'irradiation externe, les valeurs moyennes \pm écart-types de la survie sont présentées. Dans le cas du marquage au ^{18}F -FDG, les valeurs individuelles sont représentées.	179
4.23 Cycle cellulaire des JURKAT. Illustration de l'accumulation des cellules JURKAT en phase G2/M, après irradiation externe et marquage au ^{18}F -FDG. Les profils de distribution des cellules témoins non irradiés (<i>ctrl</i> pour contrôle), et irradiées à 4 Gy (par irradiation externe) et 5,1 Gy (^{18}F -FDG) issus d'une expérimentation représentative sont montrés.	180
4.24 Cycle cellulaire des cellules JURKAT. Corrélation entre la dose et le pourcentage de cellules en phase G0/G1 et G2/M à 24h et 72h pour les cellules JURKAT. Lorsque la dose augmente, la proportion des cellules en phase G0/G1 diminue tandis que le nombre de cellules en phase G2/M augmente. Les données relatives à l'irradiation externe sont représentées en moyenne \pm écart-type à partir de trois expérimentations indépendantes. Les valeurs de doses pour le radiomarquage au ^{18}F -FDG ont été regroupées par classe à partir de trois valeurs au minimum, et sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type.	181
4.25 Cycle cellulaire des cellules adCSM. Distribution du cycle cellulaire (moyenne et écart-type) des cellules adCSM à 1h, 24h et 72h après radiomarquage à $9,4\pm 1,8$ Gy et irradiation externe à 10 Gy.	182

4.26	Stratégie de fenêtrage pour exprimer l'intensité de fluorescence γH2AX en fonction de la phase du cycle. (1) Les débris cellulaires sont d'abord exclus <i>via</i> la création d'une région R1 sur les paramètres de taille et de granulosité des cellules. (2) Les trois phases du cycle cellulaire sont identifiées sur le profil de distribution de la fluorescence du signal 7-AAD. (3) Trois nouvelles régions sont créées sur le diagramme en contour du signal de fluorescence γ H2AX en fonction du cycle cellulaire. Les limites de régions en <i>x</i> sont celles définies à l'étape (2). Enfin, les histogrammes de fluorescence γ H2AX dans chaque phase du cycle cellulaire sont représentées. La quantité de fluorescence est proportionnelle au nombre et à la taille des <i>foci</i> γ H2AX.	183
4.27	Analyse de la fréquence relative de γH2AX radio-induite. Illustration de l'augmentation relative de l'intensité de fluorescence γ H2AX avec la dose absorbée, avec un exemple représentatif de cellules JURKAT irradiées à 4 Gy à 1h post-irradiation. Le décalage du pic de fluorescence reflète l'augmentation de la quantité de <i>foci</i> γ H2AX dans les cellules à 4 Gy par rapport aux cellules non irradiées. La fréquence relative de fluorescence $IF(D)/IF(D_0)$ pour une dose est calculée comme étant la médiane du signal de fluorescence γ H2AX normalisée par rapport à celle du témoin. Les valeurs de fréquence relative dans chaque phase à 0 Gy et 4 Gy, ainsi que le pourcentage de cellules correspondant sont indiqués dans le tableau. . .	184
4.28	Intensité relative de la fluorescence γH2AX dans les cellules adCSM (en haut) et les cellules JURKAT (en bas) à 1h après radiomarquage au ^{18}F-FDG (gauche) ou irradiation externe (droite). Les données de fluorescence pour chaque dose ont été normalisées en fonction de l'intensité de fluorescence des cellules témoins, telles que à 0 Gy la fréquence relative vaut 1. Pour les résultats d'irradiation externe, les valeurs moyennes \pm écarts-types sont présentées pour trois expérimentations. Pour les résultats de radiomarquage, les doses absorbées et intensités de fluorescences associées ont été regroupées par classe à partir de trois valeurs au minimum.	185
4.29	Cinétique de réparation de l'ADN. Intensité relative de fluorescence γ H2AX pour les cellules JURKAT à 1h, 24h et 72h après radiomarquage au ^{18}F -FDG et irradiation externe, en fonction de la position dans le cycle cellulaire.	187
4.30	Cinétique de réparation de l'ADN. Intensité relative de fluorescence γ H2AX pour les cellules adCSM à 1h, 24h et 72h après radiomarquage au ^{18}F -FDG et irradiation externe, en fonction de la position dans le cycle cellulaire.	188
A1	Représentation des forces appliquées à une cellule dans le cas d'une sédimentation dans un milieu	238
A2	Vitesse de sédimentation	238

A3	Sédimentation des cellules	241
A4	Sédimentation : évolution de la dose absorbée en fonction du temps en considérant l'ap- proche binaire et dynamique simplifiée (semi-réaliste)	242

Liste des tableaux

1.1	Caractéristiques des rayonnements d'intérêts en médecine nucléaire. *Dans les tissus mous.	16
1.2	Contribution de l'imagerie pour optimiser la thérapie cellulaire cardiaque. <i>Tableau traduit de l'anglais (41)</i>	27
1.3	Résumé des études pré-cliniques et cliniques pour le suivi de cellules souches radiomarquées (liste non-exhaustive). CSE = cellules souches embryonnaires.	28
30table.caption.12		
1.5	Paramètres de radiomarquage au ^{18}F -FDG utilisés dans différentes études de la littérature et effets sur les cellules (liste non-exhaustive).	34
1.6	Modèles multicellulaires utilisés pour le calcul de dose. Hexa. signifie hexagonal ; cs signifie cubique simple.	41
1.7	Liste non-exhaustive d'études sur la relation <i>in vitro</i> dose-effet pour : évaluer la radiotoxicité de radiopharmaceutiques (RT) ou l'efficacité thérapeutique de radiopharmaceutiques (ET), ou étudier l'impact de paramètres dosimétriques sur les effets (exp). ⁽¹⁾ Lignée cellulaire de cancer du sein. ⁽²⁾ Lignée cellulaire de la thyroïde.	64
2.1	Principales caractéristiques des trois radiopharmaceutiques étudiés : le ^{18}F -FDG, le ^{64}Cu -PTSM et le ^{68}Ga -DOTA peptide. La période physique, les principales émissions électroniques et photoniques ainsi que les localisations sub-cellulaires sont indiquées. (*) (185). Moy/Max : Valeur moyenne/Valeur maximale. Les caractéristiques des rayons X et des deux γ émis suite à la désintégration β^+ ne sont pas indiquées dans le tableau.	69
2.2	Calcul de la dose absorbée moyenne aux cellules délivrée au cours de l'incubation de cellules avec le ^{18}F -FDG réalisé à partir des paramètres de marquages utilisés dans différentes publications et comparaison avec la dose conventionnelle. Leuco. et lympho. signifient respectivement leucocytes et lymphocytes. CSA = Cellules souches adipeuses. ρ représente la densité cellulaire ; <i>Eff</i> désigne l'efficacité de marquage ; <i>Act. vol.</i> désigne l'activité volumique ; T_{incub} désigne le temps d'incubation.	91
3.1	Paramètres de modèles pour le calcul du $\bar{S}^{croisé}$. sc = cubique simple.	112
3.2	Paramètres utilisés pour la simulation LAMMPS d'un modèle multi-cellulaire composé de clusters de cellules compacts et de cellules isolées.	116

3.3	Comparaison des temps de calcul et les différences relatives entre valeurs de tir croisé $\bar{S}^{croisé}$ calculées avec la méthode RDF et la méthode de référence pour différents rayons de volume d'étude. (*) : La <i>rdf</i> à partir de laquelle les calculs ont été effectués a été obtenue en 620 s, en considérant une distance de coupure de 0,25 cm et 10 000 bins. P1 fait référence à l'étape de modélisation (création des coordonnées). La P2 correspond au processus de cumulation des contributions de dose impliquant, dans le cas de la méthode de référence, le calcul des distances entre chaque cellule au préalable.	119
3.4	Tir croisé moyen au noyau $\bar{S}^{croisé}$ ($Gy/(Bq.s)^{-1}$) dans un cluster sphérique de cellules de rayon variable calculé avec le MIRDCell (1) et la méthode RDF en utilisant les facteurs S de paires obtenus par simulation Monte-Carlo (code MCNP6) (2) ou par le MIRDCell (3). N_{cel} = nombre de cellules.	120
3.5	Comparaison de l'auto-absorption, tir croisé, dose non-spécifique et la dose totale en Gy calculés avec deux méthodes : a) Approche directe avec LAMMPS ; b) Approche simplifiée (idéale uniforme). 2 = cellules isolées, 1 = cellules dans les clusters	125
4.1	Composition des milieux de culture pour les cellules JURKAT et adCSM.	139
4.2	Paramètres expérimentaux utilisés pour l'évaluation de l'efficacité de marquage pour les cellules JURKAT (a) et adCSM (b).	141
4.3	Conditions de mises en culture pour le test CFU-F des cellules adCSM marquées au ^{18}F ou irradiées. Chaque condition a été appliquée en triplicat.	146
4.4	Conditions de mise en culture des cellules JURKAT marquées au ^{18}F -FDG ou irradiées pour évaluer la survie clonogénique.. . . .	146
4.5	Anticorps primaire et secondaire utilisés pour le marquage par immunofluorescence des <i>foci</i> γ H2AX.	149
4.6	Principales caractéristiques des signaux mesurés lors de l'acquisition au cytomètre de flux. Les fluorochromes absorbent l'énergie lumineuse du laser (488 nm) et réémettent une lumière avec une énergie plus faible mais une longueur d'onde λ plus élevée. λ_{max} = longueur d'onde au pic du spectre d'énergie, lin = linéaire, log = logarithmique, -H = hauteur maximale du signal, FSC = front scatter, SSC = side scatter. Les filtres de détection sont indiqués en longueur d'onde/largeur de bande.	150

4.7	Calcul des incertitudes-types. Tableau récapitulatif des grandeurs d'entrée et leur incertitude-type associée à partir desquelles l'incertitude finale sur l'auto-absorption sera estimée. (1) $\delta(\%)$ donnée par le fabricant. (2) Pour une micropipette, les données de précision et exactitude sont données. Pour une même grandeur, les incertitudes types se composent alors de manière quadratique. (3) Sensibilité donnée par le constructeur. Le facteur d'élargissement a été fixé à $k=1,96$, pour définir un intervalle de confiance de 95%.	160
4.8	Calculs préliminaires. Gammes de dose visées pour les JURKAT et adCSM et paramètres de marquage correspondants. ρ_{cel} = densité cellulaire ; T_{incub} = temps d'incubation ; V_m = volume de marquage ; T_{lavage} = temps de lavage ; Eff = efficacité ; Act. vol. = activité volumique. Les hypothèses de calcul considérées sont les suivantes : incorporation linéaire de l'activité dans les cellules, et rétention totale de l'activité après incorporation. (*) valeurs basées sur des mesures expérimentales réalisées lors d'expériences préliminaires de radiomarquage au ^{18}F -FDG.	165
4.9	JURKAT. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ^{18}F -FDG. Chaque grandeur X est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. Les paramètres d'entrée spécifiques à chaque expérimentation : activité volumique, densité cellulaire initiale (ρ) et efficacité de marquage normalisée à 1.10^6 cellules/mL sont indiquées.	172
4.10	adCSM. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ^{18}F -FDG. Chaque grandeur X est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. Les paramètres d'entrée spécifiques à chaque expérimentation : activité volumique, densité cellulaire initiale (ρ) et efficacité de marquage normalisée à 1.10^6 cellules/mL sont indiquées.	173
4.11	Pourcentages de contribution des composantes de la dose absorbée moyenne aux cellules. (a) JURKAT (exp n°3), (b) adCSM (exp n°3).	174
4.12	Sources d'incertitude. Effet de l'élimination de différentes sources de variabilité sur la dose absorbée totale aux cellules. Les calculs ont été réalisés à partir des données d'entrée de l'expérience n°3 (cf. tableau 4.10).	174
4.13	Différences entre la dose absorbée totale et la dose absorbée pour les échantillons fixés à 1h, comprenant une étape supplémentaire de centrifugation. Les résultats présentés sont issus de calculs de dose à partir des données d'entrée de l'expérience (exp n°3).	175
4.14	Débit de dose associé au radiomarquage des cellules au ^{18}F-FDG. Valeurs moyennes de débit de dose sur les gammes d'activité utilisées pour les cellules (a) JURKAT et (b) adCSM.	177

4.15	Survie clonogénique. Comparaison des paramètres α et β et de la fraction de survie à 2 Gy SF ₂ entre l'irradiation externe et le radiomarquage des cellules JURKAT et adCSM au ¹⁸ F-FDG. <i>a</i> : p<0,001, <i>b</i> : p<0,05. Le coefficient de corrélation <i>cor</i> des ajustements est également indiqué.	179
A1	Pourcentage de contribution des différents rayonnements émis par les radionucléides ⁶⁴ Cu, ¹⁸ F et ⁶⁸ Ga à l'auto-absorption pour différentes combinaisons source←cible. N = noyau ; Cy = cytoplasme ; Sc = surface cellulaire.	233
A2	Pourcentage de contribution des différents rayonnements émis par les radionucléides ⁶⁴ Cu, ¹⁸ F et ⁶⁸ Ga au tir croisé pour un cluster compact de cellules dans un réseau cubique et pour différentes combinaisons source←cible. N = noyau ; Cy = cytoplasme ; Sc = surface cellulaire.	233
A3	Sédimentation : choix des paramètres de simulation pour le calcul du tir croisé	242
A4	Tableau comparatif des valeurs de tir croisé en fonction du modèle utilisé	243
A5	JURKAT. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ¹⁸ F-FDG. Chaque grandeur <i>X</i> est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. Modèle réduit : incorporation linéaire de l'activité dans les cellules, sans prise en compte de l'éluion. Modèle complet : incorporation plus réaliste de l'activité dans les cellules et prise en compte de l'éluion de l'activité.	246
A6	adCSM. Valeurs des doses absorbées et incertitudes associées pour un intervalle de confiance à 95% calculées pour chaque expérimentation au ¹⁸ F-FDG. Chaque grandeur <i>X</i> est présentée sous la forme $X \pm U(X)$. Modèle réduit : incorporation linéaire de l'activité dans les cellules, sans prise en compte de l'éluion. Modèle complet : incorporation plus réaliste de l'activité dans les cellules et prise en compte de l'éluion de l'activité.	247

Publications et communications

Publications dans des revues à comité de lecture :

M. Jacquemin, D. Broggio, D. Franck and A. Desbrée, **2019**, Development of a dosimetric model for in vitro labelled cells with β^+ emitters in PET tracking studies, *Physics in Medicine and Biology*. (doi :10.1088/1361-6560/ab2cbe)

M. Jacquemin, F. Ribeiro, K. Aliane, D. Broggio, D. Franck and A. Desbrée, **2020**, Using radial function distributions to calculate cell absorbed doses in nuclear medicine : comparison with reference methods and application for the cell labelling with the beta-emitting radionuclide ^{18}F -FDG, *Physics in Medicine and Biology*. Accepté en février 2021.

Communications orales nationales et internationales :

M. Jacquemin, A. Rivot, N. Hocine, L.Sarda, D.Franck **Juin 2017**, *Dosimetry of β^+ emitters used for optimizing cell tracking methods by PET imaging*, SNMMI, Denver, Colorado.

M. Jacquemin, A. Rivot, N. Hocine, L.Sarda, D.Franck **Juin 2017**, *Optimisation des méthodes de suivi de cellules radiomarquées in vivo : dosimétrie cellulaire des radioisotopes utilisés en imagerie TEP*, Congrès National de la Société Française de RadioProtection, Lille.

M. Jacquemin, D. Broggio, D.Franck, A. Desbrée **Février 2018**, *Développement d'un modèle dosimétrique multi-cellulaire basé sur MCNP6 et Python : application à l'étude du radiomarquage de cellules pour l'imagerie TEP*, Journées Codes de calcul en radioprotection, radiophysique et dosimétrie, Sochaux.

M. Jacquemin, C. Truillet, B. Jego, D. Broggio, D.Franck, JM. Bertho, A. Desbrée **Octobre 2018**, *Multi-cellular dosimetry of β^+ -emitting radionuclides used for cell labeling in cell-tracking studies*, 12th International Conference on the Health Effects of Incorporated Radionuclides (HEIR), Fontenay-aux-Roses. **1^{er} prix "Young Investigator Award"**

M. Jacquemin, C. Truillet, B. Jego, D. Broggio, D.Franck, JM. Bertho, A. Desbrée **Mai 2019**, *Multi-cellular dosimetry of cells labeled with β^+ -emitting radionuclides for PET imaging*. 3rd International Conference on Dosimetry and its Applications (ICDA3), Lisbonne.

M. Jacquemin, A. Desbrée, D. Broggio, D.Franck, **Juillet 2020**, *¹⁸F-FDG labelling in cell-tracking PET studies : calculation of the precise absorbed dose deposited to cell nucleus and correlation to in vitro biological effects*. AAPM/COMP Meeting, Virtuel.

Communication affichée :

M. Jacquemin, D. Broggio, D.Franck, A. Desbrée **Octobre 2018**, *Multi-cellular dosimetry of β^+ -emitting radionuclides used for cell labeling in cell-tracking studies*, European Association of Nuclear Medicine, Munich.

Titre : Étude de l'impact du radiomarquage de cellules avec des émetteurs β^+ pour l'imagerie TEP : développement dosimétrique à l'échelle multi-cellulaire, analyse des paramètres d'influence et application au cas du ^{18}F -FDG.

Mots clés : Dosimétrie, ^{18}F -FDG, Cellules sanguines – Radiomarquage, Méthode de Monte-Carlo

Résumé : En médecine nucléaire, suite au marquage de cellules *in vitro* avec des radionucléides, l'évaluation des doses reçues à la cellule est essentielle pour comprendre les effets biologiques associés et comparer différentes expériences entre elles. Réalisée notamment avec des émetteurs β^+ pour le suivi de cellules par imagerie TEP, la procédure implique l'utilisation de fortes activités dans un volume restreint pouvant alors induire des doses élevées et entraîner une mortalité cellulaire et par la même une perte de la qualité de l'image. Ce travail de recherche s'inscrit dans la perspective de mieux appréhender les enjeux qui sous-tendent cette procédure et d'éclairer les pratiques actuelles. Dans ce cadre, l'étude a porté plus précisément sur l'évaluation réaliste des doses reçues aux cellules lors d'un radiomarquage de cellules au ^{18}F -FDG pour l'imagerie TEP et leur corrélation aux effets observés. Une première partie du travail de thèse a reposé sur le développement et l'optimisation d'outils de calculs de dose à l'échelle cellulaire.

Une analyse comparée de plusieurs méthodes de calculs hybrides a été réalisée en s'appuyant sur des approches analytiques, Monte-Carlo ou de la dynamique moléculaire. L'impact de différents facteurs comme la densité cellulaire et l'efficacité de marquage sur les doses aux cellules a pu être ainsi étudié et discuté. Dans un second temps, des expériences de radiomarquage de cellules mésenchymateuses et lymphoblastoïdes au ^{18}F -FDG ont été réalisées suivies d'une évaluation de la survie clonogénique, du cycle cellulaire et de la cinétique d'apparition et réparation de cassures double brins. Pour relier les effets observés à des doses précises, un modèle dosimétrique multi-cellulaire a été développé, prenant en compte l'ensemble des étapes de l'expérience. Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre l'exposition des cellules au cours des étapes de marquage et des conséquences fonctionnelles sur les cellules marquées, apportant ainsi une base de connaissances pour une future standardisation des méthodes de marquage.

Title : Study of the impact of cell radiolabelling with β^+ emitters for PET imaging : dosimetric development on a multi-cellular scale, analysis of influencing parameters and application for ^{18}F -FDG labelling.

Keywords : Dosimetry, ^{18}F -FDG, radiolabelling, Monte-Carlo

Abstract : *In vitro* labelling of cells with β^+ -emitting radionuclides combined with nuclear medicine imaging is a potential method for *in vivo* cell trafficking analysis with PET imaging. The labeling-associated exposition of cells to high levels of activity still raises some concerns since it may result in cell death and therefore a loss of image quality. In addition, the administration of potentially damaged cells rises essential questions regarding the safety of such procedure. This research work was conducted with a view of better understand the issues underlying the radiolabelling procedure in order to optimize the current clinical practice. More precisely, this thesis focused on the calculation of the absorbed doses to cells during *in vitro* ^{18}F -FDG radiolabelling and the correlation to the biological observed effects. As a first step, computing tools at the multi-cellular scale were developed and optimized. Based on a generic approach, we explored and compared

several hybrid methods mixing Monte Carlo simulations, analytic approaches or molecular dynamics. Then, JURKAT and adipose mesenchymal stem cells (adMSCs) were radiolabelled with ^{18}F -FDG and tested for clonogenic survival assay, cell cycle analysis and γ -H2AX phosphorylation quantification. A multi-cellular dosimetry model describing the full experiment, from the incubation of cells with ^{18}F -FDG, washing steps, to culture of cells for functional assays was developed. Dynamic changes in cell density, as well as experimentally determined activity uptake and retention with time were thus considered. Lastly, the mean cell absorbed dose was correlated with the three biological endpoints and results were compared with X-ray irradiation. The results helped to better understand the irradiation features associated to ^{18}F -FDG labelling and the observed biological effects, thus providing a knowledge base in favour of harmonizing the labelling methods.

