



HAL
open science

Dosimétrie pour l'évaluation in vitro de la radiothérapie interne vectorisée par émetteurs alpha

Alexis Doudard

► **To cite this version:**

Alexis Doudard. Dosimétrie pour l'évaluation in vitro de la radiothérapie interne vectorisée par émetteurs alpha. Physique [physics]. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMC232 . tel-04351452

HAL Id: tel-04351452

<https://theses.hal.science/tel-04351452v1>

Submitted on 18 Dec 2023

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.



Normandie Université



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIQUE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Dosimétrie pour l'évaluation in vitro de la radiothérapie interne vectorisée par émetteurs alpha

**Présentée et soutenue par
ALEXIS DOUDARD**

**Thèse soutenue le 19/09/2023
devant le jury composé de**

| | | |
|-------------------------------|--|-----------------------|
| MME ISABELLE AUBINEAU-LANIECE | Chercheur-ingénieur au CEA, CEA | Rapporteur du jury |
| M. CHARLES-OLIVIER BACRI | Directeur de recherche, Université Paris Saclay | Rapporteur du jury |
| M. NICOLAS CHOUIN | Maître de conférences, ONIRIS | Membre du jury |
| M. SAMUEL VALABLE | Directeur de recherche au CNRS, Université de Caen Normandie | Président du jury |
| MME ANNE-MARIE FRELIN | Chercheur au CEA, 14 GANIL de CAEN | Directeur de thèse |
| M. XAVIER LEDOUX | Chercheur-ingénieur au CEA, 14 GANIL de CAEN | Co-directeur de thèse |

**Thèse dirigée par ANNE-MARIE FRELIN (Grand accélérateur national d'ions lourds)
et XAVIER LEDOUX (Grand accélérateur national d'ions lourds)**



I don't know everything. I just know what I know.

Hanekawa Tsubasa, *Bakemonogatari*
NISIO ISIN

People want to know the truth. Or, they want to believe that what they already know is the truth — what's actually true is secondary. [...] I advise you to pay careful attention to what is true and what is false as you read on, in other words to doubt everything.

Deishū Kaiki, *Koimonogatari*
NISIO ISIN

Remerciements

Trois années de travail, trois années de nouvelles rencontres, trois années de nouvelles amitiés, et au bout, l’accomplissement de cette thèse, concrétisée sous la forme de ce manuscrit. Plus simplement, trois années de soutiens de la part de nombreuses personnes, que je me dois de remercier dans ces quelques lignes.

Mes premiers remerciements vont bien évidemment vers mes deux directeurs de thèse, Anne-Marie Frelin et Xavier Ledoux.

Anne-Marie, quelques lignes ne suffiront pas à te remercier suffisamment, mais ces trois années de collaboration ont été un véritable plaisir intellectuel et surtout humain. Tu m’as appris à savoir me faire confiance, tout en étant particulièrement disponible pour répondre à mes nombreuses crises existentielles sur ces fameuses incertitudes. Ton investissement lors de nos sessions expérimentales, et tout le temps passé dans la conception et la relecture de ce manuscrit ont été grandement appréciés – en particulier les chocolats dans les dernières semaines ! Au plaisir si nos chemins se recroiseront autour d’une future collaboration scientifique, qui sait.

Xavier, bien que nos domaines de prédilection divergent, tu t’es toujours montré intéressé par mes travaux, et je pouvais compter sur toi pour les petits coups de pouce nécessaires pour avancer. Merci également de m’avoir offert une si belle introduction à tes projets scientifiques, sur NFS, qui me permet aujourd’hui de pouvoir mettre un peu plus de mots sur ce qu’est la recherche en physique nucléaire (ou du moins une partie de ce vaste domaine).

Je tiens ensuite à exprimer ma gratitude envers les membres de mon jury de thèse, présidé par Samuel Valable, qui sans aucun doute apporteront un œil critique et une expertise très poussée sur chacun des différents domaines scientifiques abordés dans ce manuscrit. Merci beaucoup à Isabelle Aubineau-Lanièce et à Charles-Olivier Bacri d’avoir accepté le rôle de rapporteurs et d’avoir pris le temps d’apporter un œil critique à ces travaux et ce manuscrit, ainsi qu’à Nicolas Chouin d’avoir accepté d’intégrer ce jury.

Je remercie également l’administration du GANIL pour leur accueil en période de pandémie, alors sous la direction de Navin Alahari et d’Héloïse Goutte, ainsi que la nouvelle direction sous Patricia Chomaz et Fanny Farget pour leur implication dans la vie doctorante.

Projet interdisciplinaire oblige, de nombreux collaborateurs ont largement contribué à faire de cette thèse un succès. Du côté du GANIL, merci beaucoup à Johan Goupil et à Georges Frémont, qui ont énormément contribué à la conception du nouveau système de dosimétrie à l’aide de leur expertise technique sur les détecteurs, et à Alexandre Gognat pour l’étude mécanique de l’enceinte étanche.

Un grand merci également à Aurélien Corroyer-Dulmont et à Cyril Jaudet, du centre François Baclesse, de nous avoir accompagnés depuis les premiers tests du système en nous fournissant du ^{223}Ra , jusqu’aux essais *in vitro* avec le ^{212}Pb . Votre disponibilité et nos discussions ont beaucoup compté dans la réalisation de ce projet. À très bientôt pour mon premier stage de DQPRM !

Merci également à l'ensemble de nos collaborateurs de l'équipe Cervoxy de l'ISTCT, au laboratoire Cyceron : Samuel et son expertise sur les cellules tumorales, Aurélien, pour ton investissement dans la culture et l'analyse des cellules, et Jérôme Toutain pour son aide lors de la réalisation des irradiations au ^{212}Pb .

Mais parce que la thèse, ce n'est pas seulement une première aventure professionnelle, mais aussi une autre étape de la vie étudiante, je tiens également à remercier particulièrement les autres étudiants et jeunes chercheurs que j'ai eu la chance de rencontrer.

En premier lieux, certains d'entre eux ont contribué à ce projet scientifique. Merci à Thibaut Jacquet, en stage de Master 2 durant la première année de cette thèse, avec qui nous avons ensemble beaucoup appris sur la physique des détecteurs. Merci également à Ysabella Kassandra Ong, stagiaire de Master 1, avec qui j'ai eu le plaisir d'avoir ma première expérience d'encadrement, et qui m'a donné envie de renouveler l'expérience dans le futur. Et bien sûr, merci à Saba Ansari-Chauveau, post-doctorante, pour m'avoir fourni un soutien scientifique mais aussi moral durant les derniers mois.

Bien sûr, mes jeunes collègues du GANIL ne sont pas en reste. Merci à toutes les générations de doctorants et post-doctorants internationaux que j'ai pu côtoyer, vous êtes trop nombreux pour que je vous cite tous. Mais une telle diversité de profils, de nationalités, de cultures... quelle expérience enrichissante. Thank you so much everyone.

J'ai bien sûr des remerciements plus personnels à faire aux doctorants de ma génération – objectivement la meilleure. Jose Pablo, partager un bureau avec toi ces trois années a été source d'innombrables discussions intéressantes, j'espère que je t'aurais convaincu de la supériorité de la crème fraîche en cuisine. Vincent, ta plus mémorable contribution doit être de m'avoir remis au sport, et Tom, d'avoir continué de m'accompagner après que notre entraîneur déserte ! Enfin, grâce à toi Anjali, je repars avec une nouvelle addiction : quelle divine création que le masala chaï !

Pour finir, mes tous derniers remerciements vont enfin à mes chers acolytes et futurs collègues physiciens médicaux, Anthony et Nathan. Depuis notre rencontre en licence 3 à Orsay, jusqu'à assister à ma soutenance à Caen, vous avez probablement été mes plus grands soutiens de l'ombre. Si nos interactions quotidiennes ne sont pas toujours caractérisées par leur pertinence, elles m'ont nonobstant aidé à me relever ces dernières années et, je le pense, à me faire évoluer vers une personne que je peux enfin apprécier. Merci beaucoup les gars.

Table des matières

| | |
|--|------------|
| Remerciements | iii |
| Table des matières | v |
| Introduction | 1 |
| 1 Radiothérapie interne vectorisée et radiobiologie | 5 |
| 1.1 Cancer et radiothérapie | 5 |
| 1.2 Radiothérapie interne vectorisée | 7 |
| 1.2.1 Les différents types d'émetteurs | 9 |
| 1.2.2 De la conception d'un radiopharmaceutique à l'utilisation clinique | 14 |
| 1.3 Effets biologiques des rayonnements ionisants | 17 |
| 1.3.1 Effets biologiques directs et indirects | 18 |
| 1.3.2 Quantification en radiobiologie | 19 |
| 1.3.3 Spécificités de la radiothérapie interne vectorisée | 20 |
| 1.3.4 Essais <i>in vitro</i> de la radiothérapie interne vectorisée | 21 |
| 1.4 Dosimétrie en radiothérapie interne vectorisée | 24 |
| 1.4.1 Le formalisme du MIRD | 24 |
| 1.4.2 Dosimétrie des essais <i>in vitro</i> | 26 |
| 1.4.3 Microdosimétrie | 27 |
| 1.5 Conclusions | 31 |
| 2 Développement d'un nouveau système dosimétrique pour les essais <i>in vitro</i> | 33 |
| 2.1 Choix du détecteur pour la détection des particules α | 35 |
| 2.1.1 Détecteurs à émulsion | 35 |
| 2.1.2 Détecteurs gazeux | 36 |
| 2.1.3 Détecteurs scintillants | 37 |
| 2.1.4 Détecteurs à semi-conducteurs | 38 |
| 2.1.5 Contraintes associées aux essais <i>in vitro</i> des émetteurs α | 38 |
| 2.2 Détecteurs utilisés | 39 |
| 2.2.1 Caractéristiques opérationnelles | 40 |
| 2.2.2 Sources de bruits dans la mesure | 40 |
| 2.3 Pré-amplification du signal | 43 |
| 2.4 Système d'acquisition FASTER | 44 |
| 2.4.1 Présentation du système | 44 |
| 2.4.2 Traitement du signal et enregistrement des données | 45 |
| 2.5 Conception du système de spectroscopie en conditions <i>in vitro</i> | 47 |
| 2.5.1 Puits de cultures à fond mince | 48 |
| 2.5.2 Enceinte étanche pour l'électronique de détection | 49 |
| 2.6 Caractérisation expérimentale du système de spectroscopie | 50 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 2.6.1 | Caractérisation des détecteurs et de la chaîne d'acquisition | 51 |
| 2.6.2 | Mesure de l'épaisseur des feuilles de mylar | 55 |
| 2.6.3 | Utilisation du système en incubateur | 57 |
| 2.7 | Protocole expérimental <i>in vitro</i> | 58 |
| 2.7.1 | Préparation et irradiation des cellules | 59 |
| 2.7.2 | Radionucléides étudiés | 60 |
| 2.8 | Modélisation Monte-Carlo des essais <i>in vitro</i> | 61 |
| 2.8.1 | Simulations Geant4 | 62 |
| 2.8.2 | Géométrie de détection | 63 |
| 2.8.3 | Simulation de processus physiques | 65 |
| 2.8.4 | Description d'une source de particules | 66 |
| 2.8.5 | Enregistrement de grandeurs d'intérêt | 66 |
| 2.9 | Conclusions | 67 |
| 3 | Détermination de la distribution spatiale des radionucléides | 69 |
| 3.1 | Algorithme de déconvolution matricielle | 70 |
| 3.1.1 | Conventions et notations | 70 |
| 3.1.2 | Mise en équation du problème | 71 |
| 3.1.3 | Minimisation selon les moindres carrés non-négatifs | 75 |
| 3.1.4 | Optimisation à l'aide de l'algorithme de maximisation de vraisemblance | 76 |
| 3.1.5 | Contraintes physiques et expérimentales | 78 |
| 3.1.6 | Évaluation des incertitudes | 83 |
| 3.2 | Validation de l'algorithme de déconvolution matricielle | 85 |
| 3.2.1 | Simulation d'essais <i>in vitro</i> | 85 |
| 3.2.2 | Validation pour les essais simulés au ^{212}Pb | 89 |
| 3.2.3 | Validation pour les essais simulés au ^{223}Ra | 94 |
| 3.3 | Conclusions | 96 |
| 4 | Dosimétrie cellulaire par simulations Monte-Carlo | 99 |
| 4.1 | Grandeurs pour la caractérisation de l'irradiation | 100 |
| 4.1.1 | Facteurs S | 100 |
| 4.1.2 | Évaluation de la stochasticité de l'irradiation | 101 |
| 4.2 | Impact de la modélisation du milieu cellulaire sur les grandeurs dosimétriques | 102 |
| 4.2.1 | Modélisation des cellules | 102 |
| 4.2.2 | Impact de la confluence | 103 |
| 4.2.3 | Impact de la hauteur du milieu cellulaire | 104 |
| 4.3 | Application de la méthode dosimétrique | 108 |
| 4.3.1 | Distributions et conditions d'irradiation | 108 |
| 4.3.2 | Résultats | 109 |
| 4.4 | Conclusions | 113 |
| 5 | Application de la méthode de dosimétrie par déconvolution en conditions de mesures | |
| | <i>in vitro</i> | 115 |
| 5.1 | Irradiations préliminaires au ^{223}Ra | 116 |
| 5.1.1 | Évaluation expérimentale du nouveau système de dosimétrie | 116 |
| 5.1.2 | Impact du milieu de culture | 120 |
| 5.1.3 | Impact de l'activité injectée et de la présence de cellules | 123 |
| 5.1.4 | Conclusions | 125 |
| 5.2 | Irradiations <i>in vitro</i> au ^{212}Pb | 126 |
| 5.2.1 | Protocole expérimental | 126 |
| 5.2.2 | Analyse des acquisitions | 128 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.2.3 | Analyse des spectres en énergie | 130 |
| 5.2.4 | Évaluation des grandeurs dosimétriques | 133 |
| 5.2.5 | Évaluation des effets biologiques | 137 |
| 5.3 | Conclusions | 138 |
| 6 | Conclusions et perspectives | 141 |
| 6.1 | Conclusions | 141 |
| 6.2 | Perspectives | 143 |
| | Bibliographie | 147 |
| A | Détecteurs à semi-conducteurs à implantation ionique | 163 |
| A.1 | Dopage | 163 |
| A.2 | Spécificités des détecteurs à implantation ionique | 163 |
| B | Composition et simulation du milieu de culture | 167 |
| C | Spectroscopie des émissions β | 169 |
| C.1 | Positionnement du second détecteur | 169 |
| C.2 | Discrimination de différentes distributions spatiales | 170 |
| C.3 | Évaluation de l'activité totale dans les puits de culture | 171 |

Introduction

La lutte contre le cancer est une problématique de santé publique importante en France, les tumeurs constituant la première cause de décès entre 1990 et 2017 [1]. Cette forme de maladie, dont les localisations, les formes, les traitements adaptés et les taux de survie sont hétérogènes [2], nécessite encore aujourd'hui un soutien important de la recherche clinique et pré-clinique.

Parmi les traitements aujourd'hui disponibles, la radiothérapie, qui fait usage des phénomènes d'interaction des rayonnements ionisants avec la matière, constitue une des modalités principales. La radiothérapie en tant que concept regroupe elle-même des modalités très différentes, qui possèdent des intérêts complémentaires. Pour autant, ces modalités ne bénéficient aujourd'hui pas du même niveau de compréhension des mécanismes à l'origine des effets biologiques et thérapeutiques, ni du même niveau de contrôle sur la délivrance de l'irradiation.

En particulier, la radiothérapie interne vectorisée est une modalité d'irradiation très complémentaire à la radiothérapie externe, plus couramment utilisée. Basée sur l'utilisation de radiopharmaceutiques, des complexes moléculaires liant un vecteur biologique ciblant les cellules tumorales ou un marqueur biologique associé à un radionucléide, cette thérapie permet une irradiation de très faible portée à proximité du volume cible. Elle est donc particulièrement adaptée au traitement de cibles diffuses, comme par exemple les métastases. Malgré ce potentiel clinique important, la radiothérapie interne vectorisée est rarement un traitement de première ligne, en raison d'une dosimétrie complexe pour cette modalité mais surtout d'une compréhension encore incomplète des mécanismes radiobiologiques à l'origine de la toxicité aux tissus tumoraux et aux tissus sains [3].

Les radiopharmaceutiques se distinguent selon le type de particules émises par le radionucléide. Alors que plusieurs radiopharmaceutiques émetteurs β^- sont aujourd'hui utilisés en clinique, l'utilisation d'émetteurs α , à l'exception du ^{223}Ra , se limite actuellement au stade de la recherche pré-clinique. Les causes principales de cette différence d'avancement de la recherche entre les deux types d'émetteurs sont l'accessibilité beaucoup plus récente des émetteurs α , des noyaux plus lourds dont la production fait encore l'objet de recherches importantes en physique nucléaire [4], mais également la différence entre les effets biologiques induits par les deux types d'émissions [5]. Les émissions α sont caractérisés par un dépôt d'énergie très dense dans les tissus biologiques, et peuvent provoquer des dommages directs à l'ADN à la différence d'autres types d'irradiations. Cette spécificité leur attribuerait une meilleure efficacité pour le contrôle tumoral à dose équivalente, en particulier lorsque les cellules ciblées sont hypoxiques [6, 7].

La compréhension plus précise des mécanismes biologiques et physiques à l'origine de ce gain d'efficacité nécessitent des études pré-cliniques et *in vitro*, via l'établissement de modèles radiobiologiques [8]. La construction et l'affinement de nouveaux modèles radiobiologiques nécessite donc de caractériser un grand nombre de paramètres biologiques, mais également de réaliser une dosimétrie de précision pour renforcer la fiabilité des relations établies [9]. Les essais *in vitro* permettent donc l'évaluation de nouveaux radiopharmaceutiques, comme le ^{212}Pb - $\alpha\text{VCAM-1}$. Ce radiopharmaceutique, qui a été conçu pour le traitement des métastases cérébrales [10], est une source de particules α via la désintégration du ^{212}Bi . Dans le cas d'irradiations α , la dose délivrée devient fortement dépendante de la distribution spatiale de l'activité à proximité

des cultures cellulaires. Si des techniques existent aujourd'hui pour quantifier l'activité fixée ou internalisée par les cellules, aucune solution instrumentale n'est aujourd'hui disponible pour évaluer la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture. L'objectif de ce projet de thèse était donc de proposer une telle solution instrumentale permettant de réaliser une dosimétrie des essais *in vitro* des radiopharmaceutiques émetteurs α .

Au **Chapitre 1**, le contexte du développement d'un nouveau système de dosimétrie pour les essais *in vitro* de la radiothérapie interne vectorisée par émetteurs α , qui s'inscrit dans le développement d'un nouveau radiopharmaceutique émetteur basé sur le ^{212}Pb , est présenté. Si la très faible portée des émetteurs α leur confère un avantage pour l'irradiation de volumes cibles diffus et localisés dans des organes sensibles, comme les métastases cérébrales, cet avantage complexifie significativement la dosimétrie des essais *in vitro*. Lorsque le radiopharmaceutique ou le radionucléide émetteur α testé n'est pas fixé ou internalisé par les cellules irradiées, la dosimétrie devient significativement dépendante de la distribution spatiale de l'activité dans le milieu de culture. Celle-ci peut être évaluée à l'aide d'un nouveau système de dosimétrie, développé au cours de cette thèse.

Celui-ci réalise une spectroscopie en énergie des particules α émises depuis le milieu de culture et atteignant le détecteur. La distribution en énergie des émissions α mesurée au cours de l'irradiation est corrélée aux épaisseurs de milieu traversées et donc à la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture, ainsi qu'à son évolution au cours de l'irradiation. Le **Chapitre 2** présente ce nouveau système de dosimétrie, et sa caractérisation. Utilisant des détecteurs à semi-conducteurs, la conception d'une enceinte étanche permettant de positionner les détecteurs et leurs pré-amplificateurs à proximité des puits de culture, dans l'atmosphère humide d'un incubateur cellulaire, est présentée. Pour permettre la transmission des particules α depuis le milieu de culture vers les détecteurs, des plaques de culture à fond mince en mylar ont également été réalisées et utilisées. L'interface entre les détecteurs et l'extérieur de l'enceinte étanche consiste également en une fine couche de mylar aluminisé, dont la caractérisation expérimentale est présentée. Enfin, la modélisation du système de dosimétrie sous Geant4 est décrite, afin de simuler la réponse des détecteurs utilisés en fonction du lieu d'émission des particules α dans les puits de culture.

Ces simulations permettent de construire une base de spectres dont les allures dépendent du lieu d'émission des particules α et de leur énergie. Du fait de la géométrie de l'irradiation *in vitro* de cultures cellulaires bi-dimensionnelles, une discrétisation verticale de la distribution de l'activité a été considérée pour les simulations de réponse des détecteurs. Une nouvelle méthode de déconvolution spectrale utilisant cette base, et exposée au **Chapitre 3**, a été développée et permet d'ajuster un spectre en énergie mesuré par un détecteur à l'aide d'une somme pondérée des spectres simulés. Les poids associés correspondent alors à l'activité présente aux différentes localisations selon l'axe vertical dans les puits de culture. L'algorithme de déconvolution est basé sur l'utilisation d'une fonction de minimisation, contrainte par plusieurs considérations physiques afin de limiter les phénomènes de sur-ajustement et qui garantit donc l'obtention de distributions d'activité réalistes. Chaque contrainte et son impact sur l'algorithme d'ajustement sont discutés au cours de ce chapitre. Enfin, une validation du nouvel algorithme développé est présentée. Elle repose sur des simulations d'irradiations *in vitro* au ^{212}Pb et au ^{223}Ra , les deux radionucléides utilisés expérimentalement au cours de cette thèse, et a pour objectif de quantifier l'incertitude sur la distribution spatiale évaluée par l'algorithme ainsi que sur la dosimétrie cellulaire.

La dosimétrie, qui repose sur le formalisme du MIRD, nécessite également d'évaluer la dose moyenne délivrée aux cibles d'intérêt, appelée facteur S, en fonction de différents lieux d'émissions depuis le milieu de culture. L'évaluation de ces facteurs S a été réalisée à l'aide de simulations Geant4, et nécessite de modéliser le milieu cellulaire. Au **Chapitre 4**, une évaluation de l'impact de deux paramètres descriptifs du milieu cellulaire, sa hauteur ainsi que sa confluence,

est exposée. De plus, une méthodologie permettant d'évaluer la stochasticité de l'irradiation, c'est-à-dire la fluctuation sur la dose reçue par les différentes cibles, est proposée. Basée sur le formalisme microdosimétrique, elle permet d'évaluer la nécessité de prolonger la dosimétrie réalisée par une étude micro-dosimétrique, plus complexe. L'impact de la modélisation cellulaire sur les grandeurs microdosimétriques évaluées est également étudié au cours de ce chapitre.

L'utilisation du nouveau système de dosimétrie est présentée au **Chapitre 5**, pour des irradiations préliminaires au ^{223}Ra proches des conditions *in vitro*, ainsi qu'une étude *in vitro* de la radiosensibilité de cellules tumorales à une irradiation au ^{212}Pb . Les essais préliminaires présentés ont eu pour objectif de valider l'efficacité du dosimètre et du modèle de déconvolution spectrale, en particulier dans le cas d'une chaîne de décroissance complexe. L'analyse de ces essais a également permis d'évaluer l'impact de certains paramètres expérimentaux, comme la composition du milieu de culture ou l'activité injectée, sur la distribution d'activité et donc sur la dosimétrie. Les essais *in vitro* au ^{212}Pb ont quand à eux permis de valider l'utilisation du nouveau système de dosimétrie en incubateur et en présence d'une forte confluence cellulaire dans les puits de culture, et de discuter de l'établissement d'une relation entre activité injectée et dose mesurée.

Enfin, une conclusion récapitulative des résultats principaux associés à la conception et à l'utilisation du nouveau système de dosimétrie est proposée au **Chapitre 6**. Elle est suivie d'une discussion sur les perspectives d'évolution de ce système, en particulier pour s'adapter à davantage de conditions expérimentales pour les essais *in vitro*.

1 | Radiothérapie interne vectorisée et radiobiologie

Sommaire du chapitre

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.1 | Cancer et radiothérapie | 5 |
| 1.2 | Radiothérapie interne vectorisée | 7 |
| 1.2.1 | Les différents types d'émetteurs | 9 |
| 1.2.2 | De la conception d'un radiopharmaceutique à l'utilisation clinique | 14 |
| 1.3 | Effets biologiques des rayonnements ionisants | 17 |
| 1.3.1 | Effets biologiques directs et indirects | 18 |
| 1.3.2 | Quantification en radiobiologie | 19 |
| 1.3.3 | Spécificités de la radiothérapie interne vectorisée | 20 |
| 1.3.4 | Essais <i>in vitro</i> de la radiothérapie interne vectorisée | 21 |
| 1.4 | Dosimétrie en radiothérapie interne vectorisée | 24 |
| 1.4.1 | Le formalisme du MIRD | 24 |
| 1.4.2 | Dosimétrie des essais <i>in vitro</i> | 26 |
| 1.4.3 | Microdosimétrie | 27 |
| 1.5 | Conclusions | 31 |

1.1 Cancer et radiothérapie

La notion de *cancer* est un terme médical regroupant les maladies impliquant une prolifération anormale et incontrôlée de cellules. Les cellules tumorales apparaissent lorsque certaines voies de signalisation cellulaires deviennent défectueuses, du fait de dégâts accumulés à l'ADN non réparés. Ces altérations entraînent un dysfonctionnement des mécanismes de mort cellulaire, et les rendent enclines à se multiplier de façon anarchique.

En France, la prise en charge du cancer constitue un enjeu de santé publique majeur, avec une estimation de 382 000 nouveaux cas de cancers et de 157 400 décès en France en 2018 [2], et des dépenses associées dans le milieu hospitalier s'élevant à 5,9 milliards d'euros en 2020 [11]. Bien que l'estimation du nombre de cancers déclarés chaque année soit relativement stable (sans augmentation de l'incidence chez l'homme entre 1990 et 2018 et avec une légère augmentation de 1,1 % par an chez la femme), le nombre de cancers dépistés est en forte croissance et, couplé à une amélioration des techniques de prise en charge, s'associe à une diminution de la mortalité sur la même période (de 1,8 % par an chez l'homme et de 0,8 % par an chez la femme).

Les cancers se distinguent selon le type de cellules atteintes, leur localisation et leur volume. Les traitements utilisés varient selon le type de cancer, en se basant principalement sur des

techniques de chirurgie, de chimiothérapie, ou de radiothérapie, chacune avec leurs intérêts et leurs limites. Les actes chirurgicaux, les plus nombreux, peuvent être à visée diagnostique, afin de classer le type de cancer présent chez le patient et donc d'adapter la stratégie thérapeutique à suivre, ou bien à visée thérapeutique, par des actes de résection tumorales réalisés lorsque le volume à éliminer est suffisamment facile d'accès [12]. Les chimiothérapies regroupent l'ensemble des traitements médicamenteux dont l'objectif est de freiner le développement ou d'éliminer certains types de cellules spécifiques. Ils se basent sur un mécanisme de ciblage spécifique des cellules pour éliminer les tumeurs éventuellement diffuses dans le corps du patient. Ces traitements peuvent être employés antérieurement à un acte chirurgical pour faciliter la résection, ou ultérieurement pour diminuer les risques de récurrence [13]. Enfin, la radiothérapie est une méthode de traitement loco-régionale, utilisant l'interaction des rayonnements ionisants avec la matière pour éliminer les cellules tumorales. La radiothérapie permet un traitement balistique des tumeurs dont le volume est clairement défini, et épargne plus ou moins bien les tissus sains aux alentours selon le type de particules constituant le rayonnement [14].

L'interaction des rayonnements ionisants avec la matière est quantifiée par la dose absorbée, dont l'unité est le Gray (Gy, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$). La dose absorbée est une grandeur intensive, définie pour un volume élémentaire comme le ratio entre l'énergie cédée par le rayonnement incident ϵ lors de la traversé du volume, et la masse m du volume :

$$D = \frac{\epsilon}{m} [\text{Gy}] \quad (1.1)$$

Les traitements de radiothérapie ont pour objectif de maximiser la dose délivrée aux tissus tumoraux tout en épargnant les tissus sains alentours. Selon le type de cancer traité, le choix de la technique d'irradiation variera afin d'atteindre cet objectif. Cependant, toutes les techniques aujourd'hui utilisées délivrent systématiquement une dose non-négligeable aux tissus sains, entraînant des complications pour le patient si la dose devant être délivrée à la tumeur est trop élevée. Une notion de fenêtre thérapeutique a donc été introduite en radiothérapie, et consiste à déterminer la dose optimale à délivrer à une cible tumorale pour maximiser les chances de son élimination (contrôle tumoral) tout en limitant l'irradiation des tissus sains (complications). La fenêtre thérapeutique varie selon la méthode d'irradiation utilisée et la biologie de la tumeur à traiter et des tissus sains alentours, et rend ainsi le concept de dosimétrie central en radiothérapie.

Les méthodes de radiothérapies utilisées peuvent se séparer en deux catégories principales, selon le lieu d'émission du rayonnement ionisant. La radiothérapie externe, plus couramment utilisée, utilise des sources de rayonnement produites à l'extérieur du patient, généralement à l'aide d'accélérateurs linéaires d'électrons. Les irradiations sont réalisées à l'aide de faisceaux de photons, d'électrons, et dans de plus rare cas, de hadrons. Ces faisceaux sont principalement utilisés pour le traitement des tumeurs solides. Afin d'optimiser la fenêtre thérapeutique, le type de particule émise, le spectre en énergie d'émission, la collimation du faisceau et son orientation peuvent être ajustés, par l'établissement d'un plan de traitement en amont de l'irradiation.

L'autre catégorie de traitement, sur laquelle le propos de ce manuscrit se concentre, regroupe les techniques de radiothérapies internes. Les techniques de radiothérapie externe peuvent parfois être problématiques en terme de dose délivrée aux tissus sains lorsque la dose nécessaire au contrôle tumoral est élevée, ou lorsque les tissus sains à proximité de la tumeur sont particulièrement sensibles, ce qui réduit fortement la largeur de la fenêtre thérapeutique. Dans le cas de cibles de très faibles dimensions ou diffuses, les cancers traités ne sont plus locaux-régionaux et les techniques de radiothérapie externes peuvent difficilement cibler uniquement les tissus tumoraux sans irradier significativement les tissus alentours. La radiothérapie interne permet de contourner ces limites en introduisant les sources d'irradiation à l'intérieur du patient. Constituant la dimension thérapeutique des techniques de médecine nucléaire, elle emploie des

sources de rayonnement radioactives, et étant désormais non collimatées, elles sont placées autant que possible à proximité de la cible à traiter. Les particules constituant le rayonnement sont choisies pour être peu pénétrantes dans le milieu biologique, afin de limiter l'irradiation des tissus sains à distance de la source. Cette proximité de la source permet de délivrer des doses au tissu tumoral beaucoup plus élevées que celles atteignables pour le patient en radiothérapie externe.

Une sous-division des radiothérapies internes s'effectue enfin selon que la position de la source de rayonnement est contrôlée physiquement ou non. Le premier cas constitue le domaine de la brachythérapie. Des sources scellées sont utilisées pour les tumeurs solides facilement accessibles naturellement ou par chirurgie, et sont fixées au contact des tissus à traiter. Certains traitements des cavités naturelles peuvent aussi employer des projecteurs de source, dont la position et la durée d'irradiation est contrôlée séance par séance, similairement aux techniques de radiothérapie externe.

Pour d'autres types de cancers, notamment le traitement de cancers liquides, diffus ou métastatiques, une source non scellée est injectée dans le système sanguin du patient, ou ingérée par ce dernier, similairement aux traitements réalisés en chimiothérapie. Une affinité de la source avec les cellules tumorales à traiter permettra de localiser les sources en majorité à leur proximité et de limiter l'irradiation des tissus sains. On parle alors de radiothérapie métabolique, aussi appelée radiothérapie interne vectorisée. C'est dans le contexte de cette modalité que s'inscrit ce projet de thèse, qui est présenté plus en détails dans les paragraphes suivants.

1.2 Radiothérapie interne vectorisée

La radiothérapie interne vectorisée (RIV) se base sur l'injection de radiopharmaceutiques au patient. Comme mentionné précédemment, la RIV fonctionne selon un principe similaire à celui de la chimiothérapie, en exploitant une spécificité du traitement injecté aux cellules tumorales. Les radiopharmaceutiques sont composés d'un élément ayant une affinité biologique particulière avec les cellules tumorales à traiter appelé vecteur biologique, et d'un radionucléide source de rayonnements ionisants pour la délivrance d'une dose à l'environnement proche. La liaison entre le vecteur biologique et le radionucléide est assurée par un composé appelé chélateur, ou ligand. Une description de la structure typique d'un radiopharmaceutique est proposée dans les paragraphes suivants, et illustrée en **Figure 1.1**.

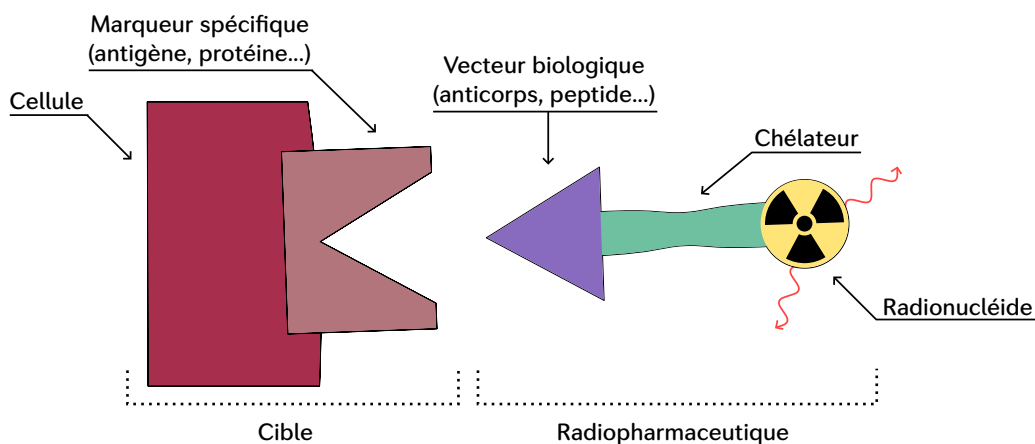


Figure 1.1 – Composantes principales d'un radiopharmaceutique. Le vecteur biologique a pour rôle de se fixer sur des marqueurs spécifiques exprimés par les cellules ciblées par la thérapie.

Vecteur biologique – L'utilisation de sources radioactives non-scellées injectées au patient remonte aux premiers essais de Hertz utilisant de l'iode radioactif [15] (^{128}I), menant au premier

traitement clinique réalisé en 1941 [16]. L'iode radioactif est encore aujourd'hui utilisé sous la forme ^{131}I dans le traitement des maladies thyroïdiennes, l'iode étant naturellement absorbé par la glande thyroïdienne. Cependant, dans de nombreux cas, les cellules à éliminer n'ont d'affinité avec aucun des radionucléides utilisables en clinique, et l'utilisation d'un vecteur biologique assurant leur fixation à proximité de la cible est nécessaire. Le vecteur biologique est généralement constitué d'un anticorps ciblant spécifiquement certains marqueurs antigéniques présents en surface des cellules à irradier, ou bien à d'un peptide pouvant être internalisé par certaines protéines présentes en surfaces des cellules [17, 18].

Radionucléide – La source de rayonnements ionisants pour la délivrance de la dose est un radionucléide dont les propriétés présentent un avantage dans la conception et l'utilisation clinique du radiopharmaceutique. Le choix d'un radionucléide est motivé en premier lieu par ses propriétés physiques, avec en particulier ses émissions par décroissance, ses produits fils, sa demi-vie, et sa chaîne de décroissance incluant les propriétés physiques de l'ensemble des radionucléides fils [19].

Le type d'émission, qui sera discuté plus en détail en **Section 1.2.1**, a un impact sur la zone d'effet d'un radiopharmaceutique et sur la dose délivrée à l'environnement pour chaque désintégration. Les radiopharmaceutiques utilisent tous des rayonnements dits *non-pénétrants*, dont la portée dans un milieu biologique varie de quelques μm dans le cas d'émetteurs Auger à quelques cm pour certains émetteurs β^- .

La demi-vie d'un radionucléide est également un facteur important à considérer, puisqu'elle conditionne à la fois l'activité et donc la dose pouvant être délivrée au patient pour une quantité de radiopharmaceutique injectée, mais aussi la durée durant laquelle l'irradiation se produit de manière significative dans le corps du patient. Si le vecteur biologique utilisé est caractérisé par une faible demi-vie biologique, qui correspond à une durée caractéristique pour l'élimination du radiopharmaceutique par l'organisme, la demi-vie du radionucléide doit être adaptée pour assurer que l'irradiation des tissus tumoraux délivre une dose suffisante avant l'élimination biologique du radiopharmaceutique. Des problématiques liées à l'utilisation en clinique, notamment concernant la radioprotection des travailleurs, influent également le choix d'un radionucléide selon sa durée de demi-vie.

Enfin, le choix d'un radionucléide peut également être motivé par la possibilité d'imager la biodistribution du radiopharmaceutique, afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique du traitement pour le patient ou d'en réaliser une dosimétrie. Idéalement, un radiopharmaceutique à visée thérapeutique est couplé à un radiopharmaceutique à visée diagnostique, qui utilise le même vecteur biologique mais utilise un radionucléide dont les émissions peuvent être imagées. Un tel couple de radiopharmaceutiques est désigné sous le mot-valise *théranostique*. Pour que l'imagerie réalisée avec le radionucléide diagnostique soit représentative de la biodistribution du radiopharmaceutique thérapeutique, ceux-ci doivent partager des propriétés physiques similaires. Les considérations majeures portent sur l'affinité chimique du nucléide utilisé avec le vecteur biologique ou le ligand les reliant (si possible, l'élément chimique utilisé est identique), sur sa demi-vie et sur son type d'émission. Le radiopharmaceutique diagnostique doit en effet se comporter d'une façon similaire à celle du radiopharmaceutique thérapeutique, et doit pouvoir être imageable. Les émetteurs γ et β^+ sont donc utilisés, imagés respectivement par tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et par tomographie d'émission de positron (TEP).

Chélateur – Afin d'assurer la délivrance de l'irradiation à proximité des cellules cibles, l'intégrité du radiopharmaceutique doit être maintenue durant l'administration du traitement au patient. Généralement, le radionucléide n'a pas d'affinité chimique particulière avec le vecteur biologique si les deux composantes sont distinctes. Le chélateur, ou ligand, est une molécule introduite lors de la conception du radiopharmaceutique présentant une affinité

chimique avec le vecteur biologique et le radionucléide. Les propriétés d'un bon chélateur incluent un bon rendement lors de l'étape de complexation du radiopharmaceutique (appelée radiomarquage), et une bonne stabilité chimique, limitant les risques de relargage du radionucléide avant l'émission de l'irradiation à proximité des cellules tumorales. Le choix du chélateur dépend donc majoritairement de la chimie du radionucléide [20]. Pour de nombreux radionucléides métalliques, notamment les lanthanides, le composé organique DOTA (pour *dodecane tetraacetic acid* en anglais) est le chélateur de référence. Il est présent notamment dans la composition du radiopharmaceutique ^{177}Lu -DOTA-TATE, qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2017 dans l'Union Européenne et est commercialisé aujourd'hui sous le nom Lutathera. Ce radiopharmaceutique, dont la structure est présentée en **Figure 1.2**, utilise un émetteur β^- pour le traitement des tumeurs neuroendocrines intestinales [21]. Pour d'autres radionucléides, caractérisés par des chimies différentes de celles des lanthanides, des chélateurs dérivés du DOTA assurent une meilleure stabilité du radiopharmaceutique *in vivo* et sont donc préférés. Par exemple, à ce jour, le meilleur chélateur identifié à ce jour pour le ^{212}Pb est le composé TCMC (pour *tetra(2-carbamoylmethyl)cyclododecane*) [22]. Pour certains éléments à la chimie particulière, comme le cuivre ou l'astate, d'autres structures de chélateurs dénommées cages sont préférées pour assurer la stabilité du radiopharmaceutique [20, 23]. Enfin, dans certaines applications, le radionucléide joue également le rôle du vecteur biologique, et le chélateur n'est alors pas nécessaire. En clinique, l' ^{138}I (sous la forme d'iodure de sodium, Na^{138}I) est utilisé pour le traitement des affections et des cancers thyroïdiens, et le ^{223}Ra (sous la forme de dichlorure de radium, $\text{Cl}_2^{223}\text{Ra}$) est utilisé dans le traitement des cancers de la prostate métastasés à l'os [24].

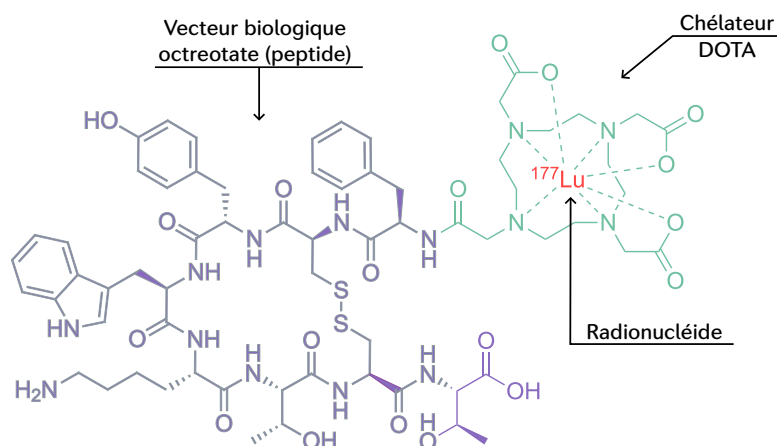


Figure 1.2 – Formule développée du Lutathera. Les différents composants sont identifiés par le code couleur utilisé en **Figure 1.1**.

1.2.1 Les différents types d'émetteurs

Comme introduit dans le paragraphe précédent, un des critères permettant d'élire un radionucléide pour la conception d'un radiopharmaceutique porte sur le(s) type(s) de particules émises lors de sa désintégration. Pour assurer que l'irradiation se fasse localement, celles-ci doivent avoir une portée limitée. Trois types d'émetteurs thérapeutiques sont donc utilisés : les émetteurs β^- , α et Auger. Après avoir introduit leurs mécanismes d'interaction avec la matière biologique, une discussion des avantages et des limites de ces types d'émetteurs est proposée.

1.2.1.1 Interaction des particules chargées avec la matière

La dose délivrée est liée d'après l'**Équation 1.1** à la perte d'énergie des particules chargées, et donc à un transfert d'énergie au milieu environnant. Pour l'ensemble des radiopharmaceutiques

utilisés en clinique ou étudiés, le type de particules émises et leur énergie ne font principalement intervenir qu'un seul type de transfert d'énergie : les chocs coulombiens. Dans une très faible mesure, dans le cas des électrons, des transferts d'énergie par rayonnement peuvent également se produire. Ces transferts d'énergie sont décrits dans les paragraphes suivants.

Pouvoir d'arrêt — Les interactions se traduisent par un transfert d'énergie Q d'une particule incidente à une particule cible. Les interactions étant des phénomènes stochastiques, leur probabilité d'occurrence est décrite par une section efficace notée σ , en cm^{-2} . Si ces transferts d'énergie ont lieu à une fréquence suffisamment élevée, la perte d'énergie de la particule incidente devient continue et peut être quantifiée par un pouvoir d'arrêt $S = -\frac{dE}{dx}$, en $\text{MeV} \cdot \text{cm}^{-1}$, qui correspond à la moyenne de l'énergie perdue par la particule incidente par unité de longueur parcourue. En évaluant la dépendance de la section efficace avec l'énergie transférée à la particule cible, le pouvoir d'arrêt se calcule comme :

$$S = -\frac{dE}{dx} = n_{\text{cible}} \int_{Q_{\min}}^{Q_{\max}} Q \frac{d\sigma}{dQ} dQ \quad (1.2)$$

où n_{cible} est la densité des particules cibles du transfert d'énergie dans le matériau, et Q_{\min} et Q_{\max} correspondent respectivement aux énergies minimales et maximales transférables par le processus considéré. Chaque type de processus à l'origine de transfert d'énergie peut se traduire par un pouvoir d'arrêt. Ces pouvoirs d'arrêts peuvent ensuite être sommés pour obtenir le pouvoir d'arrêt total d'un matériau pour une particule incidente.

Interactions électroniques — La majorité des interactions des particules chargées avec les milieux biologiques se font par collisions avec les structures électroniques des noyaux environnants, appelées interactions coulombiennes. Lors de la traversée du champ électrique d'un atome par une particule chargée incidente, un transfert d'énergie aux électrons atomiques les plus proches de la trajectoire a lieu. La quantité d'énergie transférée dépend principalement du paramètre d'impact de l'interaction (la distance entre les particules en interaction), de l'énergie cinétique de la particule incidente et de sa charge. Dans le cas des particules chargées dites lourdes, c'est à dire de masse largement supérieure à celle de l'électron, le pouvoir d'arrêt du rayonnement incident lié aux interactions électroniques est donnée par la formule de Bethe-Bloch [25] :

$$\left(\frac{S}{\rho}\right)_{el} = \frac{4\pi}{m_e c^2} \frac{\mathcal{N}_A Z}{A} \frac{z^2}{\beta^2} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0}\right)^2 \times \left[\ln \left(\frac{2m_e c^2 \beta^2}{I(1-\beta^2)} \right) - \beta^2 \right] \quad (1.3)$$

ou m_e désigne la masse de l'électron, e la charge de l'électron, c la vitesse de la lumière, β la vitesse réduite de la particule chargée, ϵ_0 la permittivité du vide, \mathcal{N}_A le nombre d'Avogadro, Z le nombre atomique du milieu, A le nombre de masse du milieu, ρ la masse volumique du milieu, et I le potentiel d'ionisation du milieu. Cette formule montre une dépendance du pouvoir d'arrêt avec la particule incidente, proportionnelle au carré de sa charge z et inversement proportionnelle au carré de sa vitesse, mais aussi avec le milieu, notamment son rapport Z/A et sa masse volumique ρ . Pour des particules α de moins de 10 MeV, le pouvoir d'arrêt par collision croît significativement le long de la trajectoire de la particule, jusqu'à atteindre un maximum au delà duquel le pouvoir d'arrêt chute rapidement. La position de ce maximum suivie d'une chute du pouvoir d'arrêt, illustrée en **Figure 1.3a**, est nommée pic de Bragg.

Lorsque la particule incidente est plus légère, comme dans le cas des électrons, certains phénomènes physiques additionnels doivent être pris en compte et nécessitent de modifier la

formule de l'Équation 1.3. Pour les électrons, la formule du pouvoir d'arrêt devient [25] :

$$\left(\frac{S}{\rho}\right)_{el} = \frac{2\pi}{m_e c^2} \frac{\mathcal{N}_A Z}{A} \frac{1}{\beta^2} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0}\right)^2 \times \left[\ln\left(\frac{\tau^2(\tau+2)}{2(I/m_e c^2)^2}\right) + F(\tau) - \delta \right] \quad (1.4)$$

où τ est l'énergie cinétique de l'électron incident, δ une correction d'effet de densité électronique qui tend à réduire l'intensité des interactions [26], et :

$$F(\tau) = 1 - \beta^2 + \frac{\tau^2}{8 - (2\tau + 1) \ln 2} \frac{1}{(\tau + 1)^2} \quad (1.5)$$

est une correction relativiste.

Pour des électrons dont l'énergie cinétique initiale est supérieure à 500 keV, le pouvoir d'arrêt électronique est relativement constant le long de la trajectoire, avant de croître exponentiellement en fin de trajectoire, comme illustré en **Figure 1.3b**. En fin de parcours, l'électron est brutalement arrêté par thermalisation avec les électrons du milieu ambiant.

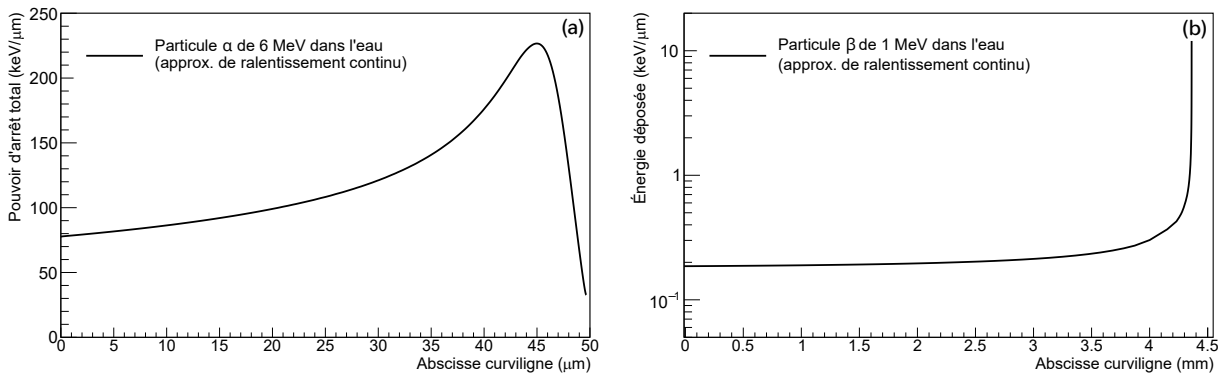


Figure 1.3 – Évolution des pouvoirs d'arrêt totaux pour (a) une particule α de 6 MeV et (b) une particule β de 1 MeV en fonction de leur distance parcourue dans l'eau. Les courbes ont été obtenues à partir des bases de données ASTAR et ESTAR du NIST [27], sous l'hypothèse de ralentissement continu des particules. Les valeurs de pouvoir d'arrêt ont été considérées jusqu'à une énergie minimale de 1 keV.

Les Équations 1.3 et 1.4 décrivent les pertes d'énergies des particules le long de leurs trajectoires, mais ne renseignent pas sur l'allure des traces des particules. Les particules légères possédant une masse similaire à celle de leurs cibles, celles-ci seront sujettes à de fortes déviations de leur trajectoire lors des interactions avec les couches électroniques, à l'inverse des particules plus lourdes dont les trajectoires sont quasi-rectilignes, comme présenté en **Figure 1.4**. Pour une particule α de quelques MeV, les transferts d'énergie individuels sont assez faibles (de l'ordre de quelques dizaines d'eV par interaction) mais très fréquents, rendant la trajectoire quasi-rectiligne. Au delà du pic de Bragg, la probabilité d'interaction avec les électrons atomique du milieu chute, et les phénomènes d'atténuation sont progressivement remplacés par la présence de chocs élastiques avec les noyaux du milieu, qui ne produisent donc pas de particules chargées secondaires. Ces phénomènes sont illustrés en **Figure 1.4a**, qui représente une simulation du parcours d'une particule α de 3 MeV dans l'eau. Pour les particules β , beaucoup plus légères, la densité d'ionisation est beaucoup moins importante que dans le cas des particules α et consiste majoritairement d'excitations des atomes du milieu, mais les transferts d'énergies peuvent parfois significativement impacter la trajectoire de la particule incidente. La perte d'énergie est également plus irrégulière que dans le cas des particules α , avec l'apparition de traces secondaires dont les longueurs sont significatives du fait d'un fort transfert d'énergie par ionisation. Ces

électrons secondaires sont aussi appelés électrons δ . De ce fait, dans le référentiel de la cible et pour de nombreuses irradiations, la courbe du pouvoir d'arrêt électronique en fonction de l'abscisse curviligne de la particule diffère largement de la courbe du rendement de dose en profondeur. Pour illustrer ces propos, une simulation de la trace de trois particules β de 1 MeV est proposée en **Figure 1.4b**. Bien que chacune des traces ait une longueur d'environ 4,5 mm, le dépôt d'énergie est en pratique plus localisé à proximité du lieu d'émission du fait de l'irrégularité des traces.

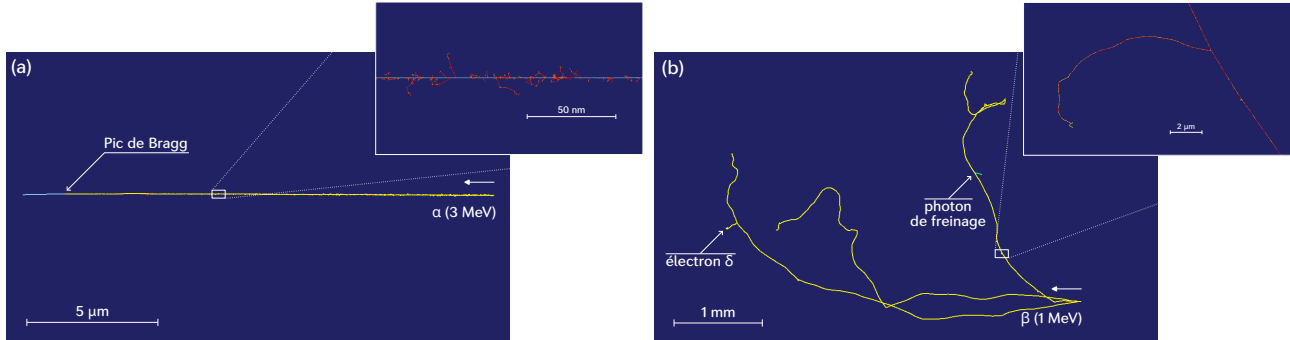


Figure 1.4 – Simulations Monte-Carlo de traces dans l'eau pour (a) une particule α de 3 MeV et (b) 3 électrons de 1 MeV. Les traces ont été simulées à l'aide de Geant4 (voir **Chapitre 2**). Les lieux d'interactions sont marqués par des points jaunes. Les trajectoires des particules α , des électrons et des photons sont indiquées respectivement en bleu, en rouge et en vert. Sur la **Figure (a)**, le pic de Bragg apparaît clairement, au-delà duquel les énergies déposées sont trop faibles pour mener à la production de particules secondaires.

Transfert d'énergie linéique – Les interactions électroniques contribuent à un dépôt local de l'énergie dans la matière, en particulier aux énergies considérées en RIV, comme le montrent les structures de traces en **Figure 1.4**. Le transfert d'énergie linéique (TEL) est une grandeur permettant de caractériser l'intensité locale du dépôt d'énergie d'une particule incidente. Pour les irradiations réalisées en RIV, le TEL est donc égal au pouvoir d'arrêt électronique S_{el} .

Pertes par rayonnement – Le champ électromagnétique généré par les noyaux a un impact sur la trajectoire des particules chargées passant à proximité. La déviation de la trajectoire des particules chargées correspond à une accélération, entraînant l'émission d'un photon permettant de satisfaire la condition de conservation de l'énergie, appelé rayonnement de freinage ou Bremsstrahlung. L'intensité du rayonnement de freinage dépend du rapport entre le nombre de charge moyen des noyaux du milieu, Z , et la masse de la particule incidente. Dans l'eau, dont le nombre de charge moyen est faible, ce type d'interaction se produit pour les électrons de façon significative uniquement pour des énergies supérieures à 10 MeV, ce qui les rend minoritaires pour les énergies considérées en RIV. Les particules α sont quant à elle trop lourdes pour générer du rayonnement de freinage dans la matière biologique. La totalité des dépôts d'énergie des émissions en RIV s'effectue donc par interactions coulombiennes, et le TEL d'une particule est donc égal au pouvoir d'arrêt total S de la particule émise.

1.2.1.2 Émetteurs β^-

Historiquement, les émetteurs β^- ont été les premiers à avoir été utilisés en RIV. Les isotopes émetteurs β^+ et β^- sont en effet largement majoritaire parmi les nucléides aujourd'hui découverts. Les désintégrations β^- désignent la production d'électrons selon la réaction suivante :



La réaction impliquant également la production d'anti-neutrinos électroniques, l'énergie libérée par la désintégration est partagée entre les deux particules émises, et le spectre en énergie des émissions β^- est un spectre continu. Ce spectre est généralement caractérisé par les valeurs d'énergie moyenne ou d'énergie maximale des particules β^- émises.

Les énergies maximales associées aux émissions β^- utilisées en RIV vont de 50 keV à quelques MeV, pour un transfert d'énergie linéique généralement aux alentours de $0,2 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ (voir **Figure 1.3b**), et une portée pouvant atteindre 1 cm. Ces émissions sont donc particulièrement adaptées aux tumeurs ou aux métastases de taille millimétrique.

1.2.1.3 Émetteurs α

Contrairement aux émetteurs β , les émetteurs α , qui sont généralement des noyaux plus lourds, ont souffert d'une accessibilité réduite, limitant leur utilisation clinique. Grâce à de nouvelles avancées sur la production d'émetteurs α et du fait de leur profil de dépôt de dose discuté dans ce paragraphe, la RIV par émetteurs α (RIV- α) est aujourd'hui un sujet de recherche majeur en médecine nucléaire [28].

Les désintégrations α de noyaux radioactifs produisent des noyaux d'hélium, aussi appelés particules α , selon la réaction suivante :



Le noyau fils, Y , peut être produit dans divers états excités. Ces niveaux étant quantifiés, les spectres en énergie des particules α émises sont des spectres de raies.

Les émetteurs α considérés pour la RIV (voir **Section 1.2.2**) sont caractérisés par des énergies d'émission comprises entre 4 et 9 MeV, pour des valeurs de TEL supérieures à $60 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ (voir **Figure 1.3a**), et des portées inférieures à $100 \mu\text{m}$ dans l'eau ou les tissus biologiques, ce qui correspond à quelques diamètres cellulaires autour du lieu d'émission. Ces émetteurs sont donc préférés pour le traitement des métastases de taille très réduite, ou situées à proximité de tissus sensibles. Une cellule ciblée par un radiopharmaceutique émetteur α peut donc recevoir une dose importante, là où la plus faible densité d'ionisation des émetteurs β^- entraîne une délivrance de dose majoritairement aux cellules environnantes plutôt qu'à la cellule ciblée.

1.2.1.4 Émetteurs Auger

L'effet Auger est le nom attribué à l'émission d'un électron de faible énergie pouvant se produire lors du processus de désexcitation du cortège électronique d'un atome. Le cortège électronique peut être excité lorsqu'il présente une vacance, qui peut être comblée par le déplacement d'un électron des couches supérieures. Le gain d'énergie du cortège électronique résulte soit en l'émission d'un photon X, soit en l'éjection d'un autre électron atomique avec une énergie de l'ordre de la dizaine de keV : cet électron est appelé électron Auger. Du fait de leurs faibles énergies cinétiques, les électrons Auger sont caractérisés par un parcours extrêmement réduit associé à des valeurs de TEL très élevées. Les électrons Auger déposent ainsi toute leur énergie sur moins de $1 \mu\text{m}$ [29].

L'effet Auger peut par exemple être observé pour les noyaux radioactifs se désintégrant par capture électronique. Dans ce processus, un proton du noyau atomique absorbe un électron des couches les plus internes, se transformant alors en neutron et résultant en l'émission d'un anti-neutrino électronique. Ce mode de décroissance génère directement une vacance dans le cortège électronique qui peut résulter en l'émission d'un électron Auger. L'irradiation n'est donc réalisée que par les émissions Auger lors du processus de désexcitation du noyau fils [30].

L'effet Auger est également observé à la suite d'autres types de désintégrations. Lors de la désintégration d'un noyau radioactif, le noyau fils peut être produit dans un état excité. Deux

phénomènes peuvent alors mener à sa désexcitation : l'émission par le noyau d'une émission γ ou bien l'émission d'un électron de conversion interne. Dans le second cas, le noyau excité interagit avec un électron de la couche interne, qui est éjecté avec une énergie cinétique généralement de plusieurs centaines de keV. Cette éjection génère donc une vacance dans le cortège électronique pouvant mener à un effet Auger.

Pour certains radionucléides, l'émission Auger crée à son tour une vacance dans le cortège électronique pouvant mener à une autre émission Auger : on parle alors de cascade Auger. Les radionucléides caractérisés par une longue chaîne de cascade Auger sont également appelés émetteurs Auger. Les émetteurs Auger sont donc appariés avec des vecteurs biologiques pouvant être internalisés par les noyaux cellulaires ciblés. Enfin, les émetteurs Auger également émetteurs β^+ sont d'intérêt pour la routine clinique, puisqu'ils peuvent être directement imagés par tomographie par émission de positrons [31].

1.2.2 De la conception d'un radiopharmaceutique à l'utilisation clinique

1.2.2.1 Considérations pour la conception d'un radiopharmaceutique

La conception d'un radiopharmaceutique pour la RIV nécessite de prendre en compte les besoins thérapeutiques, en particulier la taille de la cible qui définira le meilleur type d'émetteur, mais également la nature des cellules à traiter ou leur environnement pour l'élection du vecteur biologique. Si le radionucléide sélectionné n'est pas lui-même un vecteur biologique, la recherche d'un chélateur pouvant stabiliser efficacement sa liaison au vecteur biologique d'intérêt est également fondamentale à l'élaboration d'un radiopharmaceutique. Chacune de ces composantes nécessitant un grand investissement temporel et financier, l'identification de radionucléides d'intérêt pour un des types de rayonnements discutés en **Section 1.2.1** est le point de départ de la conception d'un nouveau radiopharmaceutique. Les critères de sélection initiaux portent principalement sur leur durée de demi-vie, qui doit être adaptée à une utilisation clinique, mais également sur la capacité de production de ce radionucléide ou d'un de ses générateurs [32].

Dans le cas des radionucléides émetteurs α , dont les énergies d'émissions sont toutes du même ordre de grandeur, la recherche se porte actuellement principalement sur six radionucléides dont les demi-vies sont compatibles avec une utilisation clinique et dont la production est assurée ou en développement : ^{227}Th , ^{225}Ac , ^{223}Ra , ^{212}Bi (et son générateur ^{212}Pb), ^{211}At et ^{149}Tb [3, 4]. Leurs propriétés physiques, l'avancement de la recherche sur leurs ligands et sur leur production sont synthétisées en **Tableau 1.1**.

Tableau 1.1 – Propriétés et accessibilité des radionucléides étudiés pour une utilisation en RIV- α . Les propriétés physiques sont extraites des tables du NIST [33-37]. CE désigne la capture électronique.

| Radionucléide | Désintégrations | Demi-vie | Chélateur | Production | Avancement de la recherche |
|------------------------|---|----------|--|--|--|
| ^{227}Th [38] | $\begin{matrix} 7 \\ (5\alpha + 2\beta^-) \end{matrix}$ | 18,7 j | DOTA, Me3-HOPO | $^{226}\text{Ra}(n, \gamma)^{227}\text{Ra}$ puis décroissance | Essais de phase I |
| ^{223}Ra | $\begin{matrix} 6 \\ (4\alpha + 2\beta^-) \end{matrix}$ | 11,4 j | Aucun | | Utilisation clinique |
| ^{225}Ac [39] | $\begin{matrix} 7 \\ (5\alpha + 2\beta^-) \end{matrix}$ | 10,0 j | DOTA | Limitée A partir de rares sources de ^{229}Th Recherches sur d'autres réactions | Essais de phase I/II |
| ^{212}Pb [40] | $\begin{matrix} 3 \\ (1\alpha + 2\beta^-) \end{matrix}$ | 10,6 h | TCMC, DOTA | Décroissance de ^{224}Ra | Essais de phase I |
| ^{212}Bi | $\begin{matrix} 2 \\ (1\alpha + 1\beta^-) \end{matrix}$ | 60,5 min | | | Essais <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> |
| ^{211}At [41] | $\begin{matrix} 2 \\ (1\alpha + 1\beta^+/\text{CE}) \end{matrix}$ | 7,2h | Recherche Cycles aromatiques Cages de bore | Limitée, $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ | Essais de phase I/II |
| ^{149}Tb [42] | $\begin{matrix} 3 \text{ ou } 4 \\ (1\alpha(17\%) + 3 \text{ CE}) \end{matrix}$ | 4,1h | DOTA | Recherche $^{152}\text{Gd}(p, 4n)^{149}\text{Tb}$ et autres réactions | Essais <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> |

Comme illustré dans ce tableau, l'avancement de la recherche, les capacités de production

et la translation en potentiel clinique ne sont pas identiques entre les différents émetteurs α d'intérêt. En omettant les difficultés liées à la production pour certains de ces radionucléides, une des difficultés majeures concernant leur transfert en clinique porte sur la stabilité du radiopharmaceutique. Lors des désintégrations α , en reprenant les notations de l'**Équation 1.7** et en notant E_Y l'énergie du noyau fils, E_α l'énergie de la particule α émise, les lois de conservation de l'impulsion et de l'énergie cinétique permettent d'écrire :

$$E_Y = \frac{4}{A} \times E_\alpha \simeq 90 \text{ à } 150 \text{ keV} \quad (1.8)$$

Les énergies de recul impliquées sont largement supérieures aux énergies de liaison des chélateurs utilisés pour fixer le radionucléide et une désintégration α entraîne un recul des noyaux fils sur plusieurs dizaines de nm, ce qui peut être dans certains cas suffisant à la propagation des noyaux fils dans l'organisme et donc à une irradiation fortuite des tissus sains [43]. Cette problématique est particulièrement importante dans le cas des chaînes de décroissance longues, faisant intervenir plusieurs désintégrations α comme les nucléides ^{227}Th , ^{223}Ra et ^{225}Ac . Si le radiopharmaceutique est principalement internalisé par les cellules, et en absence d'affinité chimique particulière avec l'environnement, les énergies de recul associées aux désintégrations α demeurent cependant trop faibles pour observer une éjection des radionucléides fils en dehors de la cible. Les résultats d'études pré-cliniques d'efficacité des traitements et sur la toxicité aux tissus sains dépendent donc à la fois de la spécificité du radiopharmaceutique avec les tissus ou le micro-environnement ciblé, mais aussi de la bio-cinétique des radionucléides fils dans le cas des chaînes de décroissance longues.

Les émetteurs α considérés possèdent de façon plus générale des intérêts différents, dont l'importance varie selon le traitement auquel le radiopharmaceutique conçu se destine. Les noyaux ^{227}Th , ^{223}Ra et ^{225}Ac sont caractérisés par de longues chaînes de décroissance α , qui permettent de limiter la quantité d'activité à injecter au patient pour délivrer une dose donnée, ce qui peut limiter la toxicité du traitement. Le ^{223}Ra possède également l'avantage d'être lui-même un vecteur biologique des métastases osseuses. L'absence de chélateur s'est traduit par une recherche bien plus avancée autour de cet émetteur α , qui est aujourd'hui autorisé en utilisation clinique sous le nom industriel *Xofigo* [44].

Les autres radionucléides, qui n'émettent qu'une seule particule α , ont l'avantage de limiter les risques de toxicité due à une irradiation fortuite des tissus sains à la suite d'une dissociation du radiopharmaceutique. Le ^{149}Tb , parfois dénommé *couteau suisse de la médecine nucléaire*, fait partie d'un quadruplet d'isotopes complémentaires, partageant la même chimie pour la conception de radiopharmaceutiques : ^{161}Tb pour la RIV- β^- , et ^{152}Tb et ^{155}Tb pour l'imagerie diagnostique par TEP ou TEMP, ce qui lui confère un fort potentiel théranostique pour une utilisation clinique [45].

Quant à l' ^{211}At , celui-ci est caractérisé par une chimie différente des autres émetteurs, permettant son couplage à de nouveaux vecteurs biologiques et donc le ciblage de nouvelles cibles biologiques [46].

Enfin, le couple ^{212}Pb - ^{212}Bi permet d'accéder aux énergies α et donc aux portées les plus élevées (avec dans 64 % des désintégrations une émission α de 8,8 MeV). Le ^{212}Pb agit comme un générateur de ^{212}Bi , et permet son utilisation dans les applications où le ciblage biologique est relativement lent. Le ^{212}Pb , lors de sa désintégration, émet également un photon de 240 keV qui peut être utilisé en imagerie. Il possède également un équivalent purement diagnostique, le ^{203}Pb , pouvant être produit et radiomarqué simultanément au ^{212}Pb [47].

Dans le paragraphe suivant, nous nous concentrerons sur le contexte de cette thèse, en présentant les différentes étapes associées au développement d'un nouveau radiopharmaceutique pour le traitement des métastases cérébrales, basées sur le ^{212}Pb : le ^{212}Pb - $\alpha\text{VCAM-1}$.

1.2.2.2 Contexte de cette thèse : conception du ^{212}Pb - α VCAM-1 pour le traitement des métastases cérébrales

Le travail de cette thèse s'inscrit dans l'étude d'un radiopharmaceutique développé pour le traitement des métastases cérébrales.

Parmi les localisations de métastases secondaires, les métastases cérébrales sont les plus fréquentes, et se développeraient chez 20 % des patients atteints d'un cancer. Elles sont principalement issues des cancers du poumon et du sein [48]. Aujourd'hui, les métastases cérébrales sont traitées principalement par chirurgie éventuellement couplée à une radiothérapie du cerveau entier, mais leur apparition reste associée à un pronostic de seulement 6 mois, attribuable à leur détectabilité tardive en imagerie par résonance magnétique, à un stade avancé de leur développement.

Les métastases cérébrales se développent à proximité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'interface filtrante entre le cerveau et le système sanguin. Lors de l'implantation des cellules métastatiques au-delà de la BHE, une réaction inflammatoire se produit et implique la sur-expression de la protéine VCAM-1, actrice d'un mécanisme immunitaire, sur les cellules endothéliales tapissant le système sanguin à proximité [49]. La possibilité de cibler ces marqueurs sur-exprimés aux premières étapes du développement des métastases cérébrales à l'aide d'un nouveau radiopharmaceutique adéquat permettrait leur détection précoce et leur élimination [50].

Le principe de fonctionnement d'un ciblage de la protéine VCAM-1 par l'anticorps anti-VCAM-1 a été modélisé par Falzone *et al.* (voir **Figure 1.5**). Associé à différents radio-isotopes émetteurs α de la **Table 1.1** ou au ^{177}Lu , il a fait l'objet de simulations Monte-Carlo afin de comparer les profils de dose à distance du lieu d'émission. [51].

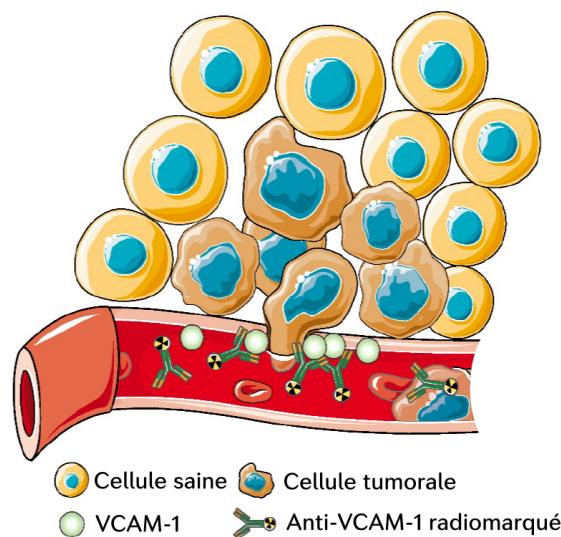


Figure 1.5 – Schéma de la géométrie de l'infiltration des métastases dans le cerveau et principe de l'irradiation par le ciblage des protéines VCAM-1 sur-exprimées à proximité des cellules tumorales. Le schéma est repris et traduit de la publication de Falzone *et al.* [51].

Cette étude démontre, pour cette application, l'avantage des émetteurs α sur les émetteurs β^- tel que ^{177}Lu , qui repose sur la portée plus réduite du dépôt de dose pour les émissions α , et qui préserveraient donc mieux les tissus sains sensibles du cerveau. La dose délivrée aux cellules tumorales relative à l'activité présente est également environ 100 fois supérieure pour les émetteurs α par rapport au ^{177}Lu . Parmi les émetteurs α , le ^{212}Pb (via le ^{212}Bi) est caractérisé par la plus grande portée du fait de son émission à 8,8 MeV, pouvant irradier dans un rayon de 4 à 5 diamètres cellulaires et donc atteindre plus facilement les cellules métastatiques. Des essais *ex vivo* ont en effet montré une prolifération des cellules métastatiques autour des vaisseaux

sanguins jusqu'à près de 50 μm de distance. Pour la plupart des émetteurs α considérés, le profil de dose ne permet pas d'irradier l'ensemble des cellules métastatiques, ce qui pourrait limiter le contrôle du volume tumoral. Dans cette application et pour cette stratégie thérapeutique, la portée est un facteur important et le ^{212}Pb apparaît ainsi comme le radio-isotope le plus prometteur en terme d'efficacité thérapeutique.

La chélation entre le ^{212}Pb et les anticorps comme anti-VCAM-1 a été étudiée, et se réalise préférentiellement à l'aide du chélateur TCMC [22, 52, 53]. Le radiopharmaceutique ainsi obtenu, présenté en **Figure 1.6**, est appelé ^{212}Pb - α VCAM-1. Ce nouveau radiopharmaceutique a ensuite fait l'objet d'essais *in vivo*, afin de déterminer les potentiels gains thérapeutiques associés à son utilisation en comparaison de la méthode classique de la radiothérapie externe [10]. L'étude consistait principalement en l'injection de cellules tumorales formant des métastases cérébrales chez des souris ainsi qu'en une étude *in vitro* de l'efficacité biologique (voir **Section 1.3.2**) du nouveau radiopharmaceutique sur les cellules tumorales. L'étude a montré la présence d'une accumulation du radiopharmaceutique à proximité de la BHE corrélée à la sur-expression de VCAM-1 à proximité des cellules tumorales. Une réduction significative de la vitesse de croissance des métastases cérébrales a également été mise en évidence à la suite d'une injection de ^{212}Pb - α VCAM-1 par rapport à celle observée à la suite d'une irradiation externe, associée à une survie globale significativement plus importante. Enfin, la dose délivrée en RIV- α apparaît beaucoup plus sélective entre les métastases et les tissus sains en comparaison de la radiothérapie externe, avec une toxicité induite moins systématique.

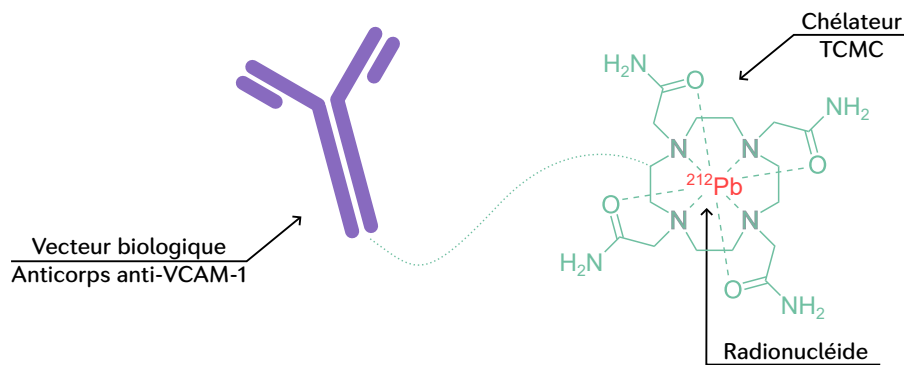


Figure 1.6 – Formule développée du ^{212}Pb - α VCAM-1 [40, 54].

Les essais *in vitro* réalisés avaient quant à eux pour but de caractériser la radiosensibilité des cellules tumorales aux rayons X et aux émissions α . Cette caractérisation se base sur le concept d'efficacité biologique relative, qui est introduite dans la **Section 1.3** suivante, et nécessite de réaliser une dosimétrie *in vitro* dont le formalisme et les problématiques sont discutées dans la **Section 1.4**.

1.3 Effets biologiques des rayonnements ionisants

Considérée seule, la dose est insuffisante à la description de l'effet thérapeutique d'une irradiation, puisqu'elle ne considère pas les processus à l'origine du dépôt d'énergie, qui peuvent varier par exemple en fonction du débit de dose ou du type de particules émises. Ces variables entre les différentes modalités d'irradiation ont pourtant un impact important sur les mécanismes de réparation ou de mort cellulaire employés par les tissus irradiés, et se traduisent donc par une variation des effets observés pour une même dose délivrée. D'autres grandeurs ont donc été introduites pour caractériser les différentes modalités d'irradiation et permettre de comparer leurs efficacités biologiques. Dans ce paragraphe, une description des concepts employés est proposée, en se focalisant principalement sur leurs applications en RIV.

1.3.1 Effets biologiques directs et indirects

Caractérisées par des valeurs de TEL très différentes, la toxicité induite par les émissions β^- et α ne repose pas sur les mêmes phénomènes physiques. En première approche, la toxicité cellulaire peut être reliée à des dommages causés à l'ADN des cellules à la suite de l'irradiation. Ces dommages peuvent être classifiés selon les mécanismes à leur origine entre directs et indirects. Une illustration de ces effets est proposée en **Figure 1.7**.

Du fait de leurs faibles valeurs de TEL, la génération de dommages à l'ADN des émissions β^- repose principalement sur la création de radicaux libres dans les cellules, des espèces chimiques ionisées particulièrement réactives. Ces radicaux libres peuvent alors réagir avec la structure chimique des éléments alentours, en particulier avec l'ADN s'ils ont été produits dans le noyau cellulaire. Bien que des mécanismes de réparation de l'ADN existent, ces lésions induites par les radicaux libres peuvent être chimiquement stabilisées en présence d'oxygène et alors devenir irréparables [6]. L'irradiation des cellules par des émetteurs β^- est donc principalement source d'effets indirects aux cellules. Pour une particule incidente, les dommages générés ne consistent généralement qu'en une cassure simple brin de l'ADN, qui n'est généralement pas létale pour la cellule. Les effets biologiques indirects sont donc également qualifiés de sub-létaux : plusieurs de ces effets doivent se produire pour mener à la mort cellulaire. Les particules de faible TEL peuvent également générer des effets directs, bien que ceux-ci soient beaucoup moins probables du fait de leur faible densité d'ionisation. La plupart de ces effets directs ne mène généralement qu'à une seule ionisation sur l'ADN par trace, et sont donc plus fréquemment sub-létaux.

A l'inverse, caractérisées par des valeurs de TEL élevées et un transfert d'énergie beaucoup plus continu que dans le cas des électrons, les traces de particules α et des électrons Auger contribuent au contrôle tumoral majoritairement par ionisations directes de l'ADN. Comme illustré en **Figure 1.7**, une seule particule α peut causer une cassure double-brin de l'ADN, qui est généralement létale pour la cellule. En comparaison, la toxicité induite par la production de radicaux libres devient non-significative.

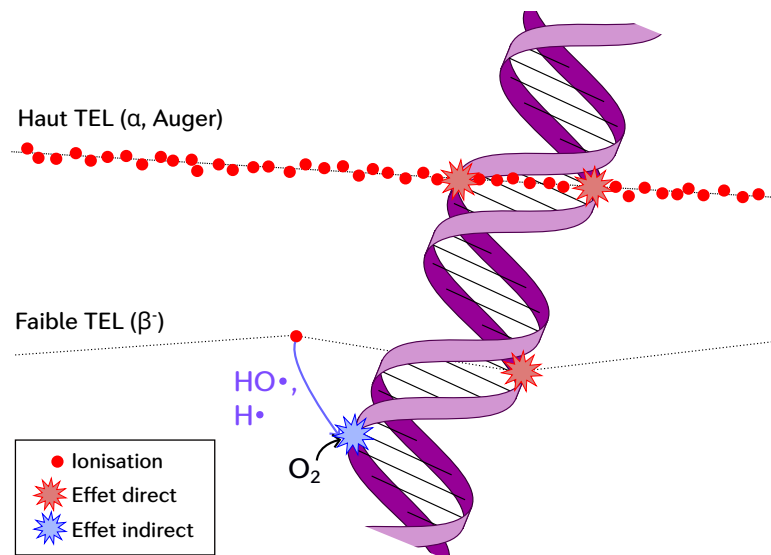


Figure 1.7 – Schématisation de la différence entre les effets directs et indirects. Les effets directs correspondent aux ionisations par la particule incidente de l'ADN. Ils sont prédominants pour les irradiations par les particules de haut TEL. Les effets indirects regroupent les cassures de l'ADN qui ne sont pas provoquées directement par la particule incidente.

Cette approche très simplifiée des mécanismes à l'œuvre en radiobiologie permet cependant de construire un modèle quantitatif de la radiosensibilité des cellules aux irradiations, et d'introduire

des grandeurs permettant la comparaison de différentes modalités d'irradiations. Ce modèle est présenté dans les paragraphes suivants.

1.3.2 Quantification en radiobiologie

1.3.2.1 Modèle linéaire quadratique

La conception de modèles mathématiques permettant de décrire la génération d'effets biologiques par une source de rayonnements ionisants remonte au début du XX^e siècle [55]. Ces modèles sont à l'origine du modèle linéaire-quadratique, qui décrit le taux de survie cellulaire S d'un échantillon recevant une dose D par une source d'irradiation :

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (1.9)$$

où α (unité : Gy⁻¹) et β (unité : Gy⁻²) sont des coefficients décrivant la sensibilité du milieu cellulaire aux dégâts directs et indirects, respectivement. Ce modèle se construit sur la *théorie de la cible*, où les dégâts directs correspondent aux cas où une seule trace traversant le volume sensible d'une cellule conduit à la mort cellulaire (comme une cassure double brin de l'ADN), alors que pour les dégâts indirects, au moins deux traces sont nécessaires pour entraîner l'effet observé (comme de multiples cassures simple brin de l'ADN) [5]. Bien que ce modèle ait été à maintes reprises mis en défaut, que soit aux très faibles doses [56] ou aux hautes doses [57], sa simplicité d'utilisation mais aussi d'interprétation en font aujourd'hui l'outil de comparaison entre différentes sources d'irradiations le plus largement utilisé. Par ailleurs, bien que construit initialement autour de la description de la survie cellulaire, son utilisation s'est étendue à la modélisation d'autres effets biologiques, comme par exemple la génération d'aberrations chromosomiques [58].

Les valeurs des paramètres α et β sont dépendantes majoritairement de la nature de l'irradiation (notamment des processus par lesquels la dose est déposée), mais aussi du type de cellule irradiée. Par exemple, les rayonnements de haut TEL, dont la densité d'ionisation est associée à de plus nombreux effets directs sur la survie cellulaire, sont caractérisés par des valeurs plus élevées pour α que pour β . La courbe de survie devient alors linéaire, comme illustré en **Figure 1.8**. Les cellules sont alors caractérisées par une sensibilité forte même aux faibles doses délivrées. De façon générale, la capacité de réparation cellulaire, ou la sensibilité des cellules au rayonnement, est caractérisé par le rapport α/β .

1.3.2.2 Efficacité biologique relative

La comparaison de la réponse biologique à différents types de rayonnements est généralement évaluée à partir d'une grandeur appelée l'efficacité biologique relative (EBR). L'EBR peut être définie soit comme un ratio entre les doses permettant d'observer le même effet biologique, soit comme un ratio entre deux effets biologiques observés à dose égale.

Dans le premier cas, cette valeur correspond au ratio entre la dose nécessaire pour obtenir un effet biologique donné (par exemple, 10 % de survie cellulaire) avec une irradiation de référence (généralement, une irradiation par rayons X) $D_{X, \text{effet}}$ et celle nécessaire avec le rayonnement étudié $D_{\text{irr, effet}}$:

$$EBR(\text{irr, effet}) = \frac{D_{X, \text{effet}}}{D_{\text{irr, effet}}} \quad (1.10)$$

Dans le second cas, elle est définie comme :

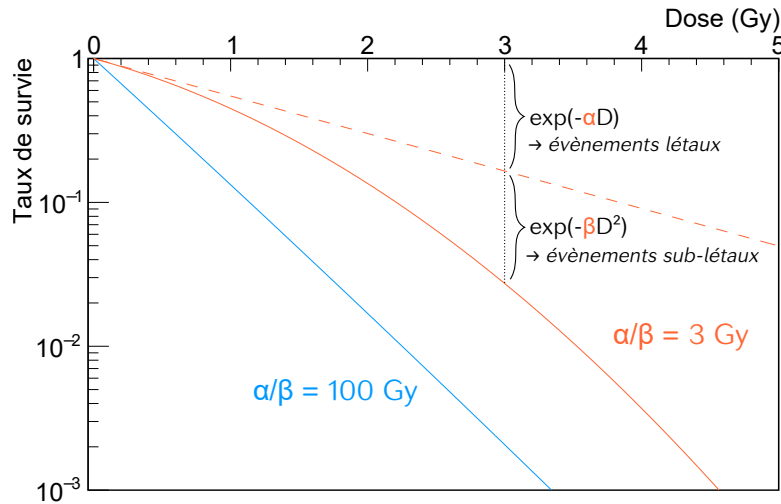


Figure 1.8 – Illustration de deux allures de courbes de survie cellulaire, pour des valeurs de α et β différentes. La courbe orange correspond à $\alpha = 0,6 \text{ Gy}^{-1}$ et $\beta = 0,2 \text{ Gy}^{-2}$. A la dose $\alpha/\beta = 3 \text{ Gy}$, la contribution des effets directs et indirects est équivalente. La courbe bleue correspond à $\alpha = 2 \text{ Gy}^{-1}$ et $\beta = 0,02 \text{ Gy}^{-2}$ ($\alpha/\beta = 100 \text{ Gy}$). La courbe de survie devient alors linéaire, et est représentative des rayonnements de haut TEL à faible débit de dose, le type de rayonnement étudié en RIV- α par exemple.

$$EBR(\text{irr}, D) = \frac{\text{Effet}(D_{\text{irr}})}{\text{Effet}(D_X)} \quad (1.11)$$

Les valeurs d'EBR sont dépendantes de l'effet observé ou de la dose considérée. Pour déterminer l'EBR d'une irradiation, la dose à 50 % de survie (D_{50}), la dose à 10 % de survie (D_{10}) et le taux de survie à 2 Gy (SF_2) sont couramment utilisés [10].

1.3.2.3 Oxygen enhancement ratio

La contribution de l'oxygénation des tissus sur la létalité d'une irradiation, appelé effet oxygène, est évaluée à partir de l'*oxygen enhancement ratio* (OER), qui est défini pour une irradiation donnée comme le ratio de dose nécessaire pour observer le même effet biologique pour des cellules normalement oxygénées ou en hypoxie (faible oxygénation). Par exemple, les émissions β^- sont caractérisées par un OER proche de 3 [7]. L'efficacité d'un traitement basé sur des émetteurs β^- est donc dépendante de l'oxygénation des tissus traités, et devient plus limitée dans le cas des tumeurs hypoxiques.

A l'inverse, les particules α génèrent majoritairement des dégâts directs à l'ADN du fait de leurs valeurs de TEL beaucoup plus élevées (voir **Section 1.2.1.3**). Cette spécificité rend les émetteurs α plus efficaces dans les tissus tumoraux hypoxiques, où l'absence d'oxygène se traduit par une forte perte d'efficacité biologique des émissions β^- . L'OER des irradiations à l'aide de particule α est généralement inférieure à 2, et peut descendre jusqu'à 1 au niveau du pic de Bragg (ce qui correspond à une situation où l'impact de l'oxygénation du tissu traité est négligeable sur l'efficacité biologique de l'irradiation) [7]. Les émetteurs Auger, dont le dépôt d'énergie est similaire à celles des particules α , possèdent également un OER proche de 1.

1.3.3 Spécificités de la radiothérapie interne vectorisée

Comme mentionné en **Section 1.2**, la radiothérapie interne vectorisée se distingue de la radiothérapie externe par l'émission de rayonnements ionisants de façon isotrope à proximité des cellules cibles. L'irradiation se caractérise par un débit de dose beaucoup plus faible et une

durée plus longue, définies par les demi-vies physiques et biologiques des radiopharmaceutiques utilisés. Ainsi, les irradiations en RIV sont généralement caractérisées par des débits de dose moyen inférieurs à $1 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$, pour des doses totales aux lésions atteignant entre 15 et 30 Gy, contre des débits de dose de l'ordre du $\text{Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ et des doses totales, délivrées en plusieurs fractions, pouvant atteindre 80 Gy en radiothérapie externe [8]. Les très faibles débits de dose observés en RIV, qui sont en apparence favorable à la mise en place de systèmes de réparation cellulaire et devrait donc mener à un mauvais contrôle tumoral, entraînent au contraire une sur-sensibilité des tissus tumoraux à l'irradiation, comparativement à la radiothérapie externe. Cet effet est aujourd'hui clairement établi et qualifié d'effet en loi inverse du débit de dose, bien que les mécanismes à son origine ne soient pas encore identifiés [59, 60]. Les très faibles débits de dose, assimilables à de l'hyper-fractionnement de la dose, sont également favorables à la réparation des dommages à l'ADN des tissus sains.

De plus, en RIV, la dose délivrée aux cellules ciblées est hétérogène, dépendante de la fixation du radiopharmaceutique et du nombre d'émissions présentes dans la chaîne de désintégration. Pour une dose globale à un tissu tumoral traité, une forte variation en dose reçue par les différentes cellules du volume est généralement présente. L'existence d'une corrélation entre la dose délivrée aux noyaux cellulaires et l'efficacité biologique observée, fondamentale dans la construction du modèle linéaire quadratique, est ainsi controversée. Cette controverse est notamment alimentée par l'observation dans des modèles *in vitro* et pré-cliniques de toxicité pour les cellules tumorales n'ayant reçu aucune dose au noyau, voire aucune dose dans l'entièreté de leur volume. Des mécanismes extra-nucléaires et extra-cellulaires sont donc à l'œuvre, impliquant le micro-environnement des cellules irradiées (effet *bystander*, toxicité induite aux cellules aux alentours d'une cellule irradiée) ainsi qu'une réponse immunitaire à plus grande distance (effet abscopal) [9].

Pour passer outre ces limitations du modèle linéaire-quadratique, de nouvelles grandeurs sont proposées pour prendre en compte l'efficacité biologique dans le calcul de la dose délivrée lors des traitements de radiothérapie. La dose efficace biologique, similairement au concept de dose efficace utilisé en radioprotection, est définie comme la dose physique pondérée par l'EBR et le débit de dose correspondant au traitement de RIV utilisé [61]. Pour favoriser la comparaison des effets observés avec la radiothérapie externe, la dose efficace biologique équivalente uniforme a été introduite, et prend en compte l'hétérogénéité du dépôt de dose observé en RIV- α [62].

Ces modèles nécessitent cependant une meilleure compréhension des effets biologiques associés à la RIV pour être affinés et permettre d'améliorer la qualité des traitements proposés. Les essais *in vitro* de la RIV sont ainsi fondamentaux sur deux aspects. Dans un premier temps, ils permettent de mettre en évidence un changement de la radio-sensibilité des cellules par rapport à d'autres traitements de référence, et donc de caractériser (via des calculs d'EBR) le gain potentiel thérapeutique pour les futurs patients. Ces essais sont également fondamentaux à l'étude et la compréhension des mécanismes associés à l'hyper-sensibilité des cellules tumorales à la RIV, afin d'optimiser dans le futur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouveaux radiopharmaceutiques associés.

Pour ces deux aspects, l'évaluation des effets biologiques et la caractérisation dosimétrique de l'irradiation reçue par les cellules lors des essais *in vitro* sont ainsi fondamentales afin d'établir des relations dose-effet fiables et précises. Après avoir discuté dans le paragraphe suivant des différents modèles cellulaires et de la caractérisation des effets biologiques par imagerie, la **Section 1.4** présentera le formalisme pour la dosimétrie en médecine nucléaire, et les problématiques associées à son application aux essais *in vitro*.

1.3.4 Essais *in vitro* de la radiothérapie interne vectorisée

Comme mentionné ci-dessus, les essais *in vitro* sont nécessaires à l'évaluation et à la compréhension des effets biologiques d'une modalité d'irradiation à l'échelle de la cellule. Ces études

reposent notamment sur la caractérisation des effets biologiques observés à l'aide de techniques d'imageries, mais également sur le choix d'un modèle cellulaire.

1.3.4.1 Modèles cellulaires

Lors d'essais *in vitro*, des cellules sontensemencées sur des puits de culture à fond plat, entourées d'un milieu de culture contenant des nutriments, des acides aminés et des antibiotiques nécessaires à leur développement et à leur maintien en conditions optimales. Les cellules sont également placées en incubateur pour les maintenir à une température représentative d'un environnement *in vivo* nécessaire à leur survie. L'incubateur, dont l'air est fortement humide, empêche l'évaporation du milieu de culture, qui induirait une augmentation trop importante de la concentration (appelée osmolarité) des éléments présents dans le milieu de culture et donc une toxicité aux cellules [63].

Les essais *in vitro* peuvent porter sur deux types de modèles cellulaires, définis par leur géométrie : les modèles de culture bi-dimensionnels (2D) et tri-dimensionnels (3D). Ces deux modèles, illustrés en **Figure 1.9**, peuvent être complémentaires selon les objectifs de l'étude *in vitro* réalisée, et sont caractérisés par des avantages et des limites dans leur application.

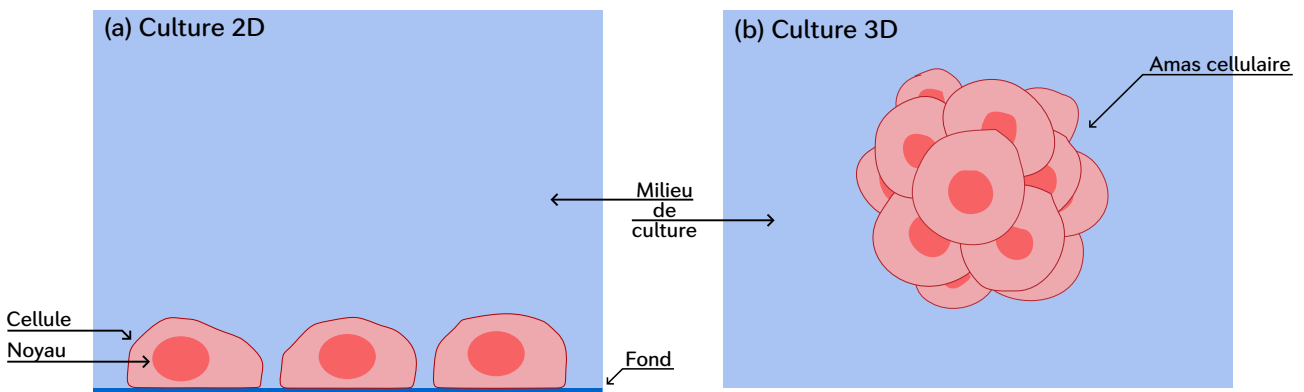


Figure 1.9 – Représentation schématique des cultures cellulaires (a) 2D et (b) 3D. Les cultures 2D s'étalent sur la surface du fond du puits de culture, alors que les cultures 3D se développent en suspension dans le milieu de culture.

Les cultures cellulaires 2D, aussi appelées cultures en monocouche, sont historiquement les premières à avoir été réalisées, et sont encore aujourd'hui fréquemment employées lors d'essais de nouvelles thérapies. A la suite du dépôt dans les puits de culture, celles-ci se développent au fond du puits, puis peuplent cette surface progressivement en se reproduisant horizontalement (voir **Figure 1.9a**). Les avantages principaux de cette méthode portent sur le coût, la facilité de réalisation de tels essais, et donc la possibilité de reproduire des essais en quantité importante. De plus, l'ensemble des cellules peut être considéré comme se trouvant dans des conditions identiques, permettant donc d'accroître la statistique de mesure au sein d'un même puits de culture. Pour autant, l'interprétabilité de ces essais et notamment la traduction des résultats obtenus en effets biologiques observés lors d'essais *in vivo* ou pré-cliniques reste fortement limitée. Du fait de leur développement uniquement au fond des puits, la géométrie cellulaire est assez différente de celle observée *in vivo*, avec une élongation prononcée des cellules le long de la surface et une faible croissance verticale. De plus, les contacts cellulaires, s'ils existent, sont limités et ne sont donc pas représentatif des interactions cellulaires réelles. Les effets liés au micro-environnement cellulaire ne peuvent donc pas être correctement évalués [64].

Une alternative à ce modèle consiste à reproduire plus fidèlement l'agencement cellulaire observé *in vivo* en permettant aux cellules de se développer en agglomérats tri-dimensionnels, appelés sphéroïdes. Bien que de nombreuses méthodes existent pour créer des sphéroïdes, toutes permettent à obtenir un amas cellulaire en suspension dans le milieu de culture, sans contact

avec le fond des puits, et dont le diamètre peut atteindre la centaine de μm (voir **Figure 1.9b**) [65]. Pour les essais en RIV, ces géométries étant plus similaires à celles des métastases à traiter, les résultats obtenus sont plus facilement interprétables. En effet, les cellules sont caractérisées par une géométrie plus réaliste, avec un fort nombre de contacts cellulaires et une oxygénation reproduisant plus fidèlement le micro-environnement *in vivo*, et une différenciation de la réponse cellulaire en fonction de la localisation dans le sphéroïde. Les sphéroïdes peuvent également être développés jusqu'à une taille permettant la mise en place de mécanismes métaboliques représentatifs de l'organe dont les cellules sont issues ; on parle alors d'organoïdes. Pour autant, la conception de sphéroïdes et d'organoïdes est une technique généralement onéreuse et longue, dont la reproductibilité (en terme de taille et de forme de la sphéroïde) est faible, ce qui limite fortement la réalisation d'études à grande échelle et donc limite la statistique de mesure [64].

Pour les essais de la RIV- α , les deux techniques de culture cellulaires sont aujourd'hui présentes dans la littérature scientifique. Les objectifs associés à ces deux types de culture divergent cependant, avec une approche beaucoup plus centrée sur la radiosensibilité cellulaire dans le cas des cultures 2D du fait de la reproductibilité importante de cette méthode, là où l'étude des mécanismes radiobiologiques, prédictifs du comportement *in vivo*, nécessite au minimum l'utilisation de modèles cellulaires 3D [66].

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude *in vitro* de la réponse de cellules tumorales au ^{212}Pb - $\alpha\text{VCAM-1}$, celui-ci n'étant pas spécifique des cellules tumorales ciblées mais plutôt de l'angiogenèse, c'est-à-dire de la création de vaisseaux sanguins. De plus, l'objectif des essais *in vitro* de cette étude porte majoritairement sur la caractérisation de la radiosensibilité des cellules tumorales aux irradiations α en fonction de leur oxygénation. Les essais *in vitro* de ce projet ont donc été réalisés avec des cultures cellulaires 2D. Ces essais *in vitro* ont été complétés d'essais *in vivo* pour évaluer l'impact du micro-environnement, qui ne seront pas traités ici.

1.3.4.2 Quantification des effets *in vitro* de la radiothérapie interne vectorisée

La réalisation d'essais *in vitro* nécessite la mise en place de techniques d'imageries permettant de caractériser les effets cellulaires générés. Dans le cas des essais de la RIV, les observations portent à la fois sur les effets biologiques (survie cellulaire, imagerie des lésions à l'échelle cellulaire...) mais également sur la localisation des radiopharmaceutiques injectés dans le milieu de culture.

En ce qui concerne l'étude des effets biologiques, les techniques d'imagerie utilisées dépendent majoritairement de l'échelle nécessaire à l'observation. A l'échelle cellulaire, par exemple pour la mesure de la taille des cellules ou de la capacité de reproduction des cellules, des techniques de microscopie par transmission sont généralement utilisées. Lorsque l'échelle de la mesure devient sub-cellulaire, par exemple pour la caractérisation des noyaux cellulaires ou le dénombrement des dommages à l'ADN, la technique de référence est l'immunocytochimie, qui utilise les microscopies confocale ou biphotonique [66]. Elle se base sur l'utilisation de marqueurs fluorescents ciblant spécifiquement les volumes d'intérêts (le noyau, le cytoplasme, d'autres organelles de la cellule, ou les cassures de l'ADN), excités à l'aide d'un laser focalisé sur une région précise de l'échantillon et émettant en réponse une lumière de fluorescence dans le visible qu'il est possible d'imager. Un protocole expérimental utilisant ce type de marqueur et d'imagerie sera présenté au **Chapitre 2**.

Enfin, la caractérisation de l'irradiation consiste en général à mesurer le taux et la localisation de l'internalisation des radiopharmaceutiques dans les cellules au cours de l'irradiation, afin de pouvoir réaliser une dosimétrie à partir d'un formalisme présenté en **Section 1.4.1**. Cette caractérisation se réalise généralement à plusieurs moments de l'irradiation. Certains puits de cultures sont retirés de leur incubateur, vidés du milieu de culture, afin de pouvoir analyser le milieu cellulaire. Des techniques de comptage γ permettent d'évaluer l'activité totale présente dans le puits de culture, ce qui permet d'estimer de façon globale le taux d'internalisation

des radiopharmaceutiques dans les cellules. Pour avoir une résolution sub-cellulaire sur la localisation des radiopharmaceutiques fixés ou internalisés par les cellules, des techniques dites d'autoradiographie, où les émissions des radionucléides contribuent à un signal local, sont principalement utilisées pour évaluer l'accumulation de l'activité dans les différentes cellules, voire dans les différents organelles [67]. Ces techniques de quantification de l'activité seront discutées plus en détail dans le **Chapitre 2**. D'autres techniques de quantification de la localisation de l'activité fixée par les cellules se basent sur des techniques de fluoroscopie [68], de fractionnement cellulaire [69], de spectroscopie de masse [70], ou de spectroscopie par faisceau d'ions [71]. Notons cependant que l'ensemble de ces techniques ne sont pertinentes que dans le cas d'une internalisation ou une fixation de l'activité sur les cellules, et ne permettent pas d'évaluer la distribution de l'activité non-fixée, dans le milieu de culture. Dans ces cas là, seule l'activité injectée est généralement considérée pour caractériser l'irradiation.

1.4 Dosimétrie en radiothérapie interne vectorisée

1.4.1 Le formalisme du MIRD

La dosimétrie associée aux techniques de radiothérapie externes est une dosimétrie de planification, définie réglementairement et constituant la base de l'ensemble de la prise en charge du patient. Préalablement à l'irradiation, les irradiateurs sont caractérisés par des grandeurs définissant la qualité du faisceau délivrant la dose. Le volume ciblé, correspondant au milieu cellulaire à irradier, est défini avant l'irradiation et permet, à l'aide d'algorithmes de calcul de dose dédiés, de définir l'irradiation nécessaire à la délivrance de la dose (durée, énergie de faisceau, incidences d'irradiation).

En médecine nucléaire, à l'inverse, aucun consensus sur la planification et l'évaluation dosimétrique de l'irradiation n'a encore aujourd'hui émergé, notamment à cause de la difficulté associée à l'évaluation de la distribution de l'activité et donc de la dose dans le patient. La dosimétrie clinique en RIV est ainsi souvent omise. L'imagerie n'est alors employée qu'à des fins de contrôle de l'efficacité du traitement et non de planification comme en radiothérapie externe.

Étant données ces difficultés, ainsi qu'un développement historiquement lié à la pharmacologie, le dosage des traitements en médecine nucléaire repose aujourd'hui sur l'activité du radiopharmaceutique injectée au patient. En routine clinique, la *dose* en médecine nucléaire réfère alors à la quantité d'activité injectée au patient, rapportée à sa masse. Les différents radiopharmaceutiques utilisés en clinique aujourd'hui sont prescrits à des activités massiques fixes, indépendamment du patient. Pourtant, d'un patient à l'autre, des études basées sur l'imagerie et la dosimétrie ont montré des variations de fixation sur les différents tissus et de biocinétique, et au final, des différences majeures en termes de dose délivrée aux différents tissus. Une étude dosimétrique de la toxicité du ^{177}Lu -DOTATATE sur une cohorte de 777 patients a montré une distribution des doses au rein pouvant varier entre 1 et 10 Gy pour une même activité massique injectée [72]. De nombreuses études supportent également la présence d'une corrélation de la dose estimée aux tissus sains et tumoraux avec l'efficacité du traitement [73]. Enfin, bien que simplificatrice en apparence, l'activité injectée au patient est elle-même estimée à partir d'une mesure et donc entachée d'une incertitude.

En médecine nucléaire, les rayonnements ionisants sont émis de façon isotrope, leur parcours dépendant ensuite du type et de l'énergie de la particule émise. La dose reçue par les différents organes du patient est liée aux taux de fixation du radiopharmaceutique injecté dans ces différents volumes, et est donc dépendante du métabolisme du patient, et du rayonnement émis lors de la désintégration des radio-isotopes.

Le Comité sur la Medical Internal Radiation Dose (MIRD) de la Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) a proposé un formalisme de calcul aujourd'hui repris systématiquement pour le calcul de dose en radiothérapie interne [74]. Le calcul de la distribution

de dose pour les différents organes nécessite une première étape d'imagerie pour déterminer la biodistribution de l'activité injectée à l'aide d'un radiopharmaceutique diagnostique. L'accumulation de celui-ci dans les divers tissus et organes du patient peut alors être évaluée. Le débit de dose \dot{D} reçu par une région cible r_c à un instant t peut alors être calculé comme une somme de contributions à la dose des activités accumulées dans différentes régions sources r_s , notées $A(r_s, t)$:

$$\dot{D}(r_c, t) = \sum_{r_s} A(r_s, t) \cdot S(r_c \leftarrow r_s, t) \quad (1.12)$$

où les différents $S(r_c \leftarrow r_s, t)$, appelés facteurs S, correspondent à la dose moyenne absorbée par r_c pour une désintégration se produisant dans les régions sources (en $\text{Gy} \cdot \text{Bq}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ces valeurs sont calculées préalablement par simulations Monte-Carlo sur des fantômes corps entiers, ou obtenues à partir d'abaques.

Ces facteurs S dépendent notamment de la masse et de la position de la cible, qui peuvent évoluer dans le temps lors d'un traitement, ainsi des particules émises par le radio-isotope. Les facteurs S se décomposent comme :

$$S(r_c \leftarrow r_s, t) = \frac{\sum_i E_i r_i \phi(r_c \leftarrow r_s, E_i, t)}{M(r_c, t)} \quad (1.13)$$

avec i l'indice de la voie de désintégration, E_i l'énergie de la particule émise, r_i son rapport d'embranchement, $\phi(r_c \leftarrow r_s, E_i, t)$ la fraction moyenne de l'énergie émise par la source absorbée par la cible, et M la masse de la cible.

Le formalisme du MIRD est ainsi un formalisme simplifié reposant sur des hypothèses particulièrement fortes (notamment l'homogénéité de la distribution de l'activité dans un volume source). Son application fait également face à de multiples contraintes limitant fortement la précision de la dosimétrie obtenue :

- L'imagerie de l'activité présente dans le patient doit être calibrée sur le radiopharmaceutique utilisé.
- Les différents volumes sources ainsi que le volume cible doivent être convenablement segmentés, et correctement voxelisés pour optimiser le rapport signal sur bruit et la résolution spatiale de la mesure.
- De multiples images de la biodistribution devraient être réalisées pour prendre en compte la variation d'activité avec le temps dans les différentes régions sources dues à une fixation ou à une élimination biologique ou par désintégration du traceur.
- Dans certains tissus, pour les émetteurs α , la dissociation des radionucléides fils du radiopharmaceutique à la suite d'une désintégration peut propager l'activité dans d'autres tissus.
- Le calcul des facteurs S est lui-même associé à une incertitude liée aux paramètres de simulation ou au fantôme utilisé.

Chacun de ces processus est associé à des incertitudes, dont l'accumulation limite aujourd'hui le déploiement de la dosimétrie en RIV [73]. Par exemple, une étude dosimétrique pour un traitement au ^{177}Lu a montré des incertitudes sur la dose délivrée aux différents organes variant entre 14 % et 102 % [75].

Ainsi, la considération de l'activité injectée est largement insuffisante pour définir un traitement de qualité au patient, et la dosimétrie, bien que complexe à réaliser, constitue probablement une étape d'amélioration majeure des pronostics associés aux traitements en RIV.

1.4.2 Dosimétrie des essais *in vitro*

Le challenge que constitue la dosimétrie de la RIV en clinique se prolonge également aux essais pré-cliniques et aux essais *in vitro*, où la problématique de la localisation des émissions lors des irradiations est particulièrement importante, en particulier en RIV- α .

Contrairement aux irradiations externes, la délivrance de dose par une méthode de radiothérapie interne se caractérise par des irradiations provenant du milieu de culture, généralement isotropes et pouvant être localisées jusqu'à l'échelle de quelques nanomètres dans le cas d'émetteurs Auger. La dose délivrée devient une grandeur plus difficile à évaluer, faisant intervenir des sources d'incertitudes moins maîtrisées et nécessitant de nouveaux protocoles expérimentaux. Cette complexité est à l'origine du manque de modèles radiobiologiques, notamment de courbes de contrôle tumoral (TCP, pour *Tumor Control Probability* en anglais) et de probabilité de complication aux tissus sains (NTCP, pour *Normal Tissue Complication Probability* en anglais) en RIV.

Pour les essais *in vitro*, trois différentes origines pour la dose délivrée à une cellule donnée peuvent être distinguées :

- la dose due aux particules émises depuis la cellule elle-même, liées à l'internalisation du radiopharmaceutique testé par la cellule ou à sa fixation sur la membrane ;
- la dose liée aux particules émises par les radiopharmaceutiques internalisés par les autres cellules à proximité ;
- la dose délivrée par les radiopharmaceutiques non-internalisés, présents dans le milieu de culture.

La contribution relative de chacune de ces sources est fortement dépendante du radiopharmaceutique testé ainsi que du type de particule émise, comme illustré en **Figure 1.10**. Dans le cas d'un radiopharmaceutique présentant une spécificité avec les cellules irradiées (**Figure 1.10a**), et pour des irradiations de courte portée telles que celles produites par des particules α ou des électrons Auger, les radiopharmaceutiques internalisés ou fixés par la cellule contribueront majoritairement à la dose reçue par celle-ci. La quantification de l'internalisation ou de la fixation des radionucléides par les cellules est donc un enjeu majeur.

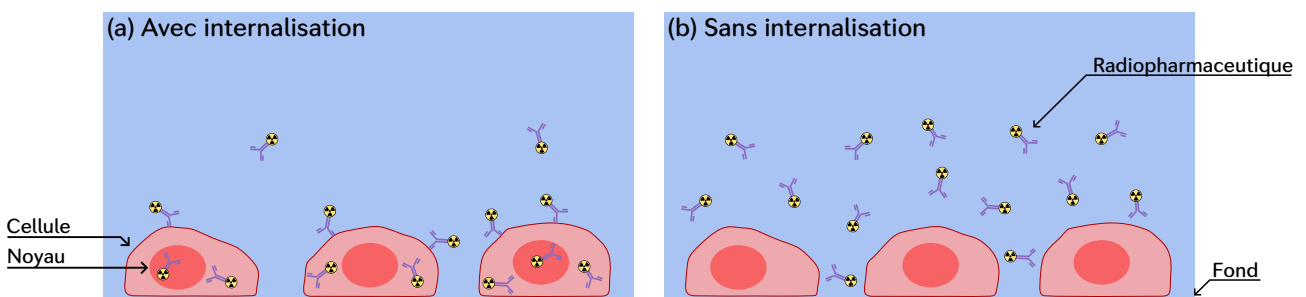


Figure 1.10 – Localisation des radiopharmaceutiques lors des essais *in vitro*. (a) Lorsque le radiopharmaceutique cible spécifiquement les cellules irradiées, les radiopharmaceutiques peuvent se retrouver internalisés dans les cellules ou fixés à leur surface. La dose est alors majoritairement délivrée par les radiopharmaceutiques internalisés ou fixés par les cellules. (b) Si le radiopharmaceutique testé ne cible pas spécifiquement les cellules, la majorité des radiopharmaceutiques demeure en suspension dans le milieu de culture. L'irradiation est alors majoritairement liée à la distribution spatiale des radiopharmaceutiques dans le milieu de culture.

Outre l'évaluation de l'internalisation des radiopharmaceutiques, le calcul des facteurs S associés aux différents organelles de la cellule est également complexe. En particulier, la modélisation cellulaire impacte fortement les valeurs de facteurs S associées aux émissions depuis la cellule, avec des variations pouvant atteindre jusqu'à 40 % selon la géométrie cellulaire modélisée selon

l'étude de Tamborino *et al.*, dans le cas d'un radiopharmaceutique à base de ^{177}Lu [76], et jusqu'à 28 % selon l'étude de Salim et Taherparvar pour l'utilisation d'émetteurs Auger [77].

Cependant, lors de l'essai *in vitro* de radiopharmaceutiques ne ciblant pas spécifiquement les cellules testées, l'internalisation des radiopharmaceutiques dans le milieu cellulaire devient peu probable, et la totalité de la dose délivrée au milieu cellulaire peut être imputée aux radiopharmaceutiques en suspension dans le milieu de culture, situés à portée des cellules (**Figure 1.10b**). Pour autant, le calcul dosimétrique n'en devient pas moins complexe. Bien qu'il soit possible d'évaluer un facteur S global correspondant à une distribution homogène globale des émetteurs dans le milieu de culture, cette valeur moyenne cache en réalité une forte disparité des dépôts de dose selon le lieu d'émission dans le puits de culture.

En particulier, dans le cas des émetteurs α , la faible portée des émissions permet de délivrer une dose significative aux cellules uniquement si la distance séparant l'émetteur des cellules est inférieure à la portée des particules α émises. Dans l'ensemble du volume au-delà de cette portée, qui représente la majorité du milieu de culture, la dose délivrée aux cellules devient négligeable. Pour autant, même dans le volume correspondant à la portée des émissions α , la variation du TEL des particules en fonction de la distance parcourue (voir **Figure 1.3a**) ainsi que l'efficacité géométrique pour la délivrance de la dose (proportionnelle à l'angle solide entre le lieu d'émission et une cellule donnée) rendent le facteur S particulièrement dépendant de la position d'émission. Le **Chapitre 4** sera ainsi dédié à l'évaluation de facteurs S associés à différentes localisations d'émission dans le puits de culture.

De plus, similairement au cas de l'internalisation, la modélisation du volume cellulaire peut avoir un impact sur le calcul de facteurs S. En effet, les traces des particules α dans les cellules étant quasi-rectilignes, une variation géométrique de la forme des cellules impliquera une variation de la distribution des longueurs de traces dans les cellules associées aux différents lieux d'émissions. Une étude de l'impact de la modélisation cellulaire sur le calcul des facteurs S depuis le milieu de culture est également présentée au **Chapitre 4**.

Ainsi, cette variabilité apparente des facteurs S en fonction du lieu d'émission des particules α dans le milieu de culture pose la question de l'évaluation de la distribution spatiale des radionucléides dans le milieu de culture. Une étude, réalisée dans le cas d'irradiation au ^{212}Pb , a montré que cette distribution peut être complexe, caractérisée par des gradients d'activité et une évolution temporelle de ceux-ci, avec des conséquences dosimétriques importantes [10, 78]. Cette observation est à l'origine de ce projet de thèse, qui s'inscrit également dans l'étude *in vitro* de la RIV- α par le ^{212}Pb - α VCAM-1, qui porte sur la conception d'un nouveau système de quantification par spectroscopie de la distribution des émetteurs α au cours des essais *in vitro* de la RIV- α . Ce système est présenté au **Chapitre 2**, et la méthode d'évaluation de la distribution d'activité est introduite au **Chapitre 3**.

1.4.3 Microdosimétrie

La dose reçue par une cible est définie comme proportionnelle à l'énergie moyenne déposée par chaque particule incidente dans cette cible au cours d'une irradiation (**Équation 1.1**). Cette définition fait de la dose une grandeur déterministe, qui masque les potentielles hétérogénéités du dépôt de dose au sein du milieu, et est adaptée aux irradiations de hautes fluences comme celles réalisées en radiothérapie externe.

Cependant, lors des essais *in vitro*, le dépôt de dose des émissions α provenant du milieu de culture est au contraire fondamentalement stochastique, du fait des traces rectilignes et denses générées par les particules α dans la matière biologique. Notamment dans le cas d'essais impliquant des radiopharmaceutiques non spécifiques des cellules irradiées, chaque émission de particule α délivrera une grande dose à la cible en cas de traversée, et dans la majorité des cas aucune dose du fait de la faible probabilité géométrique de traverser une cellule. En particulier, si la dose totale délivrée à une cible est suffisamment faible, le nombre de traces

à l'origine de ce dépôt de dose peut devenir suffisamment faible pour devenir aléatoire entre les différentes cellules irradiées. Tout comme le nombre de traces traversant une cible, chacune de ces traces peut traverser une longueur différente dans la cible, qui rend la dose délivrée par trace également stochastique. Selon que la trace traverse ou non certains organelles de la cellule, en particulier le noyau, les effets sur la survie cellulaire peuvent également être très différents pour un nombre de coups ou une dose à la cellule identiques. Des grandeurs microdosimétriques sont alors nécessaires pour quantifier les effets biologiques observés.

1.4.3.1 Grandeurs en microdosimétrie

Pour prendre en compte le caractère stochastique de certaines irradiations, une version moderne de la microdosimétrie a été introduite par Rossi [79, 80]. La microdosimétrie consiste à étudier la statistique du dépôt de dose par évènement. Un évènement est défini comme « un dépôt d'énergie par des particules étant statistiquement corrélées », autrement dit par des particules issues d'une même désintégration ou d'une même chaîne de désexcitation (comme les cascades Auger), et est noté ϵ (unité : **J**). Lors d'une irradiation, la somme des dépôts d'énergie dans une cible de masse m sera décrite par la distribution de l'énergie spécifique, notée z (unité : **Gy**) :

$$z = \epsilon/m \text{ [Gy]} \quad (1.14)$$

L'énergie spécifique z est une grandeur stochastique analogue de la dose, associée à une cible et à une irradiation donnée. La distribution de probabilité des énergies spécifiques z délivrées aux cibles microscopiques pour une dose D délivrée à la cible macroscopique est notée $f(z; D)$. Cette distribution peut être estimée en irradiant un compteur proportionnel équivalent tissu [81, 82]. L'espérance de cette distribution, \bar{z} , est égale à D :

$$\bar{z} = \int_0^{+\text{inf}} z f(z; D) dz = D \quad (1.15)$$

Pour une cible macroscopique suffisamment grande composée de ces cibles microscopiques, et pour une irradiation générant de nombreuses traces dans la cible, la distribution $f(z; D)$ converge vers une distribution de Dirac en D (voir **Figure 1.11**).

La distribution $f(z; D)$ dépend cependant de la dose totale délivrée à la cible et devrait être ré-évalué, expérimentalement, pour chaque valeur de dose totale testée. En pratique, il est cependant possible d'estimer cette distribution pour différentes doses à partir de la distribution des énergies spécifiques par dépôt de dose individuel, notées z_1 , en faisant l'hypothèse que chaque désintégration n'émet qu'une seule particule. Leur fonction de distribution associée, notée $f_1(z_1)$ ou $f_1(z)$, n'est donc par définition pas définie en $z_1 = 0$. L'espérance de l'énergie spécifique par évènement, dénotée \bar{z}_1 , est donnée par :

$$\bar{z}_1 = \int_0^{+\infty} z_1 f_1(z_1) dz_1 \quad (1.16)$$

En pratique, les irradiations *in vitro* peuvent au total engendrer de multiples coups dans chacune des cellules. Le nombre moyen de coups reçus par cellules, noté \bar{N} , est donné par :

$$\bar{N} = D/\bar{z}_1 \quad (1.17)$$

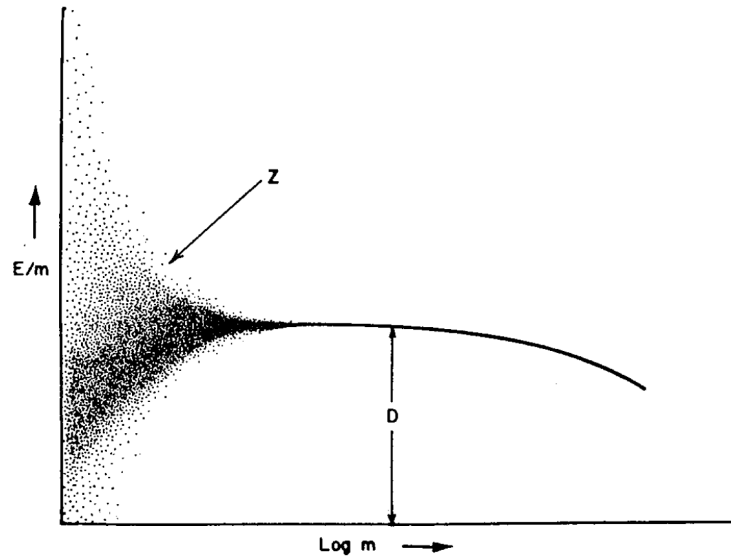


Figure 1.11 – Pour une irradiation donnée, allure et évolution des distributions des énergies spécifiques z déposées dans différentes cibles en fonction de leur masse m . E désigne l'énergie déposée dans une cible. Figure extraite de [79].

Chacune des désintégrations étant caractérisée par la production d'une trace indépendante des autres, la distribution des doses délivrées par deux dépôts de dose différents, notée $f_2(z)$, est donnée par :

$$f_2(z) = \int_0^{+\infty} f_1(z_1) f_1(z - z_1) dz_1 \quad (1.18)$$

Cette opération est une convolution de la distribution des énergies spécifiques pour un dépôt de dose avec elle-même. Il est possible de construire l'ensemble des distributions des énergies spécifiques pour un nombre n de traces quelconque dans une cible par convolutions successives des différentes fonctions de distribution avec $f_1(z)$. En notant F_n la transformée de Fourier de la fonction de distribution de l'énergie spécifique pour n traces ($F_n = \mathbb{F}(f_n)$), puisque la convolution est multiplicative dans l'espace de Fourier, cela revient à écrire :

$$\forall n, F_n = \mathbb{F}(f_n) = F_1^n \quad (1.19)$$

Les développements suivant se basent sur une hypothèse d'une distribution des nombres de coups reçus par cible décrite selon une statistique de Poisson de moyenne \bar{N} , fondée sur l'indépendance statistique des dépôts d'énergie entre deux désintégrations. Dans ces conditions, la variance associée à la distribution des énergies spécifiques $f(z; D)$, qui correspond donc à la variance sur la dose délivrée par cellule, est donnée par :

$$\sigma^2(D) = \bar{N} z_1^2 \quad (1.20)$$

Le nombre de coups moyens peut quant à lui être estimé par :

$$\bar{N} = D/z_1 \quad (1.21)$$

La connaissance de \bar{N} est utile pour estimer la distribution de probabilité des énergies

spécifiques $f(z; D)$. En effet, toujours sous l'hypothèse que le nombre de coups reçus par une cible est distribué selon une loi de Poisson de paramètre \bar{N} :

$$f(z; D) = \sum_{k=1}^{+\infty} \frac{\bar{N}^k}{k!} e^{-\bar{N}} f_k(z) \quad (1.22)$$

Cette définition implique donc que la probabilité pour une cible de ne recevoir aucun dépôt d'énergie est donné par :

$$f(0; D) = e^{-\bar{N}} = e^{-D/\bar{z}_1} \quad (1.23)$$

En ré-écrivant l'**Équation 1.22** dans l'espace de Fourier, en notant T la transformée de $f(z; D)$, on obtient :

$$T = \sum_{k=1}^{+\infty} \frac{\bar{N}^k}{k!} e^{-\bar{N}} T_k = \sum_{k=1}^{+\infty} \frac{T_1^k \bar{N}^k}{k!} e^{-\bar{N}} = e^{\bar{N}T_1} e^{-\bar{N}} = e^{\bar{N}(T_1-1)} \quad (1.24)$$

Ainsi, une bonne évaluation de $f_1(z)$ permet donc de reconstruire la distribution des énergies spécifiques pour toute valeur de dose D , par transformations dans l'espace de Fourier. En pratique, $f_1(z)$, ainsi que ses deux premiers moments \bar{z}_1 et z_1^2 peuvent être estimés par simulation Monte Carlo. Les simulations Monte-Carlo, en plus de permettre d'estimer \bar{N} en fonction de l'activité dans une source donnée, peuvent également donner accès à une distribution de la dose délivrée aux cellules.

Ces développements mathématiques sont cependant valables pour des sources correctement définies, c'est-à-dire dont la distribution d'activité est connue et invariable. Dans le cas des essais *in vitro* de la RIV, cette hypothèse fait défaut. Pour mieux décrire la distribution de l'activité dans le milieu de culture, une séparation de celui-ci en volumes élémentaires dans lesquels l'activité est distribuée de façon homogène est proposée en **Chapitre 3**. Les dérivations des **Équations 1.16 à 1.24** peuvent cependant être étendues au cas de sources multiples. Considérons deux sources spatialement distinctes S et S' contribuant à la dose délivrée à la cible. La distribution de probabilité d'énergie spécifique s'écrit comme une convolution des distributions de probabilité des énergies spécifiques z_S pour chacune des sources, ce qui dans l'espace de Fourier revient à écrire :

$$f(z; D) = \int_0^{+\infty} f_S(z_S) f_{S'}(z - z_S) dz_S \Rightarrow T = T_S T_{S'} \quad (1.25)$$

Ré-écrire cette égalité en utilisant la définition de la transformée de Fourier, et permet d'obtenir les deux relations suivantes :

$$\bar{z} = \bar{z}_S + \bar{z}_{S'} \quad (1.26)$$

$$\bar{z}^2 = \bar{z}_S^2 + 2\bar{z}_S\bar{z}_{S'} + \bar{z}_{S'}^2 \quad (1.27)$$

qui peuvent alors se traduire en les relations suivantes sur la dose :

$$D = D_S + D_{S'} \quad (1.28)$$

$$\sigma^2(D) = \sigma^2(D_S) + \sigma^2(D_{S'}) \quad (1.29)$$

Similairement, le nombre de coups générés par chacune des sources peut être relié à leur contribution à la dose délivrée et à leur premier moment de la fonction de distribution des énergies spécifiques pour une trace, et permettent d'estimer le nombre moyen de coups délivrés à la cible :

$$\bar{N} = \bar{N}_S + \bar{N}'_S = \frac{D_S}{z_{1S}} + \frac{D'_S}{z_{1S'}} \quad (1.30)$$

Ces relations sont généralisables à tout nombre de sources indépendantes. Ainsi, pour une irradiation faisant intervenir plusieurs sources, la distribution des doses totales reçues aux cibles, ou au moins la dose moyenne reçue ainsi que son écart-type, peuvent être accessibles en évaluant au préalable les distributions des énergies spécifiques déposées par les événements individuels. L'écart-type moyenne sur la dose reçue ainsi que le nombre moyen de coups reçus, facilement accessibles sans transformée de Fourier, permettent de déterminer la pertinence de la réalisation d'une caractérisation microdosimétrique plus poussée.

1.4.3.2 Critères pour la réalisation d'une microdosimétrie

L'utilisation de la microdosimétrie pour l'établissement de relations dose-effet est particulièrement pertinente dans les situations où les effets biologiques sont dominés par le dépôt de dose des particules chargées dans les cellules, et non pas par les effets *bystander* ou abscopal [83]. La réalisation d'essais *in vitro* de la RIV- α sur des cultures 2D apparaît ainsi parfaitement adaptée à l'utilisation de modèles microdosimétriques. Pour autant, l'analyse microdosimétrique étant associée à une complexité supplémentaire et à une dépendance sur la modélisation du milieu cellulaire accrue [84, 85], son utilisation doit être restreinte aux situations où le nombre de coups reçus par les cellules est assez faible pour que le caractère aléatoire du dépôt de dose dans les différentes cellules d'un puits de culture soit significatif, si bien que la dose moyenne ne permettrait plus de décrire les effets biologiques observés. A l'inverse, pour un grand nombre de coups reçus en moyenne par les différentes cellules, l'évaluation de la dose seule aux cellules peut être suffisante pour permettre une interprétation claire des effets biologiques observés lors des essais *in vitro* [86, 87]. Les auteurs ayant introduit les concepts mathématiques précédents suggèrent qu'une variabilité d'au moins 20% sur la dose délivrée aux cibles d'intérêt peut indiquer une nécessité de prendre en compte ce caractère stochastique dans l'évaluation des effets biologiques observés. Nous introduirons au **Chapitre 4** une méthode d'évaluation simplifiée de la fluctuation de la dose délivrée aux cellules et aux noyaux [88], puis nous appliquerons cette méthode aux essais *in vitro* analysés au **Chapitre 5**.

1.5 Conclusions

La RIV est une thérapie avec un fort potentiel thérapeutique, dont l'intérêt principal réside en la courte portée des émissions ionisantes délivrant la dose spécifiquement aux tissus tumoraux, permettant ainsi de traiter des volumes multiples et de dimensions réduites tout en épargnant les tissus sains. Cependant, les mécanismes liés à la radiobiologie des cellules métastatiques ne sont aujourd'hui pas encore maîtrisés, et nécessitent des investigations *in vitro* et pré-cliniques. Ces investigations sont nécessaires à la détermination du potentiel thérapeutique et à l'optimisation des traitements en RIV. Elles se basent sur la détermination d'efficacité

biologiques, où l'évaluation de la dose reste le critère de référence pour la caractérisation d'une irradiation. Cependant, la dosimétrie des radiopharmaceutiques, en particulier des émetteurs α , est complexe du fait de la faible portée des émissions. Ces évaluations dosimétriques nécessitent la connaissance de la distribution spatiale des radionucléides à proximité des volumes irradiés. Dans le cas des essais *in vitro*, cette évaluation est généralement réalisée en mesurant l'internalisation des radiopharmaceutiques dans les cultures cellulaires, parfois à l'échelle sub-cellulaire. Pour autant, la cinétique de l'internalisation ou de la fixation cellulaire n'est pas connue. En outre, la distribution des radiopharmaceutiques non-internalisés, dans le milieu de culture, n'est aujourd'hui pas mesurée et n'est donc pas évaluée. Dans le cas d'essais de nouvelles thérapies utilisant des marqueurs biologiques non-spécifiques des cellules à traiter, la majorité de la dose est pourtant délivrée à partir des émissions depuis le puits de culture. En amont de cette thèse, il a été montré que la distribution spatiale des radiopharmaceutiques dans le milieu de culture peut avoir un impact conséquent sur la dosimétrie cellulaire et donc sur l'interprétation des observations associées aux essais *in vitro*.

L'objectif de cette thèse est donc de concevoir un système dosimétrique pour les essais *in vitro* de la RIV- α se basant sur l'évaluation de la distribution spatiale des radionucléides dans le milieu de culture au cours de l'irradiation. Basé sur des mesures en temps réel, le nouveau système de mesure développé, utilisé au cours des irradiations, sera présenté dans le **Chapitre 2**. La méthode d'analyse du signal mesuré par le système dosimétrique, utile à la reconstruction de la distribution spatiale des radionucléide, sera décrite au **Chapitre 3**. Au **Chapitre 4**, l'impact de la modélisation cellulaire sur le calcul des grandeurs dosimétriques sera évalué. Enfin, au **Chapitre 5**, des mises en œuvre expérimentales de la dosimétrie des essais *in vitro* du ^{223}Ra et du ^{212}Pb avec le nouveau système de mesure et la méthode d'analyse associée seront présentées.

2

Développement d'un nouveau système dosimétrique pour les essais *in vitro*

Sommaire du chapitre

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1 | Choix du détecteur pour la détection des particules α | 35 |
| 2.1.1 | Détecteurs à émulsion | 35 |
| 2.1.2 | Détecteurs gazeux | 36 |
| 2.1.3 | Détecteurs scintillants | 37 |
| 2.1.4 | Détecteurs à semi-conducteurs | 38 |
| 2.1.5 | Contraintes associées aux essais <i>in vitro</i> des émetteurs α | 38 |
| 2.2 | Détecteurs utilisés | 39 |
| 2.2.1 | Caractéristiques opérationnelles | 40 |
| 2.2.2 | Sources de bruits dans la mesure | 40 |
| 2.3 | Pré-amplification du signal | 43 |
| 2.4 | Système d'acquisition FASTER | 44 |
| 2.4.1 | Présentation du système | 44 |
| 2.4.2 | Traitement du signal et enregistrement des données | 45 |
| 2.5 | Conception du système de spectroscopie en conditions <i>in vitro</i> | 47 |
| 2.5.1 | Puits de cultures à fond mince | 48 |
| 2.5.2 | Enceinte étanche pour l'électronique de détection | 49 |
| 2.6 | Caractérisation expérimentale du système de spectroscopie | 50 |
| 2.6.1 | Caractérisation des détecteurs et de la chaîne d'acquisition | 51 |
| 2.6.2 | Mesure de l'épaisseur des feuilles de mylar | 55 |
| 2.6.3 | Utilisation du système en incubateur | 57 |
| 2.7 | Protocole expérimental <i>in vitro</i> | 58 |
| 2.7.1 | Préparation et irradiation des cellules | 59 |
| 2.7.2 | Radionucléides étudiés | 60 |
| 2.8 | Modélisation Monte-Carlo des essais <i>in vitro</i> | 61 |
| 2.8.1 | Simulations Geant4 | 62 |
| 2.8.2 | Géométrie de détection | 63 |
| 2.8.3 | Simulation de processus physiques | 65 |
| 2.8.4 | Description d'une source de particules | 66 |
| 2.8.5 | Enregistrement de grandeurs d'intérêt | 66 |
| 2.9 | Conclusions | 67 |

Certaines techniques expérimentales, introduites au **Chapitre 1**, permettent de réaliser une dosimétrie cellulaire des essais *in vitro* en RIV en évaluant l'internalisation des radiopharmaceutiques par les cellules irradiées. Les mesures réalisées portent uniquement sur la distribution des

radiopharmaceutiques au sein des cellules, avec une hypothèse de délivrance de dose majoritairement due aux radiopharmaceutiques internalisés par les cellules. La dose délivrée par les radiopharmaceutiques en dilution dans le milieu est généralement évaluée à l'aide d'un facteur S moyen basé sur l'hypothèse d'une distribution homogène de ces derniers. Des déviations entre cette hypothèse et la réalité peuvent cependant s'avérer critiques pour des irradiations employant des émetteurs α dont la portée des émissions est réduite, en particulier dans le cas d'essais de radiopharmaceutiques ne ciblant pas spécifiquement les cellules irradiées ou non-internalisés, et donc pour lesquels la dose délivrée dépend majoritairement de l'activité présente dans le milieu de culture.

Dans ces cas particuliers, la dosimétrie est fortement dépendante de la distribution spatiale des radionucléides dans le milieu de culture et de son évolution au cours de l'irradiation. La dépendance de la dose à la distribution spatiale des émetteurs est due majoritairement à la faible portée des particules α dans le milieu de culture, liée à une importante atténuation en énergie le long de leur parcours. En raison de ces caractéristiques, une grande proportion des particules α émises n'atteint pas les cellules, et dans le cas contraire, l'énergie des particules atteignant les cellules peut prendre n'importe quelle valeur inférieure ou égale à celle d'émission selon la position de la désintégration. Une mesure précise de la dose délivrée aux cellules nécessite donc une mesure de la distribution spatiale des radio-isotopes avec une résolution spatiale adaptée aux dimensions du volume cible (environ $20\ \mu\text{m}$) et au parcours des particules α . Celle-ci ne peut donc s'appuyer que sur la détection et la mesure en énergie des particules α , en utilisant un détecteur positionné à proximité du milieu cellulaire, comme illustré en **Figure 2.1**. Le spectre en énergie mesuré sera ainsi corrélé à la distribution spatiale et temporelle des radiopharmaceutiques dont les émissions interagissent avec les cellules au cours de l'irradiation, comme nous le verrons par la suite, au **Chapitre 3**.

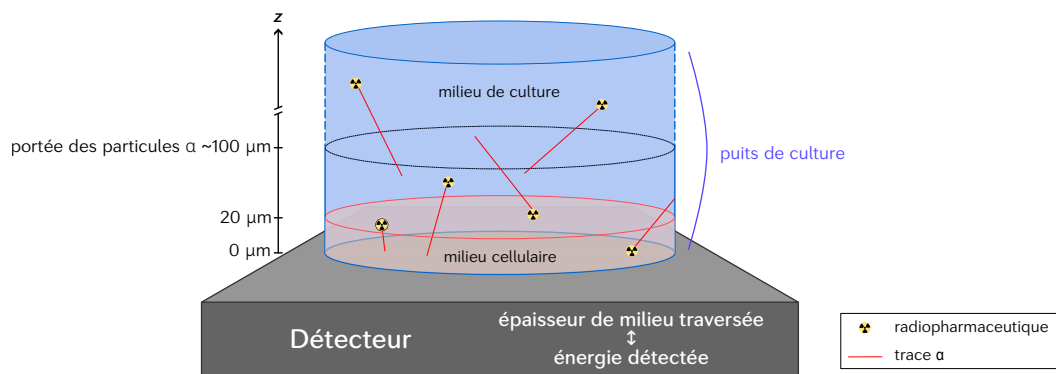


Figure 2.1 – Schéma de principe de la détection de l'énergie des particules α émises à proximité des cellules, depuis le puits de culture. Le schéma n'est pas à l'échelle mais les dimensions caractéristiques sont mentionnées.

L'utilisation d'un tel détecteur doit cependant répondre à un certain nombre de contraintes, inhérentes aux conditions expérimentales des essais *in vitro*. Les cellules étant maintenues en incubateur lors de l'irradiation, le système de mesure doit pouvoir protéger les détecteurs de l'humidité ambiante afin de ne pas compromettre leurs performances. En outre, la distance des détecteurs avec les cellules doit être aussi faible que possible du fait de la faible portée des particules α . Le montage doit donc permettre la transmission des particules α du milieu de culture vers les détecteurs afin d'en mesurer l'énergie.

L'objectif de ce chapitre est de présenter le système de mesure spectroscopique développé pour une utilisation dans des conditions de mesures *in vitro* et répondant aux contraintes soulevées. La première partie est dédiée à la description de différents types de détecteurs sensibles à l'énergie des particules α , envisageables pour une intégration dans le système de mesure, et

à une discussion de leur adéquation aux conditions de mesures *in vitro*. La seconde partie présente ensuite les caractéristiques opérationnelles des détecteurs à semi-conducteurs utilisés dans cette étude. En troisième partie, la pré-amplification du signal de charge des détecteurs est présentée. Elle est suivie en quatrième partie d'une présentation du système d'acquisition FASTER, utilisé pour traiter le signal pré-amplifié. La cinquième partie décrit ensuite le montage expérimental permettant la réalisation de mesures de spectroscopie en incubateur, ainsi que le couplage entre les puits de culture et les détecteurs. En sixième partie, une caractérisation expérimentale du nouveau système de dosimétrie est proposée pour valider son utilisation en conditions d'irradiation *in vitro*. En septième partie, le protocole des essais *in vitro*, en particulier la préparation et l'analyse des cellules ainsi que les radionucléides étudiés au cours de cette thèse, sont présentés. Enfin, la huitième partie de ce chapitre introduit la transcription du montage expérimental en simulation Monte-Carlo, nécessaire à l'analyse des spectres en énergie acquis par les détecteurs afin de reconstruire la distribution spatiale des radiopharmaceutiques, mais également au calcul des facteurs S et des diverses grandeurs microdosimétriques caractérisant les irradiations réalisées (*cf.* **Chapitre 5**).

2.1 Choix du détecteur pour la détection des particules α

La dosimétrie des essais *in vitro* de la RIV- α nécessite de concevoir un système spectroscopique permettant de mesurer l'énergie de chacune des particules α atteignant le détecteur. Ce spectre permet en effet de déterminer l'énergie perdue par les particules α entre leur position d'émission et le détecteur, et de reconstruire la distribution spatiale des radio-isotopes dans le puits de culture. Il permet donc par la suite d'estimer la dose délivrée aux cellules selon la méthodologie décrite au **Chapitre 3**. Les considérations principales dans le choix de la technique de détection portent sur son efficacité de détection ainsi que sur sa résolution en énergie, qui dépendent principalement du matériau, de la physique sous-jacente au principe de détection et de la nécessité ou non d'encapsuler le détecteur (du fait du fort pouvoir d'arrêt des particules α dans la matière) pour une utilisation en incubateur (voir **§1.2.1.1**). Il n'existe pas à notre connaissance de détecteur adapté à une mesure d'activité dans le milieu de culture avec une résolution spatiale suffisante à une application dosimétrique dans le cas des émetteurs α . L'autoradiographie est sans doute la technique de quantification se rapprochant le plus des besoins associés à la dosimétrie dans ce contexte, et sera principalement discutée dans les paragraphes suivants. Elle consiste à utiliser les émissions radioactives produites dans le milieu imagé pour générer une réponse représentative de la distribution spatiale des émetteurs. Elle est particulièrement adaptée à la quantification de l'activité dans des échantillons minces obtenus à partir de résections *ex vivo*, ou dans des milieux cellulaires *in vitro* [89]. Bien que l'autoradiographie soit historiquement associée à l'utilisation de détecteurs à émulsions, présentés en **Section 2.1.1**, celle-ci s'est étendue à d'autres détecteurs dits actifs, permettant d'imager le volume ou la surface en temps réel. Parmi ces détecteurs, discutés dans les paragraphes suivants, on retrouve principalement trois types de détecteurs : les détecteurs gazeux (**§2.1.2**), les détecteurs scintillants (**§2.1.3**) et les détecteurs à semi-conducteurs (**§2.1.4**). Les performances et applications de chacun d'entre eux sont discutées, avant d'être comparées pour l'application étudiée dans ce projet au paragraphe **2.1.5**.

2.1.1 Détecteurs à émulsion

Les émulsions sont des détecteurs de rayonnement passifs, c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent pas d'électronique de détection pour recueillir le signal produit au cours de leur irradiation. Les détecteurs à émulsions sont diversifiés dans leurs formes, distinguées principalement entre films et gels, ainsi que dans leurs compositions, mais tous fonctionnent sur un principe similaire : lors du passage d'une particule incidente dans le détecteur, la structure atomique ou moléculaire

de celui-ci est modifiée le long de la trace de la particule. L'émulsion change alors d'apparence le long de la trace de la particule ionisante, ce qui peut être imagé (éventuellement après un traitement chimique).

Les films apportent une information sur l'irradiation en deux dimensions, dans le plan du film. La résolution spatiale dans le plan du film du faisceau mesuré est définie par la résolution spatiale du scanner, qui est généralement de l'ordre de la dizaine de μm [90, 91]. Pour avoir une information en trois dimensions, d'autres dosimètres passifs ont été développés, toujours se basant sur le phénomène d'émulsion : les films épais, appelés émulsions nucléaires, dédiés principalement à l'étude des traces des particules chargées dans la matière en augmentant les épaisseurs des volumes actifs des films à quelques centaines de μm [92], et les gels de polymère, qui permettent une analyse tri-dimensionnelle sur de plus grands volumes [93].

Bien que majoritairement utilisé pour la caractérisation de champs de photons et d'électrons en routine clinique [94], l'utilisation des détecteurs à émulsion peut s'étendre à la caractérisation dosimétrique de champs d'irradiation de particules α [95, 96]. Ces détecteurs sont également les premiers à avoir été utilisés en autoradiographie, par exemple pour les essais de la RIV, permettant une localisation sub-cellulaire des radiopharmaceutiques [97, 98].

L'ensemble des détecteurs à émulsions souffrent de limitations propre à la physique en jeu. Premièrement, la linéarité de la réponse en dose des émulsions n'est assurée que sur une gamme de doses reçues bien définie, une dose trop faible menant à une réversibilité du signal produit et une sur-exposition menant à une saturation de la réponse de l'émulsion. De plus, dans le cas des films radiochromiques, la réponse des émulsions dépend significativement de la température lors de la mesure, et de la durée séparant l'irradiation du détecteur de sa lecture [90, 99]. Enfin, les détecteurs à émulsion intègrent l'ensemble de la dose délivrée au détecteur au cours de l'irradiation, et élimine toute information temporelle, notamment des variations sur le débit de dose reçu en fonction du temps où sur l'énergie de chacune des particules atteignant le détecteur.

2.1.2 Détecteurs gazeux

Les détecteurs gazeux se basent sur l'interaction des particules chargées incidentes avec les atomes d'un gaz encapsulé dans une enceinte étanche. Une particule ionisante générera, par interactions électromagnétiques, des paires électrons-ions le long de sa trajectoire qui seront ensuite récoltées en appliquant un champ électrique entre deux électrodes situées dans l'enceinte. La mesure d'une variation de courant aux bornes du détecteur signale la traversée de particules chargées, et son intensité peut renseigner sur l'énergie déposée dans le détecteur.

Selon l'amplitude du champ électrique appliquée aux bornes du détecteur gazeux, trois types de comportements peuvent survenir pour la détection du signal. Pour des faibles valeurs de tension, les paires électrons-ions mises en mouvement par le champ électrique n'auront pas une énergie suffisante pour créer d'autres ionisations le long de leur trajectoire. Le signal mesuré correspond donc uniquement aux charges électrons-ions créés par la particule incidentes. Ce mode de fonctionnement, appelé chambre d'ionisation, assure une résolution en énergie optimale (jusqu'à 1,6 % pour des particules α de 5,5 MeV [100]), mais nécessite une électronique d'amplification pour obtenir un signal exploitable. Ce mode de fonctionnement assure également un très faible étalement temporel du signal généré par une particule incidente, ce qui les rends utilisable pour des flux de particules incidentes élevés. Cette capacité en fait un outil dosimétrique central pour les contrôles de qualité dosimétriques en routine clinique.

D'autres types de détecteurs, appliquant une valeur de polarisation plus élevée, permettent d'obtenir un signal amplifié en provoquant une cascade électronique lors de la récolte des paires électrons-ions, appelée avalanche de Townsend. Les avalanches étant des phénomènes stochastiques dont la fréquence est régie par l'intensité du champ électrique, la résolution en énergie de ces détecteurs dépend principalement de la stabilité du champ qui dictera les fluctuations de gain. Le dernier type de comportement est obtenu à partir d'une tension seuil

de polarisation, ou la moindre avalanche produit une saturation du signal de sortie. Ce mode de fonctionnement, correspondant aux détecteurs Geiger-Müller, est utile à la quantification de très faibles activités (ambiante par exemple), mais ne permet plus de réaliser une spectroscopie en énergie de l'irradiation.

Ce type de détecteur peut être employé pour la détection de particules ionisantes dans des échantillons biologiques *ex-vivo* ou sur des cultures cellulaires *in vitro* fixées [101]. Par exemple, Jambon et al. ont proposé une preuve de concept de l'utilisation d'un détecteur Micromegas pour la quantification de l'activité de ^3H à l'échelle cellulaire [102]. Le système commercial d'autoradiographie *BeaQuant* (*ai4r*, Nantes) permet également d'atteindre une résolution spatiale de 20 μm pour la localisation de particules α dans des échantillons minces *ex vivo* [103].

Cependant, ce type de détecteur est caractérisé par une réponse dépendante de la pression et de la température du gaz, qui peuvent dépendre de l'environnement du détecteur. Cette spécificité les rendent difficilement utilisables pour la détection des particules α et des applications dosimétriques durant les essais *in vitro*.

2.1.3 Détecteurs scintillants

Les détecteurs scintillants sont historiquement les premiers à avoir été utilisés pour la détection des particules α , depuis le milieu du XX^e siècle [104-106]. Cette ancienneté explique l'extensivité de la documentation sur leurs mécanismes physiques ainsi que leurs nombreuses applications dans différents domaines de la physique instrumentale [107-109]. Ces détecteurs se basent sur la génération d'une lumière de scintillation visible, produite par fluorescence lors du passage d'une particule ionisante dans un matériau adapté. Deux catégories de scintillateurs peuvent être distinguées, organiques et inorganiques, selon la nature du matériau les composant ainsi que le phénomène physique à l'origine de la fluorescence. A la suite de la traversée d'une particule ionisante, les scintillateurs organiques produisent une lumière de fluorescence lors de la désexcitation des molécules les constituant. Pour les scintillateurs inorganiques, les émissions photoniques ont lieu à la suite de transitions entre les niveaux d'énergie de la structure cristalline. Les scintillateurs organiques et inorganiques présentent des caractéristiques très différentes, par exemple en termes de densité, de composition, d'isotropie du signal de scintillation, ou de prix. Le choix du matériau constituant le scintillateur résulte d'un compromis entre la résolution spatiale, la résolution en énergie ainsi que l'efficacité de détection. Il dépend donc de la nature de l'irradiation et l'objectif de la mesure.

L'utilisation d'un scintillateur nécessite l'ajout d'un photodétecteur (capteurs CMOS ou CCD, tube photomultiplicateur, ou détecteur silicium par exemple) pour détecter la lumière de fluorescence. Les scintillateurs ont largement été utilisés pour des applications biomédicales : en imagerie pour les tomographies par émission monophotonique ou de positron, mais aussi pour la dosimétrie en radiothérapie. En particulier, dans le domaine des faibles activités, des autoradiographes, sensibles aux émissions α ont déjà été produits [110]. L'un d'entre eux permet d'atteindre des résolutions spatiales dans le plan de mesure d'environ 20 μm à l'aide d'un scintillateur inorganique [89].

Bien que peu sensibles à l'environnement et notamment à l'humidité ambiante, les scintillateurs organiques sont généralement caractérisés par un rendement lumineux limité et un défaut de linéarité du signal produit avec le TEL des particules incidentes, appelé *quenching*. Ces scintillateurs sont également sensibles aux émissions β et γ présentes lors des désintégrations de certains radionucléides. Le signal généré par les particules α peut donc potentiellement être plus difficile à extraire. Du fait de la densité relative relativement faible de ces scintillateurs, le parcours des particules α est également suffisamment important pour limiter la résolution spatiale sur le lieu de l'interaction. A l'inverse, les scintillateurs inorganiques, possédant un numéro atomique moyen beaucoup plus élevé, ont une meilleure efficacité et une meilleure

linéarité avec l'énergie des particules α incidentes. Cependant, la plupart de ces matériaux sont fortement hygroscopiques et nécessitent donc une isolation stricte du scintillateur, ce qui les rend peu pratiques d'utilisation dans le cadre de mesures en incubateur.

2.1.4 Détecteurs à semi-conducteurs

Similairement aux détecteurs scintillateurs inorganiques, les détecteurs à semi-conducteurs se basent sur les interactions des particules chargées avec une structure cristalline pour générer un signal dont l'intensité croît avec l'énergie déposée par la particule incidente. La différence principale entre les deux types de détecteurs vient de la nature du signal. Dans le cas des semi-conducteurs, un courant est généré par la création de paires électrons-trous lors du passage de la particule chargée dans le volume de détection, qui est ensuite récolté aux bornes du détecteur par l'application d'une tension aux bornes de celui-ci. Tout comme les détecteurs gazeux fonctionnant en régime chambre d'ionisation, les paires électrons-trous créées ne sont pas amplifiées lors de leur collection. Le signal de détection est donc suffisamment peu étalé dans le temps pour permettre de distinguer les événements individuels jusqu'à quelques kHz de fréquence, mais nécessite d'être amplifiée à l'aide d'une électronique dédiée en sortie du détecteur. Malgré cette étape d'amplification du signal, les détecteurs à semi-conducteurs permettent d'atteindre de très bonnes résolutions en énergie pour la détection des particules α , jusqu'à 8 keV pour une particule α de 5,5 MeV dans des conditions idéales pour un détecteur en silicium [111].

L'amplification des signaux est réalisée à l'aide d'un pré-amplificateur, dont le fonctionnement est détaillé en **Section 2.3**. L'amplification portant à la fois sur le signal du détecteur ainsi que sur le bruit ohmique généré par le câble reliant le pré-amplificateur au détecteur, cette étape doit être réalisée à proximité immédiate du détecteur (moins de 20 cm de câble). Un montage basé sur l'utilisation de détecteurs à semi-conducteurs nécessite donc également de protéger le pré-amplificateur de l'humidité de l'incubateur. Ce type de détecteur est également sensible aux variations de températures en termes de bruit dans le signal de détection. Cependant, comme nous le verrons en **Section 2.2.2**, les semi-conducteurs à silicium sont conçus pour fonctionner à température ambiante, et la température de l'incubateur n'est pas suffisante pour dégrader significativement les performances du détecteur.

Bien qu'un détecteur à semi-conducteur mono-cristallin ne permette pas de distinguer spatialement le lieu de l'interaction de la particule chargée, des détecteurs segmentés permettent une lecture du lieu d'interaction en deux dimensions. Les détecteurs segmentés sont construits à partir d'un cristal semi-conducteur divisé en sections de petites dimensions, chacune reliée à leur propre électronique de pré-amplification puis de lecture. Par exemple, le détecteur Timepix (CERN [112]) a été utilisé pour évaluer l'absorption d'émetteurs α en ex-vivo [113] mais aussi pour estimer le nombre de particules traversant le milieu cellulaire lors d'essais *in vitro*, en irradiant des cellules à l'aide d'une source évaporée de ^{223}Ra placée à proximité des cellules, en dehors du milieu de culture [114]. Avec ce détecteur, une résolution spatiale de 76,9 μm a été obtenue dans le plan de l'échantillon.

2.1.5 Contraintes associées aux essais *in vitro* des émetteurs α

Bien que les principaux types de détecteurs discutés dans les paragraphes précédents soient couramment utilisés en détection des particules α , les conditions expérimentales associées aux essais *in vitro* et l'information nécessaire à la dosimétrie (*i.e.*, l'évolution du spectre en énergie des particules α atteignant le détecteur en fonction du temps) permettent d'éliminer certains types de détecteur. En premier lieu, la nécessité de réaliser une mesure en fonction du temps élimine la possibilité d'utiliser des détecteurs à émulsion.

Ensuite, réaliser une spectroscopie en énergie des particules α émises au cours d'un essai *in vitro* nécessite de placer les détecteurs à très grande proximité des puits de culture, et donc

de les placer en incubateur, maintenu à des températures proches de 37 °C par un système thermostatique.

A cette température, l'eau du milieu de culture est sujette à évaporation. Afin de limiter celle-ci, l'humidité relative de l'air dans la chambre est réglée et maintenue à des niveaux relativement élevés, de l'ordre de 95 %. Cette humidité ambiante est problématique pour l'électronique de détection. Pour une atmosphère maintenue à une température de 37 °C, la température de rosée dans l'incubateur peut être estimée par la formule de Magnus-Tetens à environ 36 °C. Chaque ouverture de l'incubateur, que ce soit pour insérer ou retirer les puits de culture, ou pour insérer le montage dosimétrique dans la chambre, entraînera une chute de la température des composantes de la chambre et en particulier de l'électronique de détection sous cette température de rosée. L'humidité se condensant sur les matériaux en dessous de la température de rosée, l'électronique de détection risque donc un endommagement par corrosion et une perte de qualité du signal.

Au-delà des considérations classiques pour le choix d'un détecteur, celui-ci doit donc satisfaire des conditions propres aux conditions de mesures en incubateur. Ses performances doivent demeurer satisfaisantes dans un environnement à 37 °C, et son intégrité doit être maintenue dans des conditions d'humidité importante, à moins que sa taille soit suffisamment réduite pour concevoir une solution d'isolation du détecteur.

L'utilisation de détecteurs gazeux, dont la réponse peut varier avec les conditions de pression et de température de leur environnement, semble complexe à mettre en oeuvre du fait des variations des conditions atmosphériques (en particulier de température) pouvant se produire lors de l'ouverture de l'incubateur.

Les détecteurs scintillants, tout comme les détecteurs à semi-conducteurs, semblent être adaptés à une utilisation en incubateur, à condition qu'il soit possible de les protéger de l'humidité ambiante. Cependant, parmi tous les scintillateurs disponibles aujourd'hui, les meilleures résolutions en énergie atteignables sont obtenues avec des scintillateurs inorganiques et semblent atteindre seulement 8 % en largeur à mi-hauteur pour une particule α de 5,5 MeV (soit 440 keV) [115], contre moins de 20 keV pour des détecteurs à semi-conducteurs. Puisque dans notre application se base sur la mesure en énergie des particules α pour déterminer leur position d'émission, la résolution en énergie du détecteur est un paramètre critique qui a orienté le choix de la technologie de détection vers les détecteurs à semi-conducteur.

Les détecteurs à semi-conducteurs (comme les détecteurs scintillants) peuvent être mis en oeuvre dans des systèmes à une dimension (intégration du signal sur toute la dimension du détecteur) ou à deux dimensions (par segmentation du détecteur dans le cas des semi-conducteurs, ou par lecture par caméra pour les scintillateurs). Cependant, étant données les faibles activités injectées dans les puits de culture lors des essais *in vitro* (généralement de l'ordre de quelques kBq), la multiplication des voies de mesure se fait au détriment de la statistique dans chacune des voies. Le choix s'est donc finalement orienté sur l'utilisation de détecteurs à semi-conducteur mono-cristallins à base de silicium, dont les dimensions ont été choisies pour permettre d'associer quatre détecteurs à quatre puits de culture dans un seul montage décrit en **Section 2.5**, et dont l'épaisseur a été choisie pour mesurer l'énergie totale des émissions α tout en limitant la sensibilité aux émissions β (voir **Section 2.2**).

2.2 Détecteurs utilisés

Cette sous-section présente les détecteurs utilisés dans cette étude ainsi que l'ensemble de l'électronique d'acquisition associée au montage, avant de proposer une description générale des caractéristiques des signaux des détecteurs à semi-conducteur en silicium.

2.2.1 Caractéristiques opérationnelles

Les détecteurs utilisés dans cette étude sont des détecteurs passivés et implantés en silicium (modèle PIPS 600-22-100 AM, Mirion Technologies [116], présenté en **Figure 2.2**), qui ont subi un dopage important de type p^+ sur leur surface d'entrée (*cf.* **Annexe A**, [117]). Ce modèle a été choisi principalement pour l'épaisseur de son volume de détection, de $305\ \mu\text{m}$ lorsque le cristal est entièrement déplété. Celle-ci est largement suffisante pour arrêter les particules α incidentes (*cf.* **Figure 2.3**), tout en n'absorbant qu'une faible partie de l'énergie des émissions β qui n'interfèrent donc pas significativement avec le signal des émissions α . Les dimensions de ces détecteurs (de diamètre 28 mm) sont adaptées à la taille des puits de culture (de diamètre 15 mm), et permettent d'associer quatre détecteurs à quatre puits de culture (voir **Section 2.5.1**).

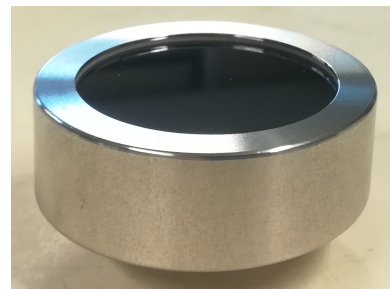


Figure 2.2 – Détecteur semi-conducteur à silicium PIPS 600-22-100 AM.

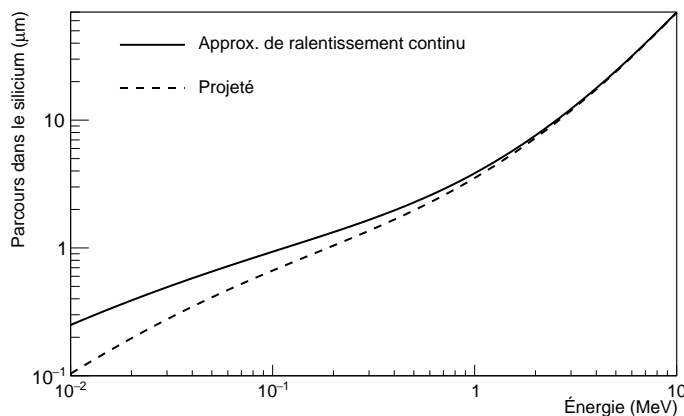


Figure 2.3 – Parcours des particules α dans le silicium, d'après la base de données ASTAR du NIST [27]. Le parcours projeté correspond à la distance moyenne dans l'axe initial de parcours de la particule α , qui subit un straggling spatial à faible énergie.

Les caractéristiques des quatre détecteurs utilisés (notés D1 à D4) indiquées par le constructeur sont listées en **Table 2.1**. Les résolutions en énergie annoncées par le constructeur sont également adaptées à notre application. En effet, en considérant une trace rectiligne d'une particule α de 5 MeV dans l'eau, son énergie diminue de 89 keV par μm parcouru. Une résolution en énergie d'environ 18 keV correspond donc à une résolution spatiale sub-micrométrique, ce qui est adéquat pour la méthodologie illustrée dans les chapitres suivant pour caractériser avec précision la distribution spatiale des radionucléides à proximité des cellules.

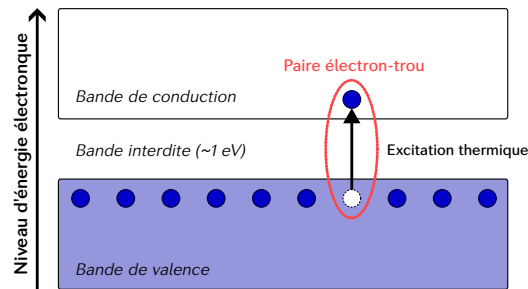
2.2.2 Sources de bruits dans la mesure

La périodicité de la structure cristalline d'un matériau est à l'origine de deux bandes de niveaux d'énergie accessibles pour les électrons du cristal. La bande de plus basse énergie, correspondant aux électrons des couches atomiques les plus externes, est appelée bande de valence. La bande de plus haute énergie est quant à elle appelée bande de conduction ; les électrons s'y trouvant ne sont plus fixés à un site atomique et peuvent se déplacer dans la structure cristalline. Si le matériau n'est pas conducteur, ces deux bandes sont séparées par un intervalle en énergie sans niveau électronique, appelé bande interdite. Les semi-conducteurs

Tableau 2.1 – Spécifications constructeur des détecteurs semi-conducteurs utilisés dans le montage spectroscopique.

| Modèle | PD 600-22-100 AM | | | |
|--|---|----------|----------|----------|
| Nom du détecteur | D1 | D2 | D3 | D4 |
| Numéro de série | 155825 | 155826 | 155827 | 155828 |
| Épaisseur de la couche morte | ≈ 50 nm | | | |
| Résolution en énergie α à 5,486 MeV | 18,3 keV | 18,2 keV | 18,6 keV | 18,5 keV |
| Courant de fuite à 20 °C | 5 nA | 7 nA | 5 nA | 4 nA |
| Surface de détection | 600 mm ² ($\varnothing = 27,64$ mm) | | | |
| Épaisseur du cristal | 305 μ m | | | |
| Tension de déplétion totale | 45 V | | | |
| Tension recommandée | 60 V | | | |

constituent la gamme de matériaux possédant une bande interdite, mais dont la largeur est suffisamment faible (de l'ordre de 1 eV) pour que les électrons puissent passer de la bande de valence à la bande de conduction par excitation thermique. L'excitation d'un électron de la bande de valence, représentée en **Figure 2.4**, est appelée création d'une paire électron-trou, du fait de la génération d'une charge vacante dans la bande de valence.

**Figure 2.4** – Schéma de niveaux d'énergie électronique d'une structure cristalline semi-conductrice.

Un cristal semi-conducteur, à l'équilibre, possède donc des charges libres positives (les trous) et négatives (les électrons) qui sont caractérisés par une mobilité aléatoire avant de se recombiner. L'application d'un champ électrique dans le semi-conducteur génère une mobilité des charges libres parallèle aux lignes de champs appliquées, et permet une collection des charges aux deux extrémités du cristal, lui conférant une résistivité limitée. Par exemple, pour un cristal de silicium pur, la résistivité théorique est de $2,3 \cdot 10^5 \Omega \cdot \text{cm}$ [118].

L'interaction d'une particule ionisante dans un semi-conducteur contribue également à la génération de paires électrons-trous dans le cristal. L'énergie nécessaire à la création d'une paire électron-trou dépend de la largeur de la bande de valence du cristal ainsi que du type de particule incidente. Dans le cas du silicium, à température ambiante, l'énergie nécessaire à la création d'une paire électron-trou par une particule α incidente est de 3,62 eV, et est supérieure à la largeur de la bande interdite du fait d'autres phénomènes de transferts d'énergie entre la particule incidente et le cristal. Cette énergie de création de paire ne varie pas de façon significative avec l'énergie de la particule incidente (dans le cas des particules α ou d'autres particules plus légères), et le nombre de paires électrons-trous créées lors de son passage et donc le signal induit sont proportionnels à l'énergie déposée dans le cristal.

Bien que l'énergie nécessaire à la création d'une paire électron-trou soit seulement de l'ordre de quelques eV, la résolution observée pour la détection des particules α est plutôt de l'ordre

de la dizaine de keV. Plusieurs facteurs distincts sont à l'origine de cette perte apparente de résolution, et introduits dans ce paragraphe.

2.2.2.1 Courant de fuite

En l'absence de rayonnements ionisants, le détecteur génère un signal de bruit de fond fluctuant, nommé courant de fuite.

Deux phénomènes contribuent quasi-exclusivement à ce courant de fuite. Le premier est lié à la génération thermique, aléatoire, de paires électron-trous dans le volume déplété, dont la probabilité croît avec la température T du cristal. Cette probabilité, $p_{\text{th}}(T)$, est proportionnelle à :

$$p_{\text{th}}(T) \propto T^{3/2} \cdot e^{-\frac{E_{\text{gap}}}{2k_B T}} \quad (2.1)$$

où E_{gap} est la largeur de la bande interdite (1,115 eV à 300 K) et k_B désigne la constante de Boltzmann. A température ambiante, pour le silicium pur, cette probabilité de génération double tous les dix degrés. Si ces générations se produisent dans le volume déplété, le champ électrique présent mène à leur détection sous forme de courant, dont l'intensité fluctue aléatoirement. Ces fluctuations sont de l'ordre de quelques nA. Le constructeur mentionne (voir **Table 2.1**) que l'intensité des courants de fuite double tous les 5 °C à température ambiante.

L'autre principale source de courant de fuite est lié à la présence d'intenses gradients de champ électrique aux extrémités de la zone de déplétion. Pour les détecteurs à implantation ionique, ces courants se produisent principalement au niveau de la zone dopée p^+ , à l'intérieur du cristal. Cette zone est également appauvrie en électrons libres, et ne permet pas de conduire efficacement ces courants, rendant leur amplitude assez minoritaire vis à vis du bruit thermique.

Par ailleurs, bien que le champ électrique présent dans la zone de déplétion s'oppose au courant des charges majoritaires des zones dopées (trous en zone p , électrons en zone n), les charges minoritaires sont quant à elles accélérées par le champ présent dans la zone de déplétion. Cependant, les porteurs minoritaires sont présents en si faible quantité dans les milieux dopés que leur contribution au courant de fuite est négligeable.

Ainsi, la génération de courants de fuite dans les détecteurs à semi-conducteurs en silicium est largement dominée par la génération thermique de paires électrons-trous. Les performances du détecteur mentionnées par le constructeur étant à température ambiante, une vérification du niveau de bruit du signal produit par les détecteurs en incubateur, à 37 °C, a été réalisée et est présentée en **Section 2.6.3**.

2.2.2.2 Fenêtre d'entrée du détecteur

La présence d'une couche morte à l'entrée du détecteur, nécessaire à la constitution de la couche dopée p^+ , est également une source de perte de résolution en énergie. Ainsi, toute particule ionisante atteignant le détecteur dépose une partie de son énergie dans cette couche qui ne contribue pas au signal. La quantité d'énergie concernée dépend du type de la particule, de son énergie à l'entrée du détecteur et de son angle d'incidence. La prise en compte de l'épaisseur de la fenêtre d'entrée du détecteur est donc essentielle à l'interprétation de spectres en énergie mesurés par le détecteur, en particulier pour les irradiations faisant intervenir de nombreux angles d'incidence dans le détecteur. Les détecteurs à implantation ionique sont caractérisés par une fenêtre d'entrée très fine, inférieure à 50 nm de matière équivalente au silicium, ce qui permet de limiter l'impact de ce phénomène. Pour une particule alpha incidente de 5 MeV, correspondant à un pouvoir d'arrêt du silicium de 1275,44 MeV · cm⁻¹ d'après les tables du NIST [27], l'énergie de la particule après la traversée de la couche morte à incidence normale est diminuée d'environ 6,4 keV. Pour un angle d'incidence de 60°, l'atténuation double. Au regard

des résolutions classiques des détecteurs (autour de 20 keV à 5 MeV), cette contribution est donc non-négligeable. Pour limiter l'impact de la perte de résolution liée à la fenêtre d'entrée du détecteur lors de l'analyse des spectres en énergie acquis, les simulations Monte-Carlo du montage expérimental doivent prendre en compte la présence de cette couche morte (voir **2.8.2.2**).

2.2.2.3 Irradiation de la structure cristalline

L'irradiation du bloc silicium par des particules chargées génère des dommages à la structure cristalline. La création de paire électron-trou est une forme de dommage, mais qui demeure réversible. Des dommages irréversibles se produisent lorsque les rayonnements incidents transfèrent leur énergie aux noyaux de la structure cristalline, en les délogeant de leur position initiale. Ces défauts induisent une baisse de la résistivité du cristal, ce qui se traduit par une meilleure conduction des courants de fuite et donc une augmentation de leur amplitude. Comme discuté au **Chapitre 1**, au delà du pic de Bragg, la majorité des dépôts d'énergie des particules α avec la matière se font par collisions nucléaires. De façon générale, l'irradiation d'un détecteur à semi-conducteur avec des ions entraîne des dommages à sa structure cristalline beaucoup plus rapidement qu'avec des électrons. Pour une irradiation de détecteurs à implantation par des particules α de 4,5 MeV, Hanser [119] a mis en évidence une augmentation significative de l'amplitude des courants de fuite pour un flux cumulé de particules à la surface d'entrée de 10^{11} cm^{-2} . Sur la surface de nos détecteurs, cela correspond à un nombre de particules α incidentes de $6 \cdot 10^{11}$. Pour un flux incident de particules α de 10^4 s^{-1} , ce qui correspond à environ 1,9 ans d'irradiation aux activités maximales utilisées dans cette étude (300 kBq), les dommages dus aux irradiations ne constituent donc pas une préoccupation particulière pour cette application.

2.3 Pré-amplification du signal

Le courant en sortie du détecteur est particulièrement faible (de l'ordre de $10 \mu\text{A}$ sur une durée d'environ 20 ns), ce qui le rend difficilement mesurable avec précision. Le rôle du pré-amplificateur est de convertir le signal de courant en sortie du détecteur en un signal de tension dont l'amplitude est de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de mV, plus facilement manipulable par une électronique d'acquisition.

Des pré-amplificateurs de charge ont été utilisés. Ceux-ci transforment le signal de courant des détecteurs à l'aide d'un condensateur et d'une résistance mis en parallèle en un signal de tension dont l'amplitude est proportionnelle à l'intégrale du courant en entrée. Si les durées caractéristiques du pré-amplificateur sont adaptées, le signal de pré-amplification consiste en un front montant dont la durée est égale à celle du signal généré en sortie du détecteur et dont l'amplitude est proportionnelle à l'intégrale de la charge Q , suivi d'une décroissance exponentielle liée à la décharge du condensateur dont la durée est significativement supérieure à celle du front. Les allures des signaux avant et après pré-amplification sont représentées en **Figure 2.5**.

Les pré-amplificateurs sont ainsi caractérisés par un gain G , en $\text{mV} \cdot \text{MeV}^{-1}$, et par une durée caractéristique de décroissance τ_{pa} dépendants de la résistance R_{pa} et de la capacité C_{pa} utilisés. Leurs valeurs résultent d'un compromis entre le gain et la durée caractéristique de décharge souhaités, et leur contribution additionnelle au bruit de mesure [120].

L'ensemble de ces considérations contraint la plupart des pré-amplificateurs à opérer avec un gain limité, et avec une durée caractéristique généralement comprise entre 10 et 100 μs . Les pré-amplificateurs utilisés dans le montage proposé ont comme caractéristiques $G = 20 \text{ mV} \cdot \text{MeV}^{-1}$ et $\tau_{\text{pa}} = 20 \mu\text{s}$. Ces valeurs, pour la détection de particules α , constituent un compromis permettant au front montant d'intégrer la totalité de la charge en sortie du détecteur.

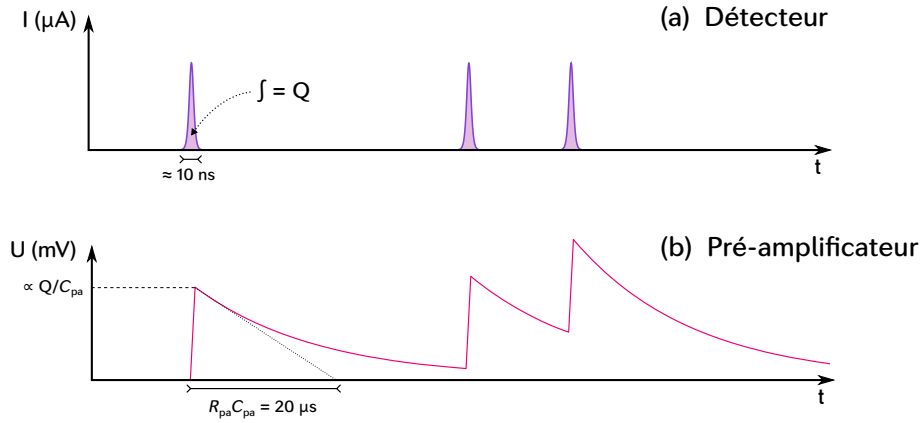


Figure 2.5 – Allures du signal de courant en sortie du détecteur (a) et du signal de tension en sortie du pré-amplificateur (b).

Pour une durée caractéristique de décharge $\tau_{pa} = 20 \mu\text{s}$, un empilement sera observé si une particule traverse le détecteur moins de $200 \mu\text{s}$ après la dernière particule détectée. Pour une fréquence d'évènements mesurés dans le détecteur égale à 10^4 s^{-1} , représentative des fréquences maximales observées pour les activités testées dans les essais *in vitro*, notons Δt la variable aléatoire associée à la durée séparant deux coups successifs mesurés dans le détecteur. Avec l'hypothèse que cette variable aléatoire suive une loi de distribution exponentielle de paramètre 10^4 s^{-1} , le flux maximal observé dans cette étude :

$$\mathbb{P}(\Delta t > t) = \exp(-t \times 10^4 \text{ s}^{-1}) \quad (2.2)$$

alors la probabilité d'observer un empilement du signal est donnée par :

$$\mathbb{P}(\text{empil.}) = \mathbb{P}(\Delta t < 200 \mu\text{s}) = 1 - \exp(-200 \mu\text{s} \times 10^4 \text{ s}^{-1}) = 86,5 \% \quad (2.3)$$

ce qui signifie qu'environ 87 % des amplitudes mesurées seront faussées du fait d'un empilement.

Le signal en sortie du pré-amplificateur est donc généralement mis en forme ensuite à l'aide d'un amplificateur, qui a pour rôle de produire des signaux dont l'amplitude demeure proportionnelle à la charge constituant le signal de détection tout en réduisant leur élargissement temporel, puis un analyseur qui réalise la mesure d'amplitude du signal et la convertit numériquement en une valeur qui sera enregistrée. Ces deux composantes sont discutées dans le paragraphe suivant.

2.4 Système d'acquisition FASTER

Le nouveau système dosimétrique utilise un système d'acquisition numérique réalisant successivement les étapes de filtrage et d'analyse du signal, nommé FASTER (pour *Fast Acquisition SysTem for nuclEar Reasearch*) et développé par le Laboratoire de Physique Corpusculaire de Caen (LPC Caen) et l'ENSICAEN [121, 122].

2.4.1 Présentation du système

Le système d'acquisition utilisé dans cette étude est représenté en **Figure 2.6**. Il est constitué d'un châssis microTCA équipé de plusieurs cartes mères, dont le rôle est de filtrer le signal numérisé, de synchroniser les horloges de détection et de transmettre le signal traité vers une solution logicielle de visualisation et d'enregistrement du signal. Une carte mère peut accueillir deux cartes filles, chacune d'entre elles comptant deux entrées, ce qui revient à un total de quatre voies d'entrées par carte mère.

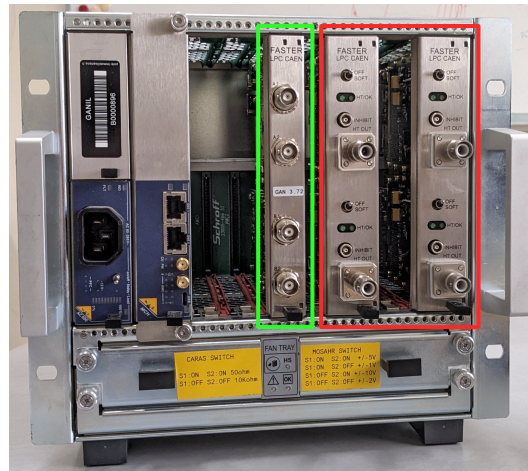


Figure 2.6 – Châssis d'acquisition FASTER avec les cartes mères et filles embarquées nécessaires pour quatre détecteurs. La carte mère pour les entrées du signal en sortie du pré-amplificateur est entourée en vert, les cartes mères délivrant les tensions de polarisation aux détecteurs sont entourées en rouge.

Les signaux des quatre pré-amplificateurs sont donc acquis par deux cartes filles CARAS, qui ont pour rôle de numériser le signal sur 12 bits à une fréquence d'échantillonnage de 500 MHz. Les cartes CARAS sont montées sur des cartes-mères SYROCO_AMC_C5. Le châssis accueille également deux cartes haute tension, qui peuvent délivrer une tension de polarisation aux détecteurs.

Pour quatre détecteurs, l'ensemble de l'électronique de détection et de haute tension constitue ainsi un ensemble compact facilement transportable dans les laboratoires de radiobiologie.

Le signal traité est ensuite transmis *via* un câble Ethernet à un ordinateur d'acquisition, sur lequel un logiciel et une interface graphique permettent de configurer l'acquisition, mais aussi de visualiser en ligne l'allure des signaux à différentes étapes de leur traitement.

2.4.2 Traitement du signal et enregistrement des données

Une bonne mise en forme d'un signal pré-amplifié doit permettre de minimiser son étalement temporel tout en conservant une bonne relation de proportionnalité entre la charge créée dans le détecteur et l'amplitude mesurée. Les mises en forme du signal agissent également comme des filtres passe-bandes permettant d'éliminer les composantes de bruit des signaux d'entrée. D'un point de vue théorique, les mises en formes triangulaires, qui consistent à transformer le signal du pré-amplificateur en un signal symétrique composé d'une rampe croissante puis d'une rampe décroissante, produisent les meilleurs ratio signal-sur-bruit [123]. Pour la spectroscopie α , les filtres trapézoïdaux sont cependant préférés. Les signaux trapézoïdaux ont la même allure que les filtres triangulaires, mais maintiennent pour une courte durée le signal à un plateau lorsque celui-ci atteint son amplitude maximale (voir **Figures 2.7a** et **2.7b**). Ce maintien permet de rendre l'amplitude du signal filtré moins sensible à la durée de collection de charge en sortie du détecteur et d'assurer que l'amplitude du signal mis en forme demeure proportionnelle à la charge totale.

Les cartes mères peuvent être programmées pour utiliser un module de mise en forme réalisant ce type de filtre. Par défaut, FASTER propose 9 mises en formes trapézoïdales différentes, caractérisées par des durées de rampe τ_{rampe} et de plateau τ_{plateau} différentes. Ces possibilités sont listées en **Table 2.2**. Chacune de ces mises en forme peut être identifiée par un temps de mise en forme correspondant à la demi-somme des durées τ_{rampe} et τ_{plateau} , comme illustré en **Figure 2.7c**. Par soucis de clarté, les différentes mises en forme seront désignés par la suite par leur temps de mise en forme τ_{sh} .

Le choix de τ_{sh} résulte lui aussi d'un compromis dépendant du détecteur et du flux de

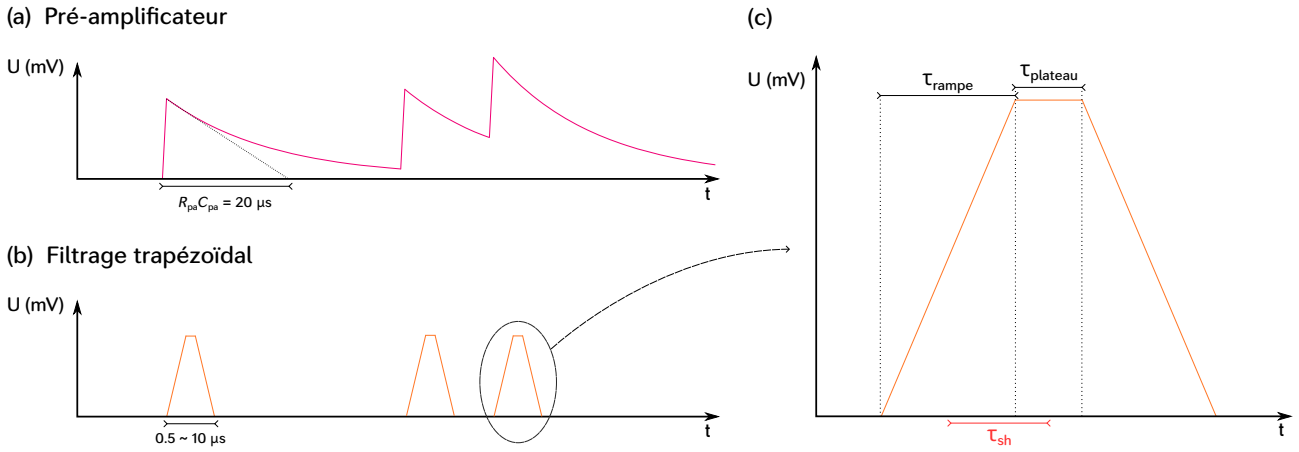


Figure 2.7 – Allure de la mise en forme trapézoïdale (b) du signal de pré-amplificateur (a). La mise en forme trapézoïdale permet de réduire fortement les occurrences d’empilement du signal. (c) Représentation des durées caractéristiques d’un signal trapézoïdal.

Tableau 2.2 – Durées caractéristiques de mise en forme du signal, représentées en **Figure 2.7**

| Temps de mise en forme (τ_{sh}) | 56 ns | 132 ns | 300 ns | 600 ns | 1,2 μ s | 2,4 μ s | 4,8 μ s | 9,6 μ s | 16,36 μ s |
|--|-------|--------|--------|-----------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------|
| Durée de rampe (τ_{rampe}) | 88 ns | 216 ns | 504 ns | 1 μ s | 1,96 μ s | 3,92 μ s | 7,8 μ s | 15,6 μ s | 27,96 μ s |
| Durée de plateau ($\tau_{plateau}$) | 24 ns | 48 ns | 96 ns | 200 ns | 440 ns | 880 ns | 1,8 μ s | 3,6 μ s | 4,76 μ s |

particules mesurées par le détecteur. Pour des valeurs de τ_{sh} trop faible, la pente montante et le plateau deviennent susceptibles de ne plus intégrer entièrement la charge, détériorant ainsi la résolution en énergie observée. Les temps de mise en forme faibles génèrent également des signaux davantage sensibles au bruit généré par l’électronique le long de la transmission du signal.

A l’inverse, pour des valeurs de τ_{sh} trop élevées, le signal trapézoïdal gagne en étalement temporel et peut de nouveau faire l’objet de phénomènes d’empilement significatifs. Le filtre trapézoïdal de FASTER intègre un module de détection d’évènements empilés, auxquels une étiquette est attribuée (*cf.* **Section 2.4.2**). La détection des empilements est basée sur l’utilisation d’une fenêtre temporelle sur le plateau des signaux trapézoïdaux, durant laquelle l’amplitude maximale du signal est mesurée. Si cette mesure s’effectue lors de la présence d’un autre signal trapézoïdal, celle-ci sera biaisée et le module étiquette la mesure réalisée comme empilée. Puisque la mesure de l’amplitude du signal s’opère sur la seconde moitié du plateau, d’après le schéma en **Figure 2.7c**, un évènement sera marqué comme empilé si l’évènement suivant se produit à un intervalle de temps $\Delta t_{suiv} < \tau_{rampe} + \tau_{plateau}$ ou si l’évènement précédent s’est produit à un intervalle de temps $\Delta t_{prec} < \tau_{rampe} + (\tau_{plateau}/2)$ [124]. En post-traitement, en s’assurant préliminairement que le taux d’empilement observés est similaire à celui obtenu théoriquement, les spectres mesurés sont corrigés de l’empilement à l’aide d’un facteur correctif f_{corr} :

$$f_{corr} = \frac{n_e v}{n_e v - n_p u} \quad (2.4)$$

où $n_e v$ et $n_p u$ désignent respectivement le nombre d’évènements mesurés et d’empilements détectés par l’acquisition.

En supposant que l’intervalle de temps entre deux mesures Δt suive une loi de distribution exponentielle (*cf.* **Équation 2.2**) et que les évènements sont indépendants entre eux, la probabilité

d'observer un empilement pour un taux d'évènements Φ_{det} (en s^{-1}) est donnée par :

$$\begin{aligned}
\mathbb{P}(\text{empil.}) &= \mathbb{P}\left([\Delta t_{\text{suiv}} < \tau_{\text{ramp}} + \tau_{\text{plat}}] \cup \left[\Delta t_{\text{prec}} < \tau_{\text{ramp}} + \frac{\tau_{\text{plat}}}{2}\right]\right) \\
&= \mathbb{P}(\Delta t < \tau_{\text{ramp}} + \tau_{\text{plat}}) + \mathbb{P}\left(\Delta t < \tau_{\text{ramp}} + \frac{\tau_{\text{plat}}}{2}\right) \\
&\quad - \mathbb{P}(\Delta t < \tau_{\text{ramp}} + \tau_{\text{plat}}) \cdot \mathbb{P}\left(\Delta t < \tau_{\text{ramp}} + \frac{\tau_{\text{plat}}}{2}\right) \\
&= \left(1 - e^{-(\tau_{\text{ramp}} + \tau_{\text{plat}}) \cdot \Phi_{\text{det}}}\right) + \left(1 - e^{-(\tau_{\text{ramp}} + \frac{\tau_{\text{plat}}}{2}) \cdot \Phi_{\text{det}}}\right) \\
&\quad - \left(1 - e^{-(\tau_{\text{ramp}} + \tau_{\text{plat}}) \cdot \Phi_{\text{det}}}\right) \cdot \left(1 - e^{-(\tau_{\text{ramp}} + \frac{\tau_{\text{plat}}}{2}) \cdot \Phi_{\text{det}}}\right) \\
&= 1 - e^{-\left(2\tau_{\text{ramp}} + \frac{3\tau_{\text{plat}}}{2}\right) \cdot \Phi_{\text{det}}}
\end{aligned} \tag{2.5}$$

A titre d'exemple, pour le pré-réglage $\tau_{\text{sh}} = 1,2 \mu\text{s}$, pour une fréquence d'évènements mesurés égale à 10^4s^{-1} , la fréquence théorique d'évènements marqués comme empilés sera égale à 4,5%. La fréquence d'occurrence d'évènements empilés est ainsi significativement diminuée par rapport à ce qui serait observé avec une analyse du signal en sortie d'amplificateur (*cf.* **Equation 2.3**).

Pour des durées de mise en forme trop élevées, le taux d'empilements peut de nouveau devenir significatif (par exemple, $\mathbb{P}(\text{empilement}) = 46,8\%$ pour la même fréquence d'évènements et $\tau_{\text{sh}} = 16,36 \mu\text{s}$). De plus, les temps de mise en forme élevés sont associés à une plus grande intégration des fluctuations des courants de fuite produits par le détecteur et deviennent rapidement défavorables, indépendamment de l'intensité du flux incident. En pratique, selon les caractéristiques opérationnelles du détecteur, principalement sa durée de collection de charges et l'intensité de ses courants de fuite, un optimum de temps de mise en forme existe, et a été déterminé pour les quatre détecteurs en **Section 2.6.1.3**.

Enfin, la mise en forme trapézoïdale n'intègre que la pente montante du signal en sortie du pré-amplificateur et à pour rôle d'éliminer sa composante exponentielle. Le temps caractéristique du pré-amplificateur, τ_{pa} , est un paramètre à ajuster dans le filtre afin que celui-ci puisse compenser exactement la décharge exponentielle. Si ce paramètre est mal ajusté, une sous-compensation ou à l'inverse une sur-compensation a lieu et crée une distorsion du signal trapézoïdal, ce qui fausse les mesures d'amplitudes réalisées mais retarde également le retour à zéro des signaux trapézoïdaux, entraînant donc l'apparition d'empilements non-détectés.

L'acquisition FASTER enregistre pour chaque évènement son amplitude, la présence ou non d'empilement, ainsi que l'instant de détection à une résolution temporelle de l'ordre de la ns. Il est ainsi possible de produire des spectres en énergie des particules α sur différents intervalles de temps de mesure, et donc d'observer l'évolution temporelle du spectre en énergie des particules atteignant les détecteurs au cours de l'irradiation.

2.5 Conception du système de spectroscopie en conditions *in vitro*

Comme décrit en **Section 2.1.5**, il est nécessaire de concevoir un système utilisable en incubateur afin de maintenir les cellules dans des conditions optimales, minimisant la distance entre les détecteurs et les puits de culture. Les détecteurs à semi-conducteurs choisis ici nécessitent également l'utilisation de pré-amplificateurs à proximité. Ces derniers doivent donc également être protégés des phénomènes de condensation. Le montage expérimental développé et étudié au cours de cette thèse consiste donc en une enceinte étanche contenant les quatre détecteurs à

semi-conducteurs, ainsi que leurs pré-amplificateurs dont un schéma est représenté en **Figure 2.8**. Des puits de culture à fond mince sont placés sur le couvercle en vis à vis des détecteurs. Les différents éléments de ce prototype sont détaillés dans les paragraphes suivants.

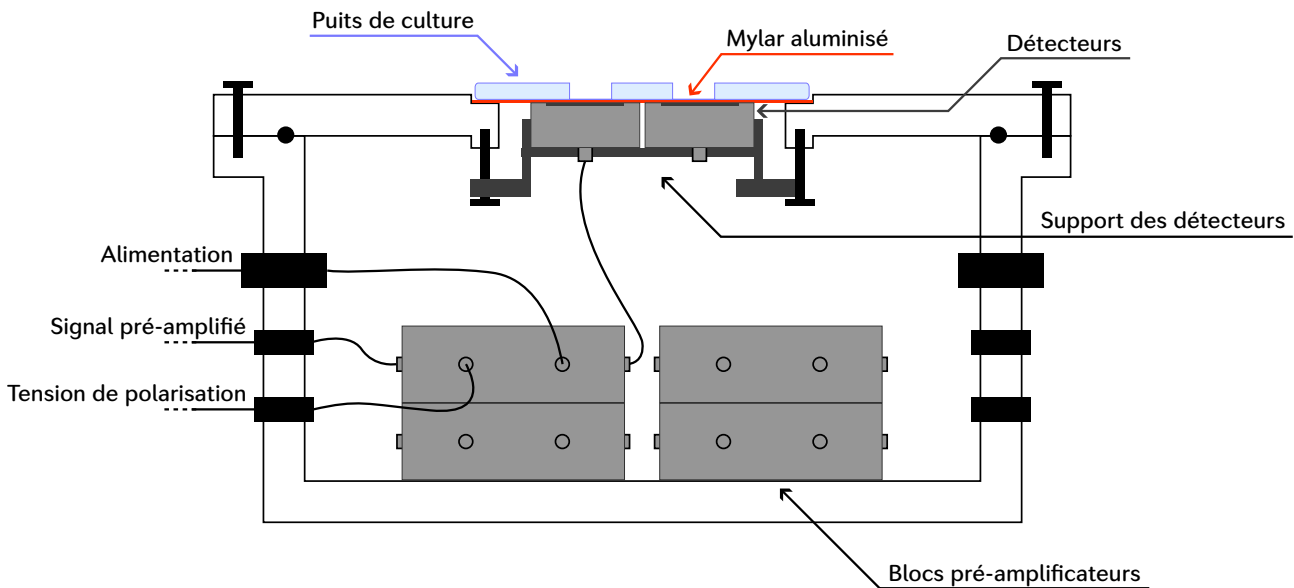


Figure 2.8 – Schéma en coupe de la chambre à détecteurs. Chacun des blocs pré-amplificateurs possède ses propres sorties dédiées, étanches, mais par soucis de lisibilité, seuls les câbles associés à un seul bloc ont été représentés. La jonction entre le couvercle et le contenu de la chambre se fait à l'aide d'un joint circulaire et de vis de serrages. Les plaques contenant les puits de culture, représentés en bleu clair, sont déposées directement sur une fenêtre en mylar aluminisé représentée en rouge.

2.5.1 Puits de cultures à fond mince

Une des contraintes principales concerne la détection des particules α . Les détecteurs doivent idéalement être placés en dessous des cultures cellulaires afin d'être sensibles en priorité aux émissions α émises à proximité des cellules, et qui contribuent en majorité à la dose délivrée aux cellules.

Les puits de culture commercialisés pour les essais cellulaires sont faits de polystyrène ou de silice, et sont caractérisés par une épaisseur de matériau au fond du puits généralement comprise entre 1 et 1,5 mm [125, 126]. Certains puits conçus pour des mesures de transmission optique peuvent présenter des épaisseurs réduites jusqu'à 75 μm de plexiglass [127]. Cependant, la portée d'une particule α de 10 MeV sous l'approximation de ralentissement continu est de 124 μm dans le plexiglass ou de 68 μm dans la silice [27]. Ainsi, même les puits commerciaux caractérisés par les fonds les plus minces atténueraient fortement l'énergie des particules α émises depuis le puits.

Des puits de culture adaptés à notre application ont donc été conçus afin d'être compatibles avec la spectroscopie α , et sont présentées en **Figure 2.9**. Des plaques en plexiglass de 12×12 cm, et de hauteur 5 mm ont été percées de trous cylindriques sur toute leur hauteur. Les puits ainsi créés ont un diamètre de 15 mm et une hauteur de 5 mm.

Le fond des puits est réalisé en collant une feuille de mylar d'épaisseur 2,5 μm sur l'une des deux faces de la plaque. Cette faible épaisseur permet la transmission des particules α émises par les radionucléides depuis le milieu de culture vers les détecteurs placés sous les puits en limitant leur atténuation en énergie.

Deux types de plaques, qui diffèrent par le nombre de puits qu'elles comportent, ont été conçues. Pour l'utilisation avec le système dosimétrique, qui utilise quatre détecteurs, des plaques à quatre puits ont été réalisées. D'autres plaques à seize puits ont également été conçues et ne sont pas destinées à être positionnées sur les détecteurs, mais permettent de tester un plus

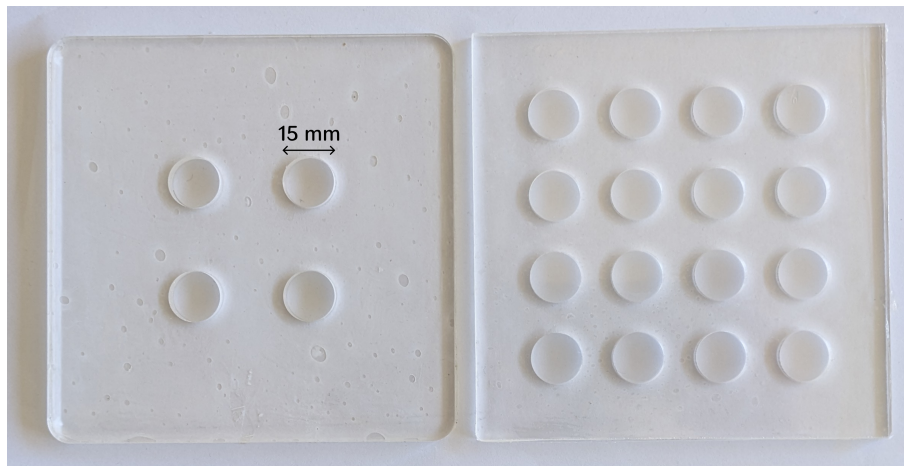


Figure 2.9 – Plaques de puits de culture adaptées à la spectroscopie α . A gauche, une plaque conçue pour une installation sur quatre détecteurs semi-conducteurs à silicium. A droite, une plaque à seize puits, permettant de réaliser des tests *in vitro* sans mesures mais dans des conditions de culture cellulaire identiques.

grand nombre d'échantillons cellulaires dans des conditions expérimentales similaires afin d'avoir une meilleure statistique sur les effets biologiques observés à la suite d'une irradiation.

Afin de vérifier que les cellules puissent se développer convenablement sur ces nouveaux puits de culture, des cultures cellulaires ont étéensemencées dans deux plaques de seize puits. Comme discuté plus en détails en **Section 2.7.1**, aucune toxicité significative induite par les puits de culture sur les cultures cellulaires n'a été identifiée.

2.5.2 Enceinte étanche pour l'électronique de détection

Comme mentionné précédemment, réaliser une spectroscopie en énergie des particules α émises au cours d'un essai *in vitro* nécessite de placer les détecteurs à très grande proximité des puits de culture, et donc de les placer en incubateur.

Afin de protéger l'électronique de détection de l'humidité, une chambre étanche a donc été conçue. Cette chambre, dont la conception et les contenus sont schématiquement représentés en **Figure 2.8**, est constituée de deux parties principales, le contenant principal où sont logés les pré-amplificateurs (montré en **Figure 2.10**) et le couvercle permettant d'interfacer les détecteurs, placés en face intérieure, et une plaque de culture à l'extérieur (montrés en **Figure 2.11**).

2.5.2.1 Contenu de la chambre

L'intérieur de la chambre est conçu pour contenir les pré-amplificateurs, qui doivent être à proximité des détecteurs afin de minimiser la longueur de câble et réduire autant que possible la génération de bruit avant la pré-amplification (voir **Figure 2.10b**). Chacun des boîtiers pré-amplificateurs possède une entrée pour leur alimentation basse tension (± 12 V), une entrée pour la haute tension de polarisation à redistribuer au détecteur ($+60$ V), une entrée pour récupérer le courant de charge généré par le détecteur et une sortie délivrant le signal de tension pré-amplifié. A l'exception de l'entrée recevant le courant de charge en provenance du détecteur, les différents câbles proviennent ou doivent atteindre des composantes en dehors de l'incubateur. Comme le montre la **Figure 2.10a**, des passages de câble étanches ont donc été conçus pour permettre la transmission de ces câbles en dehors de l'enceinte. Un passage de câble permet ensuite de connecter l'enceinte à l'extérieur de l'incubateur. Enfin, les détecteurs étant sensibles à la lumière, l'intérieur et le fond de la chambre ont été tapissés à l'aide de feuilles d'aluminium dans le but de limiter la transmission d'une éventuelle lumière parasite. Ces feuilles, conductrices,

permettent également de limiter le bruit généré par les pré-amplificateurs en mettant en commun leurs masses.

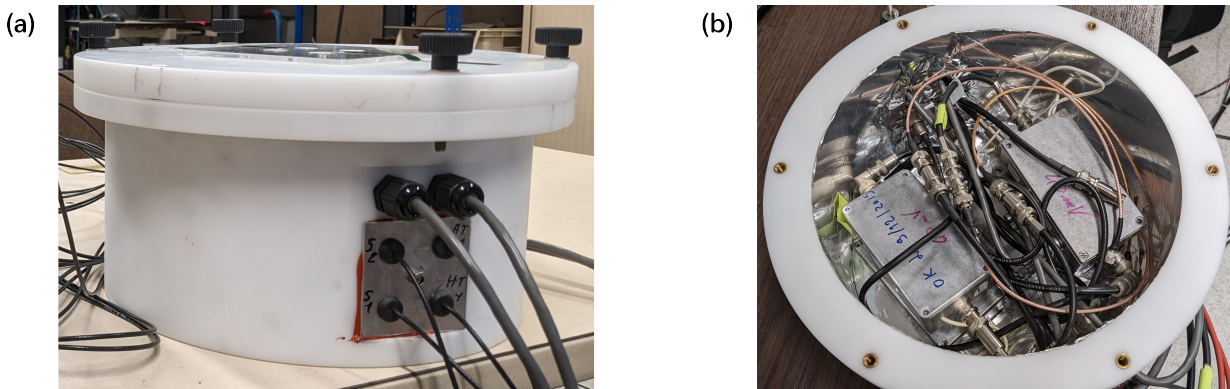


Figure 2.10 – (a) Enceinte étanche pour la spectroscopie des essais *in vitro* en incubateur. Sur le côté de l'enceinte, des passages de câble étanches permettent la communication des signaux d'alimentation et de pré-amplification en dehors de l'enceinte. (b) Intérieur de la chambre étanche, contenant les boîtiers pré-amplificateurs et l'ensemble des connectiques nécessaires. La paroi intérieure est tapissée d'une couche d'aluminium.

2.5.2.2 Couvercle de la chambre

Le couvercle de la chambre est conçu pour créer une interface la plus fine possible entre les puits de culture et les détecteurs, tout en protégeant ces derniers de l'humidité de l'incubateur et de la lumière. La partie supérieure (**Figure 2.11a**) possède un léger renforcement dont les dimensions sont adaptées à celles des plaques de culture, et permet un positionnement précis des puits au dessus des détecteurs. Ce renforcement est lui-même percé afin de placer les détecteurs au plus près des puits de culture (*cf.* **Figure 2.8**). Cependant, afin d'assurer l'étanchéité à l'humidité et à la lumière nécessaire au bon fonctionnement des détecteurs, une feuille de mylar d'épaisseur $6\ \mu\text{m}$, sur laquelle un dépôt d'aluminium d'environ $75\ \text{nm}$ a été réalisé par évaporation, a été tendue le long de cette interface. L'épaisseur de la couche d'aluminium a été vérifiée à partir de mesures en chambre à vide, présentées en **Section 2.6.2**.

La partie inférieure du couvercle (**Figure 2.11b**) contient quant à elle un support pour les détecteurs permettant de les maintenir au contact de la feuille de mylar aluminisé et donc des puits de culture. Ce support est réglable à l'aide de vis de précision permettant d'assurer la mise au contact des détecteurs avec la fenêtre en mylar, tout en limitant les contraintes appliquées à cette dernière. La surface intérieure du couvercle est également tapissée d'une feuille d'aluminium afin de limiter la transmission de lumière parasite vers les détecteurs.

2.5.2.3 Étanchéité de la chambre

L'étanchéité de la chambre à l'air humide de l'incubateur est assurée à l'aide d'un joint circulaire liant le couvercle et la partie inférieure de la chambre (visible sur la **Figure 2.11b**), ainsi qu'à l'aide de vis de serrages entre les deux composantes (visible sur la **Figure 2.10a**). Une fois fermée, l'ensemble des câbles, des détecteurs, et des pré-amplificateurs est protégé de la condensation.

2.6 Caractérisation expérimentale du système de spectroscopie

L'ensemble des éléments de ce système de spectroscopie a fait l'objet d'une caractérisation préliminaire afin de valider son fonctionnement et d'optimiser les paramètres d'acquisition et d'analyse.

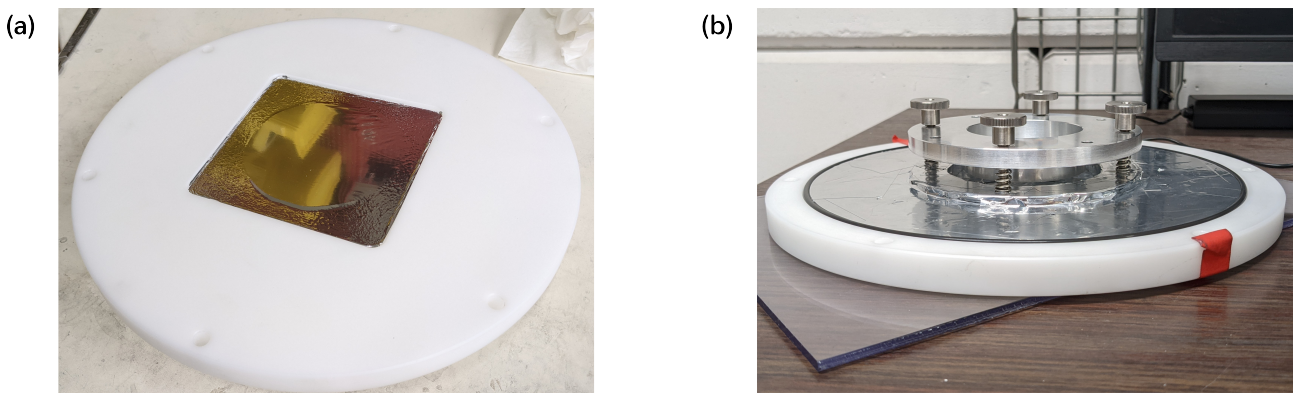


Figure 2.11 – (a) Face supérieure du couvercle. Une feuille de mylar sur laquelle de l'aluminium a été déposé par évaporation a été tendue. (b) Face intérieure du couvercle, où se trouve le support des détecteurs. Leur mise en contact avec la fenêtre aluminisée est assurée par des vis de précision.

2.6.1 Caractérisation des détecteurs et de la chaîne d'acquisition

Les caractéristiques des détecteurs données par le constructeur (**Table 2.1**) ont été obtenues pour une électronique de détection standardisée, différente de celle utilisée dans notre prototype, et pour un flux de particules incidentes inconnu. Il est donc nécessaire de vérifier et d'optimiser la résolution atteignable avec nos détecteurs et la chaîne d'acquisition associée.

Pour ce faire, les détecteurs ont été placés dans une chambre à vide (à une pression de l'ordre de $1 \cdot 10^{-4}$ mbar), présentée en **Figure 2.13a**, et testés à l'aide d'une source de particules α . Les paramètres d'acquisition du filtre trapézoïdal ont alors été ajustés afin d'obtenir la meilleure résolution en énergie possible.

La source utilisée est une source planaire comprenant trois radionucléides émetteurs α implantés par électro-déposition sur un disque en acier inoxydable, communément appelée source 3α . La source est constituée des radio-isotopes ^{239}Pu , ^{241}Am et ^{244}Cm dont les énergies d'émission sont comprises entre 5,1 MeV et 5,8 MeV, pour des activités respectives de l'ordre du kBq. Comme illustré en **Figure 2.12**, les spectres d'émission α des trois radio-isotopes sont caractérisés par la présence d'une raie de probabilité largement supérieure aux autres, ce qui permet d'en faire une source d'étalonnage ou de mesures de résolution fiable.

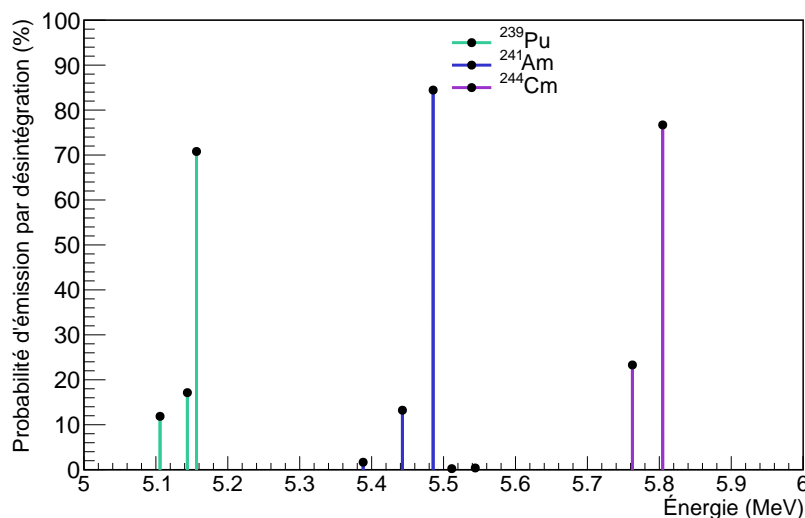


Figure 2.12 – Spectre en énergie d'émission de la source 3α utilisée pour la caractérisation des détecteurs, d'après la *Table des Radionucléides* du BIPM [34, 35, 37].

Les détecteurs ont été placés dans des portes-détecteurs dédiés, permettant un positionnement reproductible dans la chambre à vide (**Figure 2.13b**). La source 3α émettant de façon isotrope, celle-ci a été positionnée à une distance du détecteur suffisante (**Figure 2.13c**) pour limiter la distribution des angles d'incidence atteignant le détecteur, qui se traduirait par une disparité des atténuations dans la couche morte du détecteur et donc en une perte de résolution. Du fait des dimensions de la source et de la surface d'entrée du détecteur, pour une distance de 5 cm, l'incidence maximale pour une particule détectée est de 20° , ce qui correspond à une variation maximale de parcours dans la couche morte de 10 %, induisant donc une dégradation négligeable de la résolution.

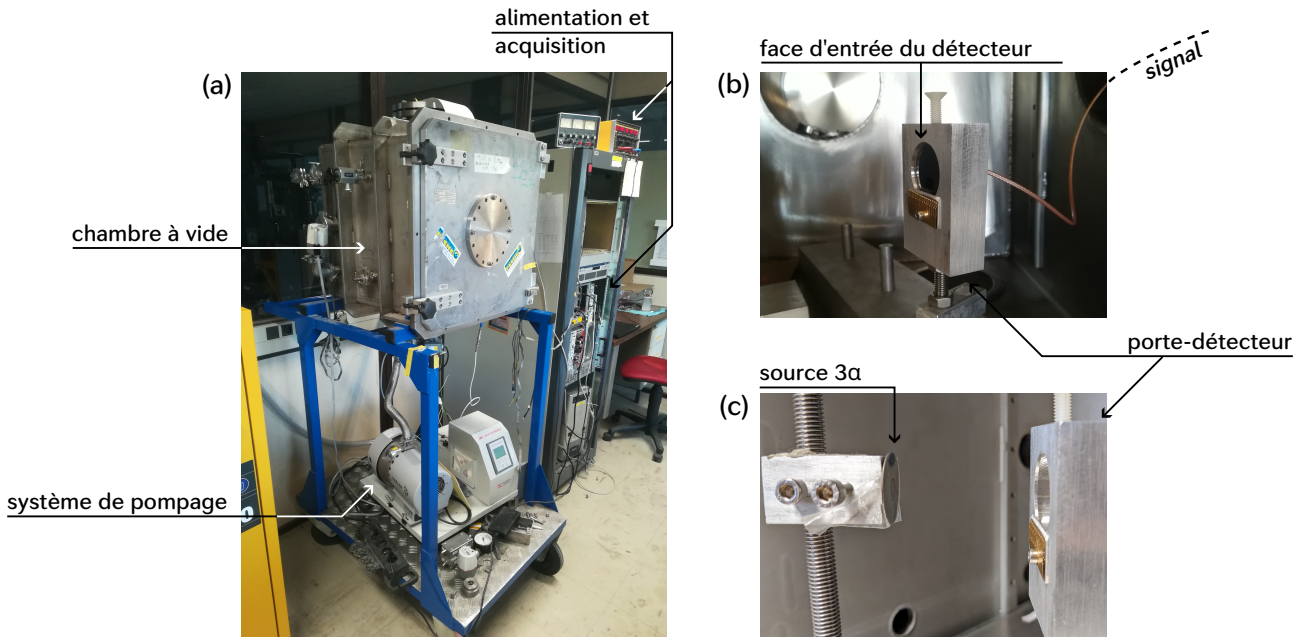


Figure 2.13 – Montage pour la caractérisation des détecteurs et de l'acquisition. (a) Chambre à vide utilisée pour l'optimisation des paramètres de détection, dans laquelle sont placés la source 3α et les détecteurs. (b) Le détecteur est maintenu en position par un porte détecteur, qui permet d'orienter sa surface d'entrée. (c) La source 3α est placée à distance du détecteur pour limiter les angles d'incidence des particules sur le détecteur.

2.6.1.1 Seuil d'acquisition

En premier lieu, le seuil pour le déclenchement de l'acquisition doit être ajusté. La présence de bruit électronique génère en sortie du pré-amplificateur un bruit d'amplitude aléatoire, qui est ensuite filtré par la mise en forme trapézoïdale de FASTER. Parallèlement à la génération du signal destiné à la mesure d'amplitude (nommé *spectro out*), FASTER réalise un filtrage trapézoïdal très rapide ($\tau_{sh, fast} = 60$ ns, nommé *fast out*) qui peut être utilisé afin de détecter l'arrivée du signal avec plus de précision, ce qui assure un bon fonctionnement du module d'identification des empilements. Les empilements se produisant de façon significative dans notre application, la détection des événements a été réglé à partir de la mesure de l'amplitude du signal *fast out*. Un événement est alors détecté si l'amplitude de ce signal est supérieure à au moins cinq fois l'amplitude du bruit de fond (d'environ 1 mV).

2.6.1.2 Réglage de τ_{pa}

Pour l'ensemble des quatre pré-amplificateurs (un par détecteur), le signal après application d'un filtre trapézoïdal large (typiquement, $\tau_{sh} = 8$ μ s) a été visualisé à l'oscilloscope. La valeur de τ_{pa} a été réglée de sorte à ce que le signal trapézoïdal revienne strictement à la ligne de base

après la pente descendante. Pour l'ensemble des pré-amplificateurs, un temps caractéristique de $20\ \mu\text{s}$ attribué à τ_{pa} a permis de satisfaire ce critère.

2.6.1.3 Étude de la résolution en fonction de τ_{sh}

A l'aide du montage expérimental décrit précédemment, des acquisitions sur 10 min pour différentes configurations des filtres trapézoïdaux présentés en **Table 2.2** ont été réalisées, pour chacun des quatre détecteurs. Les spectres obtenus ont ensuite été calibrés en énergie selon une loi affine à l'aide des 3 pics principaux des radionucléides de la source ^{241}Am . L'atténuation en énergie de la couche morte du détecteur a été prise en compte lors de la calibration, mais a un impact mineur, puisque la traversée de 50 nm de silicium entraîne une perte de 6 keV pour une particule α de 6 MeV et de 7 keV pour une particule α de 5 MeV.

La résolution des détecteurs a été évaluée comme la largeur à mi-hauteur (LMH) du pic d'émission principale de ^{241}Am , à partir d'ajustements gaussiens réalisés sous ROOT. La résolution en fonction de τ_{sh} est présentée en **Figure 2.14** pour les quatre détecteurs. La **Figure 2.15** illustre quant à elle l'allure des spectres observés pour deux valeurs de τ_{sh} différentes.

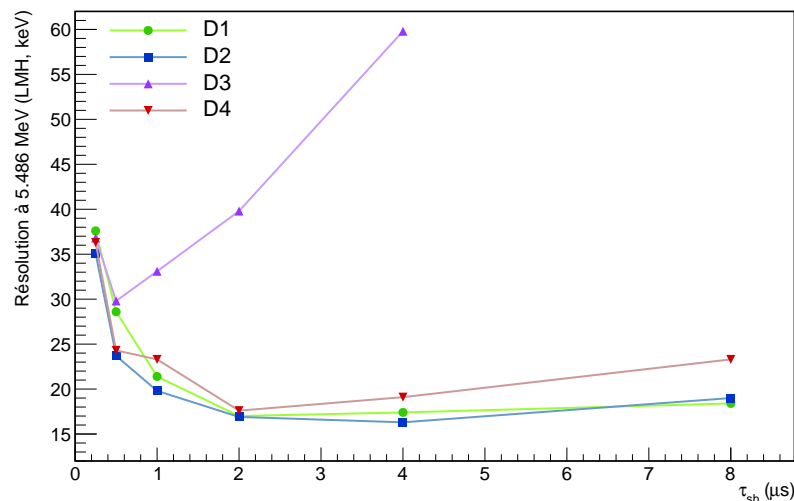


Figure 2.14 – Évolution de la résolution observée au pic de ^{241}Am pour différentes valeurs de τ_{sh} , pour chacun des détecteurs. La résolution est exprimée en LMH.

Pour les détecteurs D1, D2 et D4, les courbes de résolution en fonction de τ_{sh} suivent les descriptions théoriques précédentes, avec la présence d'un optimum de résolution observée pour une valeur de τ_{sh} entre 2 et 4 μs . Les résolutions minimales atteintes pour ces trois détecteurs au pic de ^{241}Am sont respectivement de 17,0, 16,3 et 17,6 keV. Pour des valeurs de τ_{sh} inférieures, le signal trapézoïdal n'est pas suffisamment long et devient sensible aux fluctuations des durées de collecte du signal en sortie du détecteur. Ce phénomène, apparent en **Figure 2.15**, se traduit par une dégradation de la résolution en énergie. À l'inverse, pour des valeurs de τ_{sh} supérieures, le signal trapézoïdal intègre davantage de bruits de plus basses fréquences, liés notamment aux courants de fuites dus aux défauts de la structure cristalline du détecteur. Pour la diode D3, ces composantes de bruit apparaissent plus importantes, et signalent une dégradation du détecteur, résultant en un décalage du temps de mise en forme optimal à 0,5 μs associé à une résolution de 29,8 keV. En pratique, cette dégradation du détecteur D3 reste suffisamment faible pour notre application et n'a pas une influence significative sur les spectres acquis lors des essais *in vitro* présentés au **Chapitre 4**.

Outre l'optimisation de la résolution en énergie, le choix de τ_{sh} est dicté par la probabilité d'observer des empilements. Celle-ci, donnée en **Équation 2.5**, croît quasi-linéairement avec τ_{sh}

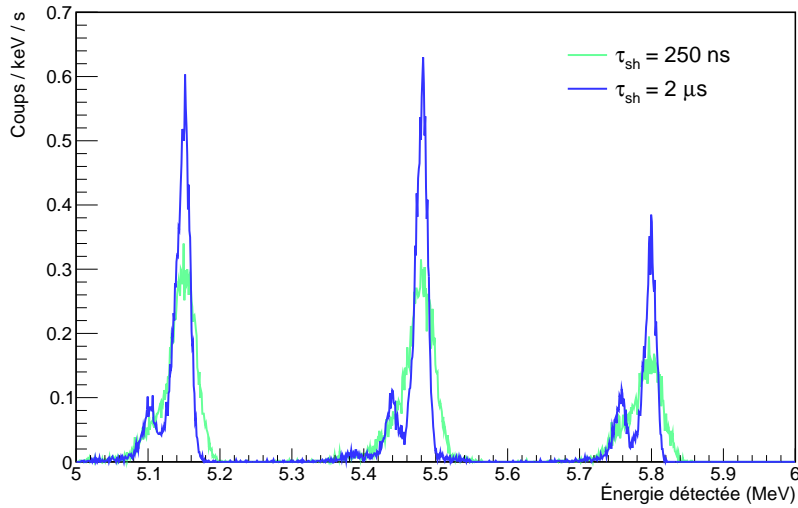


Figure 2.15 – Spectres calibrés de la mesure avec le détecteur D1 du spectre en énergie d’une source 3α en chambre à vide, pour deux valeurs de τ_{sh} différentes.

ainsi qu’avec le flux de particules incidents sur le détecteur. Pour les mesures réalisées dans la chambre à vide et présentées dans ce paragraphe, le taux d’événements moyen était d’environ 40 s^{-1} . La **Tableau 2.3** indique les taux d’empilements observés.

Tableau 2.3 – Taux d’empilements observés et des empilements théoriques, dont l’incertitude est donnée à 3 écarts-type. Les empilements théoriques dépendent du flux moyen de particule observé (ici, compris entre 38 et 40 coups par seconde), qui peut varier entre l’installation de deux détecteurs.

| Détecteur | τ_{sh} | 250 ns | | 500 ns | | 1 μs | |
|-----------|-------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| | | Taux d’empilement | Taux théorique | Taux d’empilement | Taux théorique | Taux d’empilement | Taux théorique |
| D1 | | 0,07 % | [0,00, 0,02] % | 0,49 % | [0,00, 0,03] % | 0,08 % | [0,00, 0,04] % |
| D2 | | 0,03 % | [0,00, 0,02] % | 0,08 % | [0,00, 0,03] % | 0,04 % | [0,00, 0,04] % |
| D3 | | 0,03 % | [0,00, 0,02] % | 0,12 % | [0,00, 0,03] % | 0,05 % | [0,00, 0,04] % |
| D4 | | 0,03 % | [0,00, 0,02] % | 0,06 % | [0,00, 0,03] % | 0,06 % | [0,00, 0,04] % |
| Détecteur | τ_{sh} | 2 μs | | 4 μs | | 8 μs | |
| | | Taux d’empilement | Taux théorique | Taux d’empilement | Taux théorique | Taux d’empilement | Taux théorique |
| D1 | | 0,04 % | [0,00, 0,07] % | 0,16 % | [0,02, 0,12] % | 0,19 % | [0,07, 0,21] % |
| D2 | | 0,09 % | [0,00, 0,07] % | 0,11 % | [0,02, 0,12] % | 0,11 % | [0,07, 0,22] % |
| D3 | | 0,06 % | [0,00, 0,07] % | 0,13 % | [0,02, 0,12] % | 0,09 % | [0,07, 0,22] % |
| D4 | | 0,09 % | [0,00, 0,07] % | 0,09 % | [0,02, 0,12] % | 0,14 % | [0,07, 0,22] % |

Ceux-ci sont généralement proches des intervalles de confiance associés aux taux théoriques, bien que parfois légèrement supérieurs. Cette légère sur-occurrence d’empilements peut s’expliquer par la présence de défauts de masse dans le circuit de détection, qui peuvent sporadiquement entraîner la génération de signaux de décharge suffisamment intenses pour être détectés. Ces signaux peuvent prendre la forme d’oscillations à haute fréquence, qui peuvent générer plusieurs événements détectés comme empilés. Si ces auto-empilements liés aux défauts de masse sont significatifs (comme ce qui a été observé lors de l’acquisition réalisée ici avec le détecteur D1, pour $\tau_{sh} = 500\text{ ns}$), la correction proposée en **Équation 2.4** peut entraîner une surestimation du signal réel. Les taux d’empilements observés doivent donc systématiquement être contrôlés et comparés avec les taux théoriques. Si une déviation significativement large est observée, le

facteur correctif pourra être modifié par :

$$f_{\text{corr}} = \frac{1}{1 - \mathbb{P}(\text{empilement})} \quad (2.6)$$

où la probabilité $\mathbb{P}(\text{empilement})$ correspond à la probabilité théorique définie en **Équation 2.5**.

Les acquisitions présentées dans la suite de ce manuscrit ont été réalisées pour un temps de mise en forme $\tau_{\text{sh}} = 1 \mu\text{s}$. Ce temps de mise en forme constitue un compromis entre les courbes de résolution observées en **Figure 2.14** et les taux d'empilements attendus. En effet, les flux de particules attendus lors des essais *in vitro* sont plus élevés que ceux observés lors de la caractérisation des détecteurs, avec des flux de détection de l'ordre de 10^2 à 10^3 s^{-1} . Un taux d'empilement plus faible entraîne une diminution de l'amplitude des facteurs correctifs f_{corr} à appliquer aux acquisitions, ce qui réduit les risques de distorsion des spectres acquis. Enfin, bien que l'effet de la résolution apparaisse clairement en **Figure 2.15**, les spectres observés lors du réglage de l'acquisition correspondent à un spectre en énergie des particules incidentes en raies. Dans le cas d'un radiopharmaceutique dilué dans le milieu de culture, le spectre en énergie mesuré sera un spectre continu du fait des différents parcours dans la matière, et l'effet de la résolution du détecteur sur la forme du spectre sera négligeable pour la gamme de résolutions observées en **Figure 2.14**. Les temps de mise en forme plus courts, associés à une perte brutale de résolution des détecteurs en **Figure 2.15**, sont également associés à une perte de linéarité entre l'amplitude du signal amplifié et l'énergie de la particule incidente, et doivent donc être évités pour notre application.

2.6.2 Mesure de l'épaisseur des feuilles de mylar

La perte d'énergie des particules α dans les épaisseurs de mylar (présentes au fond du puits et sur la fenêtre d'entrée de l'enceinte) a un impact fort sur la spectroscopie des essais *in vitro*, et doit donc être évaluée avec précision pour simuler la réponse des détecteurs utile à l'analyse des spectres. Il est également important de simuler la couche d'aluminium présente sur la fenêtre d'entrée, les probabilités d'interactions dans ce matériau différant de celles associées au mylar.

Suite au réglage de l'acquisition, la chambre à vide a été utilisée pour estimer l'épaisseur de la fenêtre d'entrée en mylar aluminisé. Dans un premier temps, les épaisseurs des deux feuilles de mylar (puits et fenêtre d'entrée) ont été contrôlées à l'aide d'un mesureur d'épaisseur. Celles-ci ont été respectivement évaluées à $2,5 \mu\text{m}$ et $6,0 \mu\text{m}$ avec une incertitude de lecture de 50 nm . Pour des particules α entre 5 et 6 MeV, cette incertitude correspond à une atténuation en énergie comprise entre 10 et 12 keV, inférieure à la résolution en énergie de nos détecteurs.

Ensuite, afin d'évaluer l'épaisseur de la couche d'aluminium déposée par évaporation, une feuille de mylar aluminisée identique à celle utilisée comme fenêtre d'entrée de l'enceinte étanche a été fixée sur un support métallique, et positionnée à $2,5 \text{ mm}$ de la surface d'entrée du détecteur D1 (voir **Figure 2.16**).

Deux acquisitions successives ont été réalisées avec le détecteur D1. La première acquisition, réalisée sans la feuille de mylar aluminisée, permet de calibrer les détecteurs en énergie. En notant C le numéro de canal, et E l'énergie correspondante (en MeV), la fonction de calibration a été évaluée :

$$E = (6.290 \pm 0.065) \cdot 10^{-5} \times C + (0.042 \pm 0.056) \quad (2.7)$$

Une seconde mesure à ensuite été réalisée avec la feuille de mylar aluminisée afin de déterminer son épaisseur. Les spectres correspondants, calibrés en énergie, sont présentés en **Figure 2.17**.

La présence de la feuille de mylar aluminisée induit une perte d'énergie d'environ 700 keV pour chacun des pics initialement observés, ainsi qu'une perte de résolution apparente due à

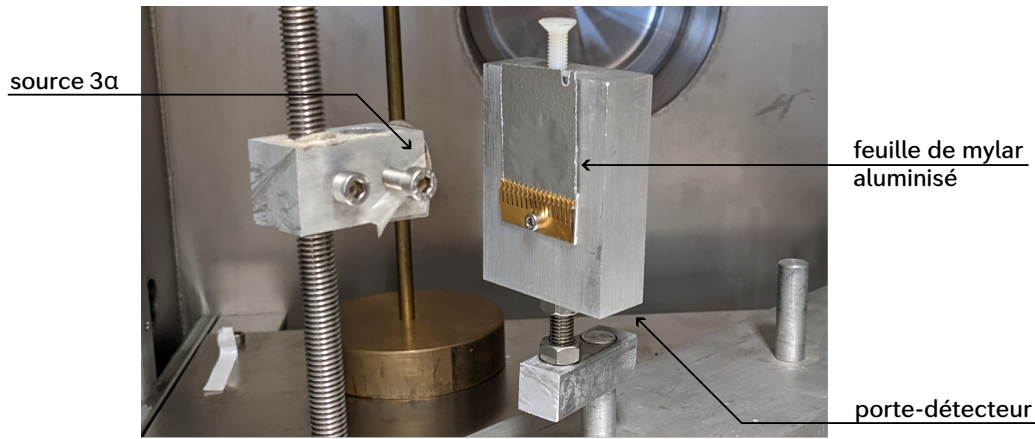


Figure 2.16 – Détermination de l'épaisseur de la feuille de mylar aluminisée en chambre à vide. La feuille est fixée juste avant la surface d'entrée du détecteur (voir **Figure 2.13**).

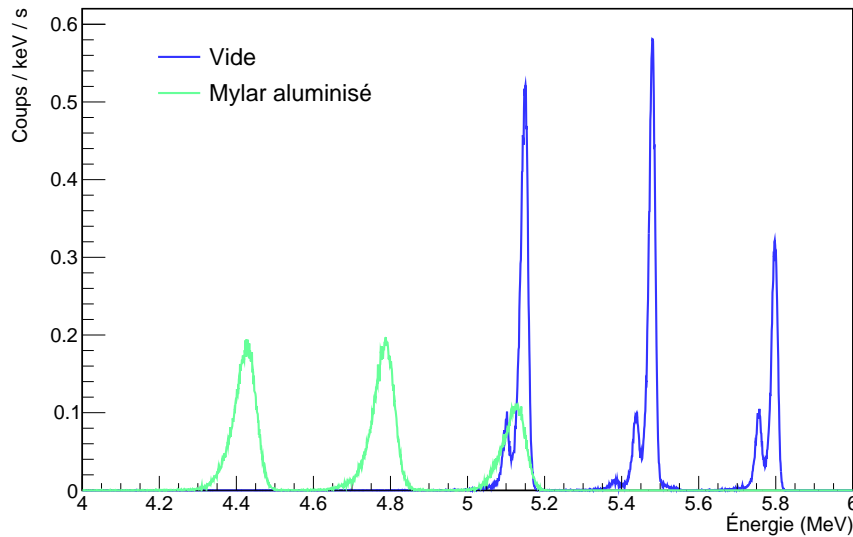


Figure 2.17 – Comparaison des spectres en énergie obtenus en chambre à vide, avec une irradiation du détecteur D1 par une source 3 α , avec ou sans la feuille de mylar aluminisée. La durée d'intégration pour les deux spectres est d'environ 1 h.

une fluctuation de l'énergie perdue par les particules α lors de la traversée de la feuille de mylar.

Afin de déterminer l'épaisseur de la couche d'aluminium, une simulation Monte-Carlo a été réalisée avec Geant4 (*cf.* **Section 2.8.1**), en modélisant la source, le porte détecteur, le détecteur ainsi que le support de la feuille de mylar aluminisée. Dans chacune des simulations, la feuille de mylar aluminisée a été représentée comme la superposition de deux couches, une de mylar d'épaisseur 6 μm et l'autre d'aluminium d'épaisseur variable entre 40 nm et 170 nm.

Pour chacune des feuilles simulées, 10^8 particules α ont été simulées, de façon non-isotrope afin de couvrir uniquement les angles d'incidence pouvant traverser la feuille de mylar. Le spectre d'émission α simulé correspond à celui présenté en **Figure 2.12**, corrigé des activités estimées pour chacun des isotopes. Enfin, la position en énergie des maximums des pics associés à chacun des radio-éléments a été évaluée par ajustement gaussien des pics. L'écart quadratique t entre les énergies mesurées E_{mes} et simulées E_{sim} (en keV) a été calculé comme :

$$t = (E_{\text{mes}, 239\text{Pu}} - E_{\text{simu}, 239\text{Pu}})^2 + (E_{\text{mes}, 241\text{Am}} - E_{\text{simu}, 241\text{Am}})^2 + (E_{\text{mes}, 244\text{Cm}} - E_{\text{simu}, 244\text{Cm}})^2 \quad (2.8)$$

La variation de l'écart quadratique en fonction de l'épaisseur d'aluminium simulée a été

déterminée pour les deux jeux de paramètres d'étalonnages extrêmes ($6,355 \cdot 10^{-5}$ MeV/canal et $6,225 \cdot 10^{-5}$ MeV/canal) associés à l'incertitude sur la fonction d'étalonnage du détecteur. Cette variation a ensuite été ajustée par une loi polynomiale de degré 2 pour déterminer l'épaisseur correspondant à l'écart quadratique minimum. L'ensemble des résultats sont illustrés en **Figure 2.18**.

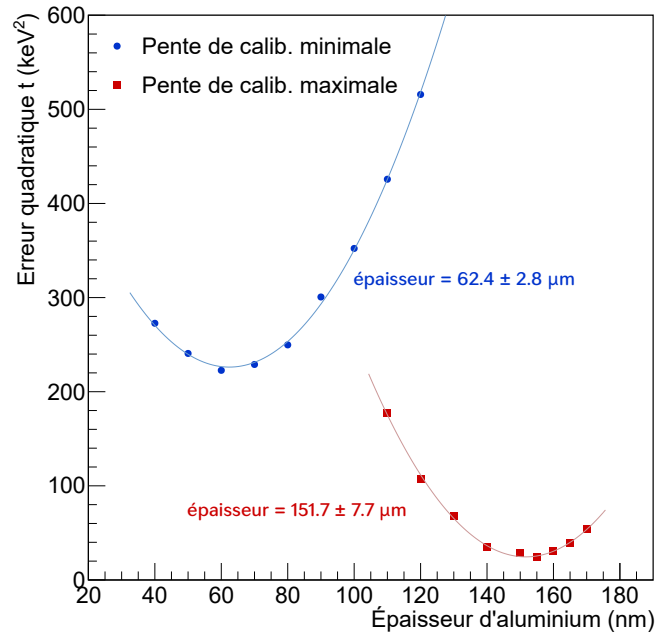


Figure 2.18 – Evaluation de la fonction de test t en fonction de l'épaisseur d'aluminium simulée, pour les deux calibrations extrêmes correspondant aux incertitudes sur la fonction de calibration du détecteur. Les courbes correspondent à un ajustement polynomial, dont le minimum en abscisse est précisé.

Les épaisseurs minimisant l'écart quadratique pour les deux fonctions de calibration extrêmes sont de $(62,4 \pm 2,8)$ nm et de $(151,7 \pm 7,7)$ nm. L'épaisseur de la couche d'aluminium a donc été fixée à 110 nm dans la modélisation du montage expérimental pour les simulations Geant4, afin d'obtenir un compromis entre les résultats associés aux deux calibrations. Bien que l'incertitude sur l'épaisseur de la couche d'aluminium semble large, celui-ci correspond à un décalage en énergie d'environ 15 keV pour des énergies comprises entre 4 et 5 MeV, qui sera donc majoré par la résolution des détecteurs et donc n'est pas limitant pour la simulation du montage expérimental. Ce décalage en énergie est également supérieur à celui correspondant à l'incertitude du mesureur d'épaisseur. Les épaisseurs des feuilles de mylar utilisées n'ont donc été évaluées qu'avec le mesureur.

Enfin, l'intervalle entre les deux valeurs extrêmes d'épaisseur évaluées inclue tout de même les 75 nm annoncés. Bien que cette valeur ne soit pas centrée dans l'intervalle évalué, une incertitude de 50 nm subsiste également sur l'épaisseur de mylar ($6 \mu\text{m}$), qui n'a pas été prise en compte dans cette analyse.

2.6.3 Utilisation du système en incubateur

Les conditions de mesure utilisées pour la caractérisation des détecteurs, en chambre à vide, ne sont pas représentatives des conditions associées aux mesures réalisées en incubateur, notamment concernant la température de l'environnement. Préliminairement aux essais *in vitro*, le système de spectroscopie a donc été testé en incubateur, en l'absence de source. L'objectif

était de vérifier l'étanchéité de l'enceinte et de quantifier une éventuelle augmentation du bruit de fond pour valider le bon fonctionnement du système développé en incubateur.

Le montage réalisé est présenté en **Figure 2.19**. La chambre étanche a été placée dans un incubateur FormaScientific 3111, mis en condition d'expérimentation *in vitro*, avec une atmosphère maintenue à 37 °C et à un taux d'humidité supérieur à 95 %. La face arrière de l'incubateur dispose également d'un passage de câbles de diamètre 3 cm permettant de faire passer les câbles d'alimentation et de transmission nécessaires entre la l'enceinte étanche et le système d'acquisition. L'étanchéité du passage de câble est réalisée à l'aide de joint adhésif en ruban entourant ces derniers et comblant le port d'accès.

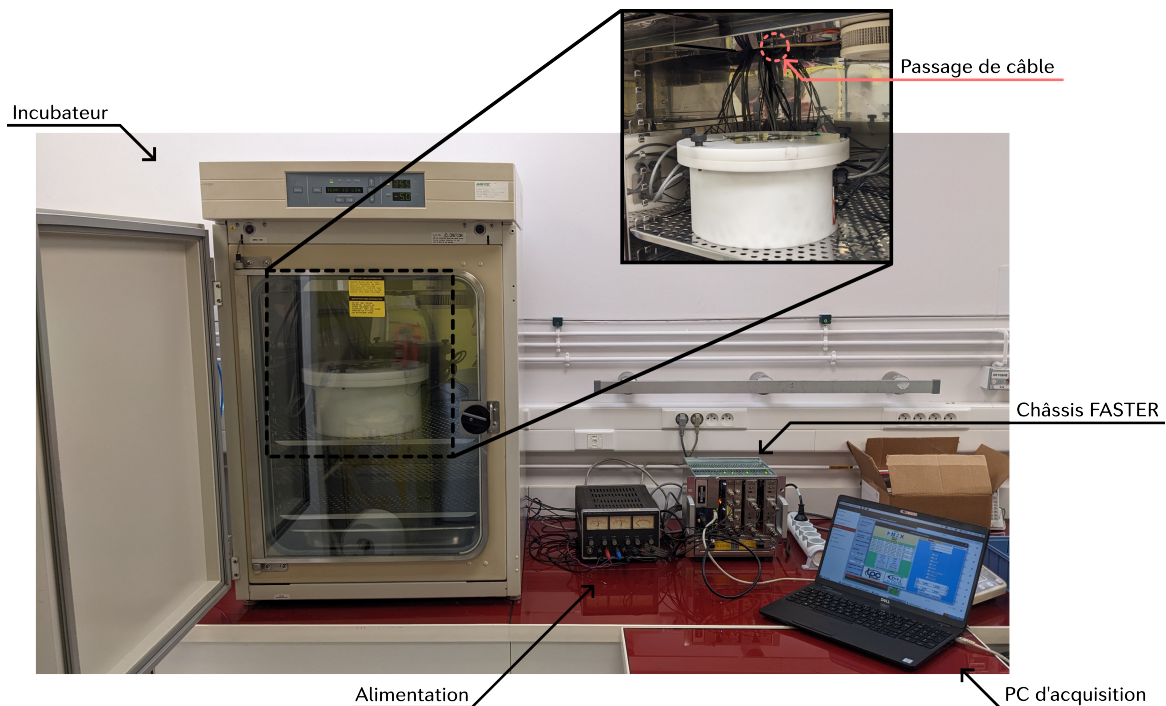


Figure 2.19 – Montage en conditions de mesure *in vitro*. L'encart illustre le cheminement des câbles *via* le passage étanche de l'intérieur de l'incubateur vers l'extérieur, où se trouvent l'alimentation, le châssis FASTER et le PC d'acquisition.

Lors des essais, aucune augmentation significative du niveau de bruit de fond pour les quatre détecteurs n'a été observée sur le signal de détection *fast out*, ce qui montre la possibilité de réaliser les mesures avec les mêmes paramètres d'acquisition que ceux déterminés en chambre à vide, notamment concernant l'amplitude du seuil. Cependant, ces essais ont également montré une forte sensibilité du montage aux problèmes de mise à la masse des différentes composantes de l'électronique, avec l'apparition de signaux de décharge intenses et donc de signal de fond détecté à une fréquence de l'ordre de 10^2 coups par seconde, similaire à la fréquence du signal observé lors des essais *in vitro*. Pour limiter l'apparition de ces signaux fortuits pouvant générer des empilements avec le signal généré par des particules incidentes, une mise à la masse commune de l'alimentation des pré-amplificateurs, du châssis FASTER et de l'incubateur est assurée à l'aide d'une tresse de masse les reliant à la terre.

2.7 Protocole expérimental *in vitro*

La réalisation d'une évaluation dosimétrique en RIV- α nécessite de suivre un protocole incluant la préparation des cellules pour l'irradiation, le choix du radiopharmaceutique ou du radionucléide à injecter dans les puits de culture et de l'activité à injecter, ainsi que la durée de l'irradiation. Ce paragraphe est dédié à la description générale du protocole expérimental

suivi lors des essais *in vitro* réalisés en collaboration avec l'unité ISTCT (*Imagerie et Stratégies Thérapeutiques pour les Cancers et Tissus Cérébraux*, Cyceron) et le Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse au cours de cette thèse.

2.7.1 Préparation et irradiation des cellules

Les essais réalisés dans le cadre de cette thèse utilisent soit des cellules MDA-MB-231-Br, des cellules humaines tumorales du sein, soit des cellules NCI-H2030, des cellules humaines tumorales du poumon, les deux se métastasent préférentiellement dans le cerveau [128, 129]. Ces deux lignées cellulaires sont représentatives des métastases cérébrales destinées à être traitées à l'aide du radiopharmaceutique $^{212}\text{Pb-}\alpha\text{VCAM-1}$ [10, 50]. Dans chacun des puits de culture, les cellules sont déposées en une mono-couche au fond du puits.

Une fois l'immunomarquage réalisé, les cellules sont recouvertes de milieu de culture, constitué d'un mélange de milieu Eagle modifié de Dulbecco, de sérum de veau fétal et de glutamine (voir **Annexe B**), ce qui permet de les maintenir dans les puits de culture sans induire de toxicité liée aux conditions expérimentales. Des puits prêts à être irradiés sont présentés en **Figure 2.20**.



Figure 2.20 – Puits de culture contenant du milieu de culture au fond duquel les cellules se trouvent. La mise en puits des cellules est réalisée pour les deux types de plaques.

Une activité connue du radiopharmaceutique testé (allant de 9,3 kBq à 300 kBq dans le cadre de cette thèse) est alors diluée dans les divers puits par injection à la surface des milieux de culture. Lors d'une irradiation, une des plaques dédiées au système de mesure spectroscopique (à droite sur la **Figure 2.20**) est positionnée sur l'emplacement prévu du couvercle de l'enceinte étanche, placée dans l'incubateur maintenu à 37 °C et à quasi-saturation d'humidité. Des plaques à seize puits (sans mesure de spectroscopie), contenant également des cellules préparées selon les mêmes conditions, servent de cultures témoins. Dès que l'incubateur est refermé, l'acquisition des données spectroscopiques est déclenchée (*cf.* **Section 2.4.2**).

A l'issue de l'irradiation, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution tampon contenant du PFA (paraformaldéhyde). La fixation permet de conserver l'intégrité du milieu cellulaire, et donc de préparer les cellules afin de réaliser des analyses histologiques à la suite de l'irradiation. Dans le cadre de cette étude, les cellules sont immunomarquées à l'aide des marqueurs fluorescents Hoechst33342 et anti- γ -H2AX. Hoechst33342 est une molécule organique se liant préférentiellement à l'ADN des cellules, et γ -H2AX est un histone apparaissant en grande quantité à proximité des cassures double-brin de l'ADN. Les deux marqueurs permettent ainsi de localiser les noyaux cellulaires, et de déterminer le taux de cassure double-brin causé par l'irradiation.

Les cellules sont observées en microscopie bi-photonique afin de quantifier la présence des immunomarqueurs fluorescents préalablement introduits. Un exemple de ces essais d'immunocytochimie est présenté en **Figure 2.21**. Deux plaques de 16 puits ont étéensemencées avec des cellules MDA-MB-231-Br, et une d'entre elles a ensuite été irradiée par rayons X, avec une dose

délivrée aux cellules proche de 8 Gy. Les images montrent une localisation des dommages à l'ADN prononcés dans les cellules irradiées, contre une très faible réponse dans les cellules non-irradiées, ce qui traduit une non-toxicité de l'environnement de culture et donc une validation de l'utilisation des plaques.

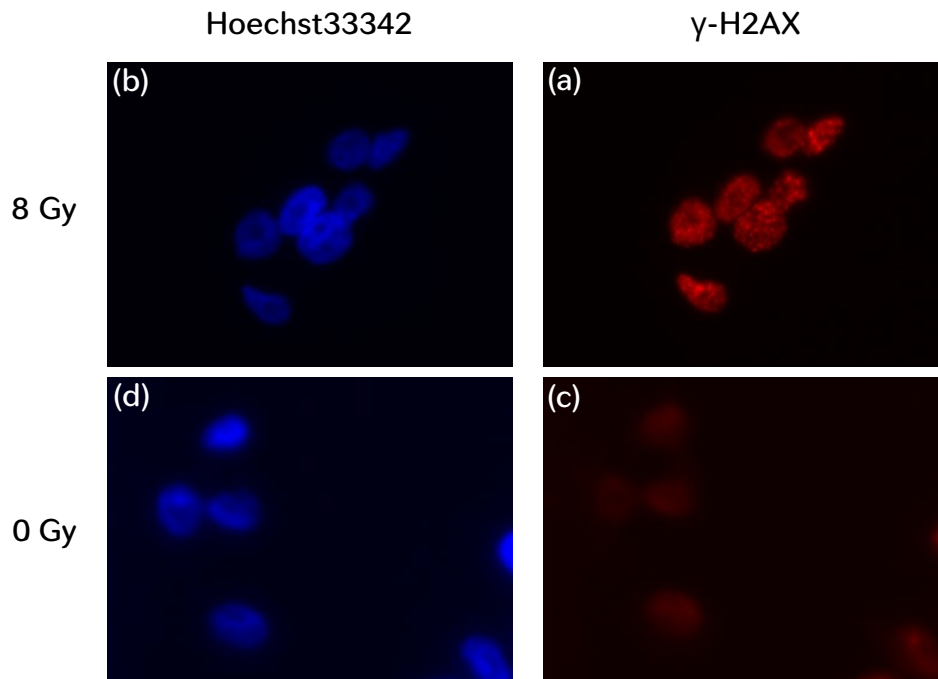


Figure 2.21 – Immunocytochimie de cellules MDA-MB-231-Brensemencées sur les puits de culture adaptés à la spectroscopie. Une des plaques constituant le groupe contrôle n'a pas été irradiée (photos (c) et (d)). Les cellules de l'autre plaque ont reçu une dose de rayons X de 8 Gy (photos (a) et (b)). Le marquage de gauche permet de visualiser les noyaux cellulaires, et celui de droite les cassures double-brin de l'ADN.

2.7.2 Radionucléides étudiés

Comme discuté au **Chapitre 1**, plusieurs radio-isotopes émetteurs α sont aujourd'hui étudiés pour une application en RIV, du fait de leurs spectres en énergie intéressants en terme de portée dans le milieu biologique et de leurs durées de vie compatibles avec une utilisation dans un contexte clinique. Dans ce travail de thèse, l'utilisation de deux de ces radio-isotopes le ^{212}Pb et le ^{223}Ra , a été étudiée.

2.7.2.1 ^{212}Pb

Le ^{212}Pb est la source d'irradiation du radiopharmaceutique ^{212}Pb - $\alpha\text{VCAM-1}$ dont l'étude constitue le contexte de ce projet de recherche. Une représentation simplifiée de son schéma de désintégration est proposée en **Figure 2.22**. Le ^{212}Pb n'est pas lui-même un émetteur α mais décroît par radioactivité β^- vers le ^{212}Bi . Deux voies de décroissance sont disponibles pour le ^{212}Bi , chacune impliquant une décroissance β^- et une décroissance α , vers le ^{208}Pb qui est stable.

Si le ^{212}Bi décroît par désintégration β^- plutôt que par désintégration α , l'émission d'une particule α sera assurée par le ^{212}Po . Ce radionucléide étant caractérisé par une demi-vie de seulement 300 ns, il est justifié de considérer que le ^{212}Bi et le ^{212}Po , à l'origine des émissions α , partagent la même distribution spatiale. Ainsi, comme illustré en **Figure 2.22**, l'ensemble des radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{212}Pb sont considérés comme partageant une distribution spatiale commune.

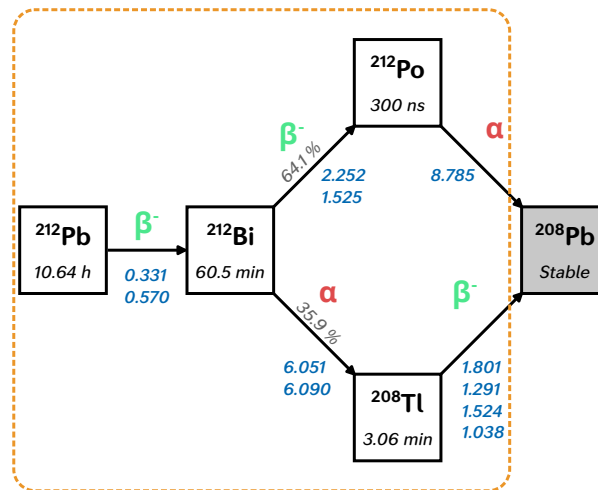


Figure 2.22 – Schéma de décroissance du ^{212}Pb . Sous chaque radionucléide, la durée de demi-vie est indiquée. Les énergies (maximales dans le cas des désintégrations β^-) des émissions principales sont indiquées par ordre de probabilité. Les taux d’embranchement ainsi que le type de désintégration sont indiqués au dessus de la flèche menant vers le radionucléide fils correspondant. Les valeurs indiquées sont extraites de la *Table des Radionucléides* du BIPM [33, 37]. L’encadré pointillé jaune correspond à un groupe de radionucléides dont la position de désintégration est considérée comme partagée en raison de leurs périodes de demi-vies.

2.7.2.2 ^{223}Ra

La majorité des essais réalisés tout au long de cette thèse utilisent du ^{223}Ra , sous sa forme commercialisée *Xofigo* ($\text{Cl}_2^{223}\text{Ra}$). Ce radionucléide est caractérisé par une chaîne de décroissance plus complexe que celle du ^{212}Pb , comprenant quatre paires de désintégrations α et β^- vers le ^{207}Pb , stable. Le schéma de décroissance du ^{223}Ra est représenté en **Figure 2.23**.

Similairement au cas du ^{212}Pb , quatre groupes de radionucléides dont les distributions spatiales sont considérées comme communes ont été identifiés en fonction de leur demi-vie.

2.7.2.3 Portée des émetteurs

Le système de mesure étant dédié à la détection des émissions α , la distribution spatiale des différents radionucléides ne peut pas être évaluée dans la totalité du milieu de culture. Considérons le cas le plus favorable d’une particule α émise depuis le milieu de culture, dont la trace est normale à la surface du détecteur. Pour qu’elle soit détectée, celle-ci doit pouvoir traverser successivement les deux feuilles de mylar, la fine couche d’aluminium, l’épaisseur d’air entre les feuilles de mylar et la surface d’entrée du détecteur, et enfin l’épaisseur morte. En utilisant les portées projetées de la base de données ASTAR du NIST, il est possible d’estimer l’épaisseur de milieu de culture maximale que peut traverser une particule α pour être détectable en fonction de son énergie d’émission, comme représenté en **Figure 2.24**.

Le système de détection est ainsi sensible à une zone très limitée du milieu de culture. Pour la méthode d’analyse spectrale présentée au **Chapitre 3**, la portée de détection significative pour les essais au ^{212}Pb a été définie aux 90 μm les plus au fond des puits, et seulement aux premiers 60 μm pour les essais au ^{223}Ra . Cette zone limitée correspond néanmoins au volume d’émissions auquel seront sensibles les cellules.

2.8 Modélisation Monte-Carlo des essais *in vitro*

Les spectres en énergie acquis par les détecteurs au cours d’essais *in vitro* contiennent l’information sur la distribution spatiale des radionucléides dans les puits de culture. Afin

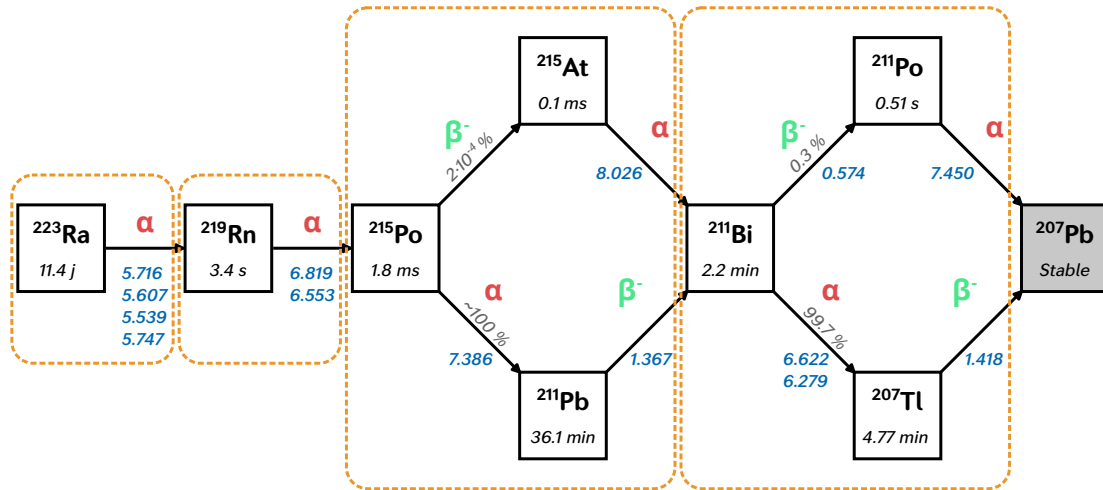


Figure 2.23 – Schéma de décroissance du ^{223}Ra . Sous chaque radionucléide, la durée de demi-vie est indiquée. Les énergies (maximales dans le cas des désintégrations β^-) des émissions principales sont indiquées par ordre de probabilité. Les taux d'embranchement ainsi que le type de désintégration sont indiqués au dessus de la flèche menant vers le radionucléide fils correspondant. Les valeurs indiquées sont extraites de la *Table des Radionucléides* du BIPM [35-37]. Les encadrés pointillés jaunes correspondent aux différents groupes d'émissions α dont la position de désintégration est considérée comme partagée en raison des périodes de demi-vies mises en jeu.

d'extraire cette information, la réponse des détecteurs pour différentes positions d'émission de particules α doit être connue, et utilisée selon une méthodologie présentée en détail au **Chapitre 3**. Ces réponses ont été obtenues à partir de simulations Monte-Carlo du montage spectroscopique. Cette section introduit dans un premier temps la plateforme de simulation Geant4. La construction des simulations pour l'analyse spectroscopique et dosimétrique des essais *in vitro* est ensuite discutée.

2.8.1 Simulations Geant4

L'ensemble des simulations réalisées au cours de cette thèse, et présentées dans ce manuscrit, ont été réalisées avec Geant4 (pour *GEometry ANd Tracking 4*).

Geant4 est un environnement de code développé par le CERN et dédié à la simulation Monte-Carlo de l'interaction et du transport des particules dans la matière [130]. Geant4 se base sur des bibliothèques dans le langage de programmation C++, et permet de construire des simulations, appelées *applications*, selon le formalisme de la programmation orientée objet. L'ensemble des bibliothèques de Geant4 sont open source et peuvent être remplacées par des bibliothèques utilisateurs, ce qui offre une grande souplesse dans la construction d'une application et permet de simuler des particules et d'évaluer des grandeurs d'intérêts selon le besoin de l'utilisateur. Initialement conçue pour la physique des hautes énergies, cette souplesse d'utilisation de Geant4 a permis d'étendre ses applications à de nombreux domaines de la physique tels que la physique des détecteurs [131-133], la physique des accélérateurs [134-136], et en particulier, la physique médicale [137-139].

Le paragraphe suivant décrit les éléments principaux constitutifs d'une simulation avec Geant4, et leur implémentation pour la simulation d'essais *in vitro* utilisant le système de dosimétrie développé dans ce projet.

Une application basée sur Geant4 nécessite de définir trois classes de base qui sont nécessaires à la description de la simulation : la géométrie de simulation (§2.8.2), les processus physiques régissant le transport des particules dans la matière (§2.8.3) et la source de particules à simuler (§2.8.4). Enfin, bien que non obligatoire au fonctionnement d'une simulation, des grandeurs de sortie peuvent être enregistrées au cours ou à l'issue d'une simulation (§2.8.5).

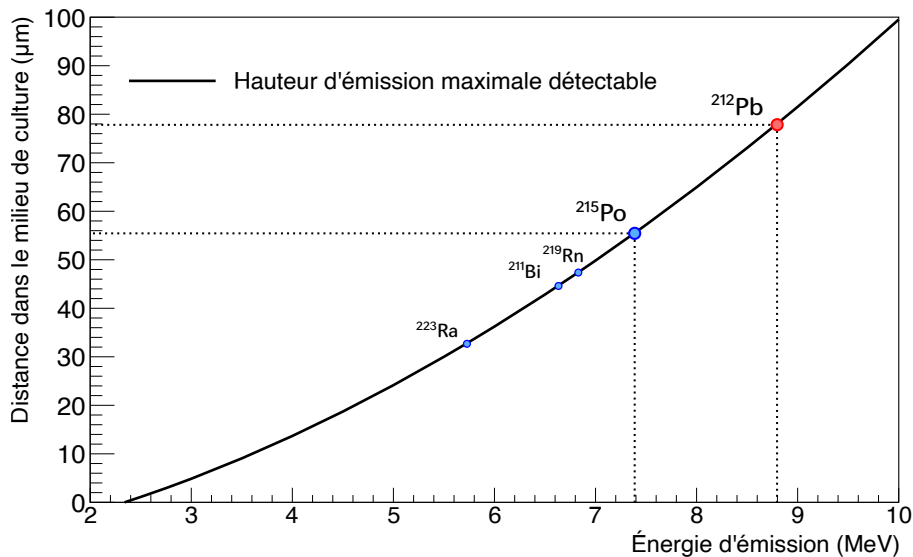


Figure 2.24 – Évaluation des distances maximales d’émission de particules α dans le milieu de culture pouvant significativement contribuer au signal de détection. Pour chacun des groupes de radionucléides des **Figures 2.22** et **2.23**, identifiés par le nom du premier radio-isotope du groupe, l’énergie maximale et la portée sont mentionnées. Les points bleus réfèrent à la chaîne de désintégration du ^{223}Ra , et le point rouge à celle du ^{212}Pb . Pour le groupe du ^{211}Bi , l’émission d’énergie 7,450 MeV est associée à un rapport d’embranchement de 0,3% et n’a donc pas été considérée.

2.8.2 Géométrie de détection

2.8.2.1 Construction des volumes

La classe principale d’une simulation est dédiée à la description de la géométrie du système physique où les particules simulées interagissent. Une géométrie se construit à partir d’un assemblage de volumes élémentaires, dits logiques, dont les propriétés doivent être explicitement définies dans le constructeur de la classe. Ces propriétés incluent la forme des objets, leurs dimensions et les matériaux qui les composent. Les relations hiérarchiques entre les volumes logiques ainsi que leurs positions dans l’espace doivent être précisées pour définir les volumes physiques du détecteur.

La définition de la forme de l’objet et de ses dimensions se base sur la méthode de géométrie construction de solide (CSG, pour *Constructive Solid Geometry* en anglais), à partir d’opérations booléennes sur des formes élémentaires (sphères, ellipsoïdes, parallélépipèdes, ...).

L’attribution d’un matériau à un volume se fait à partir d’une base de données incluse dans Geant4 comprenant les différents atomes ou certains matériaux courants (notamment l’air, l’eau ou le mylar sous les noms respectifs G4_AIR, G4_WATER et G4_MYLAR), dont les compositions se basent sur la base de données du NIST. Ces matériaux élémentaires peuvent servir à la définition de nouveaux matériaux composites, comme le milieu de culture utilisé lors des essais *in vitro* dont la composition est présentée en **Annexe B**. Ils peuvent également être construits avec une autre densité, ce qui est particulièrement pertinent dans le cas de l’air dont la densité est dépendante des conditions de température et d’humidité ($\rho_{\text{air}} = 1,20 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ pour de l’air sec à 20 °C, la référence de Geant4, contre $\rho_{\text{air}} = 1,11 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ pour de l’air saturé en humidité à 37 °C, les conditions en incubateur [140]).

2.8.2.2 Géométrie du système de dosimétrie

La géométrie du montage expérimental simulé comprend un détecteur et le puits de culture auquel il est associé. Cette géométrie est illustrée en **Figure 2.25**, et comprend quatre volumes principaux, introduits dans les points suivants.

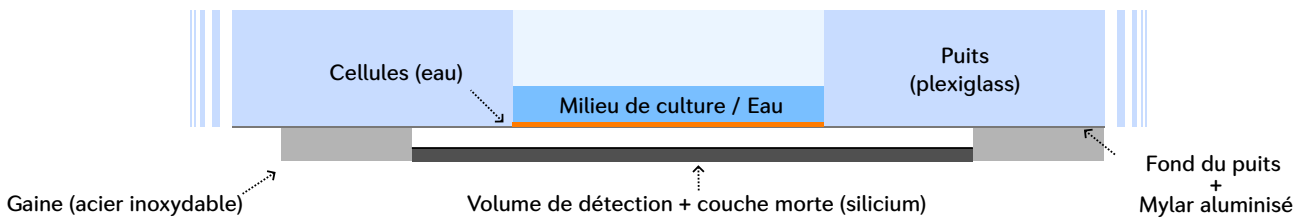


Figure 2.25 – Schéma de la géométrie simulée sous Geant4. Les volumes représentés sur ce schéma ne sont pas à l'échelle par soucis de lisibilité.

Détecteur – Le détecteur semi-conducteur est modélisé par les volumes suivants :

- le volume sensible de silicium, un cylindre de silicium de rayon 17,05 mm et de hauteur 305 μm (cf **Table 2.1**).
- la couche morte en entrée, un cylindre de silicium de rayon 13,82 mm et de hauteur 50 nm, correspondant aux dimensions de la fenêtre d'entrée réelle des détecteurs mentionnée en **Table 2.1**.
- un anneau au contact de la fenêtre d'entrée en acier inoxydable, dont le rayon extérieur est de 18,05 mm, le diamètre réel du détecteur, et de hauteur 1 mm. La simulation d'un anneau similaire autour du volume sensible n'a aucun impact sur les simulations, du fait des courts parcours des particules α dans le silicium.

Puits de culture – Le puits de culture est constitué des volumes suivants :

- un cylindre creux en plexiglass, de diamètre intérieur 15 mm et de diamètre extérieur très large, 60 mm pour couvrir les possibilités de production de particules secondaires dans la plaque. Ce cylindre creux est en réalité divisé en deux cylindres imbriqués. Dans le cylindre intérieur, d'épaisseur 100 μm , les interactions des particules avec la matière sont simulées avec plus de précision (voir **Section 2.8.3.2**).
- trois cylindres pleins de diamètre 60 mm placés directement sous le puits, avec successivement un volume de mylar de hauteur 2,5 μm représentant la feuille collée à l'arrière des plaques, un volume d'aluminium de hauteur 110 nm pour modéliser la partie aluminisée de la feuille à l'interface entre les puits et le détecteur, et enfin un volume de hauteur 6 μm représentant cette feuille. L'ensemble des trois feuilles est simulé en contact, avec la feuille supérieure simulée au contact du puits et du milieu de culture, et la feuille inférieure au contact de la gaine entourant la surface d'entrée du détecteur. Une hauteur de 1 mm d'air sépare donc la surface d'entrée des détecteurs de la feuille de mylar la plus inférieure. Selon la condition de mesure, la densité de l'air du matériau G4_AIR a été modifiée pour correspondre à une température ambiante de 37 °C et un taux d'humidité de 95 %, à pression atmosphérique ($\rho_{\text{air}} = 1,11 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), ou bien à un air sec à 20 °C ($\rho_{\text{air}} = 1,20 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) [140].

Un décalage de 4,2 mm a également été introduit entre l'axe du puits et l'axe du détecteur, afin de correspondre à l'espacement expérimental entre les puits et les détecteurs. Ce décalage a également été représenté sur le schéma de la **Figure 2.25**.

Milieu de culture – Le milieu de culture est représenté par un volume comblant le cylindre creux des puits de culture, sur une hauteur de 2 mm. Il peut être composé soit d'eau, soit de milieu de culture dont la composition est décrite en **Annexe B**. Similairement aux puits de culture, le milieu de culture est séparé en deux sous-volumes pour améliorer la précision des simulations à proximité des cellules.

Cellules – Les cellules sont représentées par des demi-ellipsoïdes de dimensions variables, constituées d'eau. Les cellules sont distribuées régulièrement au fond du puits, au contact de la couche de mylar supérieure, à l'aide de l'algorithme de positionnement *sunflower head*, illustré en **Figure 2.26** [141]. Les cellules comportent également chacune un sous-volume représentant le noyau, placé au même endroit pour l'ensemble des cellules. Cette modélisation sera discutée plus en détail au **Chapitre 4**.

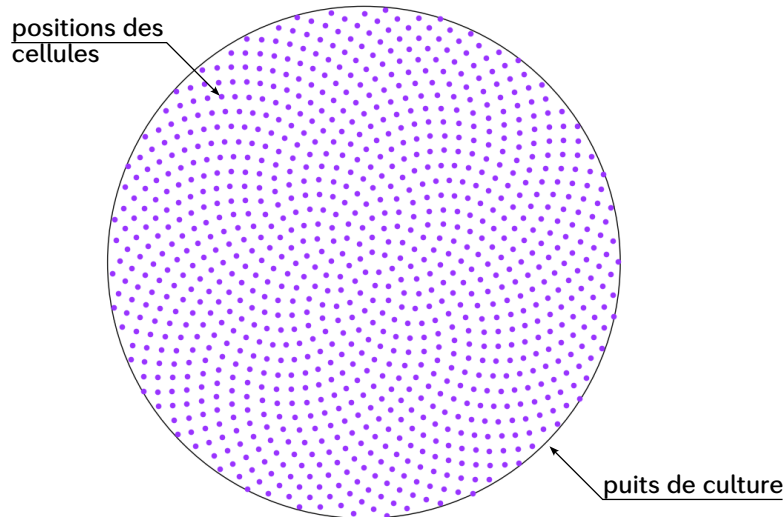


Figure 2.26 – Positionnement de 1000 cellules dans le puits de culture à l'aide de l'algorithme *sunflower head* [141].

2.8.3 Simulation de processus physiques

2.8.3.1 Listes de processus physiques

La simulation Monte-Carlo de l'interaction des particules avec la matière par Geant4 nécessite de préciser quels phénomènes physiques sont à simuler, et avec quelle précision. Bien que Geant4 permette de définir librement la liste des processus physiques à appliquer, les années d'utilisation de cette plateforme ont mené au développement de listes standardisées, appelées *physics lists*. Ces listes incluent la simulation de processus d'interaction électromagnétiques (principales dans le cadre de simulations dosimétriques), mais aussi hadroniques (permettant de décrire les interactions nucléaires des particules α avec la matière). Les décroissances radioactives de radio-isotopes peuvent également être simulées si la liste sélectionnée l'inclut.

Dans l'ensemble des simulations réalisées et présentées dans cette thèse, la liste de processus de physique QGSP_BIC_HP_EMZ, recommandée et couramment employée pour les simulations dosimétriques, a été utilisée [142, 143]. Les deux premières parties de l'acronyme, QGSP et BIC, font référence au transport des hadrons de hautes et moyenne énergie, et n'interviennent pas significativement dans la simulation des traces. L'acronyme HP, qui signifie *High Precision*, inclut des modèles dédiés au transport de neutrons de moins de 20 MeV. Couplée aux modèles QGSP et BIC, cette description hadronique permet également de simuler la décroissance radioactive de radio-isotopes à partir d'une base de données de voies de désintégrations, ainsi que les désexcitations électroniques qui s'en suivent. Enfin, EMZ contient l'ensemble des processus électromagnétiques (diffusions élastiques et inélastiques, rayonnement de freinage et ionisation) nécessaires à la simulation des traces des particules chargées et des ions dans les énergies impliquées dans la dosimétrie des particules α .

2.8.3.2 Choix des *cuts* pour la simulation du système dosimétrique

Les listes physiques définissent par défaut des valeurs seuils d'énergie pour les différentes particules simulées ou créées par interaction. Ces seuils, appelés *cuts* en énergie, sont définis en unité de longueur et correspondent à la longueur minimale que doit pouvoir parcourir une particule avant de perdre toute son énergie cinétique. Les valeurs de *cuts* impactent uniquement la production ou non de particules secondaires, la trace de toute particule créée étant simulée jusqu'à thermalisation ou annihilation. Les *cuts* sont réglables globalement, ou individuellement pour certains types de particules ainsi que selon le volume logique dans lequel la particule se trouve.

Pour optimiser le temps de calcul des simulations, le choix des *cuts* en énergie de production doit être approprié selon le volume traversé par la particule incidente. Dans l'ensemble du volume de simulation, le seuil de production des particules secondaires a été fixé à 20 μm , ce qui correspond à une dimension caractéristique des cellules. Ces seuils ont été réduits à proximité des cellules afin d'améliorer la précision des simulations des doses délivrées au milieu cellulaire.

Le milieu de culture a ainsi été divisé en deux sous-volumes. Dans les 50 μm les plus proches du fond du puits, le seuil de production des particules secondaires a été réduit à 1 μm . D'une façon similaire, comme mentionné au paragraphe 2.8.2.2, le volume représentant la plaque a été divisé en deux sous-volumes, les 100 μm de plexiglass les plus proches du puit de culture se voyant associés à un *cut* de 1 μm pour mieux simuler la trace des particules interagissant dans la plaque. Enfin, le même seuil a été utilisé dans les volumes associés aux cellules, toujours pour renforcer la précision des traces simulées.

2.8.4 Description d'une source de particules

Geant4 propose également une liberté importante sur la construction de la source. Une source est définie par un type de particule, une position dans l'espace de simulation, et une distribution en énergie et en direction d'émission entièrement ajustables à l'aide d'histogrammes. Une simulation peut contenir plusieurs sources dont les intensités relatives peuvent être spécifiées. Une simulation Geant4 repose sur la notion d'évènements, qui correspond à la simulation d'une particule primaire. Au début de chaque évènement, une particule dont les propriétés sont tirées au hasard selon les caractéristiques des sources définies est générée, et sa trajectoire ainsi que celles de toutes ses particules secondaires qu'elle a générées sont simulées jusqu'à ce qu'elles quittent le volume de simulation.

En utilisant la liste de processus physiques QGSP_BIC_HP_EMZ, la source simulée peut également être un radionucléide. Dans certaines des simulations présentées dans ce manuscrit, cette fonctionnalité est utilisée, notamment pour simuler le spectre d'émission β de certains radionucléides mais aussi les particules (en particulier les électrons Auger) issues de la désexcitation du noyau fils. Cette simulation étant relativement lente, l'utilisation d'histogramme de distributions de probabilité d'énergie d'émission α peut être préférée si seules les particules α doivent être simulées, comme c'est le cas dans le **Chapitre 3**.

2.8.5 Enregistrement de grandeurs d'intérêt

Bien qu'une simulation Geant4 ne nécessite de définir que la géométrie, la physique et la source de particules, l'intérêt des simulations réside généralement dans l'évaluation de grandeurs d'intérêts.

Pour l'évaluation de ces grandeurs, Geant4 propose deux structures de classes, les *Hits* et les *Sensitive Detector*. La classe *Sensitive Detector* est associée à un ou plusieurs volumes logiques. Lorsqu'une particule interagit dans un de ces volumes, la classe *Hits* correspondante est appelée et permet d'enregistrer les grandeurs spécifiées le long de la trace (lieu ou instant d'interaction, énergie déposée, énergie de la particule...).

Pour les cas les plus simples, Geant4 intègre une classe dérivée des détecteurs appelée *PrimitiveScorer*, qui ne permet généralement d'enregistrer qu'une seule quantité. Un tel type de détecteur, qui n'enregistre que l'énergie déposée, a été utilisé dans le cas de la simulation des spectres en énergie mesurés par les cristaux de silicium.

Pour la mesure de la dose aux cellules, afin de pouvoir enregistrer plus de grandeurs utiles à la dosimétrie et à la microdosimétrie, une classe dédiée de mesure a été conçue. Cette classe mesure, pour chaque interaction dans une cellule :

- un nombre entier identifiant la cellule où l'interaction s'est produite,
- l'énergie déposée dans la cellule,
- la dose délivrée à la cellule,
- l'énergie déposée dans le noyau,
- la dose délivrée dans le noyau.

A chaque étape du parcours d'une particule dans une cellule, ces cinq grandeurs sont enregistrées dans un tuple qui est ensuite enregistré dans un fichier *root*. Ces données sont également exploitées pour reconstruire d'autres grandeurs d'intérêts en dosimétrie et microdosimétrie, comme la dose moyenne par désintégration et la dose moyenne par émission atteignant la cible. Ces grandeurs sont utilisées et discutées au **Chapitre 4**.

2.9 Conclusions

Ce chapitre décrit le système expérimental développé et utilisé pour réaliser la spectroscopie en énergie des émissions α lors des essais *in vitro*. L'analyse de la distribution spatiale et en particulier de l'accumulation de l'activité au fond des puits de culture, à proximité des cellules, nécessite d'utiliser des détecteurs caractérisés par une excellente efficacité de détection et une bonne résolution en énergie. Ce détecteur doit également pouvoir se positionner à proximité des cellules, qui ont besoin d'être maintenues aux conditions atmosphériques particulières de l'incubateur. Pour ces raisons, les détecteurs à semi-conducteurs en silicium ont été choisis pour la dosimétrie des émissions α lors des essais *in vitro de la RIV*.

La proximité des détecteurs avec le milieu de culture tout en isolant l'électronique de détection de l'humidité présente dans l'incubateur a été permise grâce à la conception de puits de culture à fond mince en mylar, ainsi que d'une enceinte étanche utilisant également une feuille de mylar fine comme interface entre les détecteurs et le fond des puits. L'étanchéité de la boîte tout comme la compatibilité des puits de culture avec la culture cellulaires ont été testées et validées expérimentalement.

Le système de détection, qui utilise des préamplificateurs positionnés dans la boîte étanche reliés à l'électronique FASTER, a été caractérisé. Pour le temps de mise en forme sélectionné, les quatre détecteurs ont une résolution en énergie inférieure à 35 keV pour une particule α de 5,5 MeV, ce qui correspond à une résolution spatiale sub-micrométrique sur le parcours des particules α de même énergie dans l'eau.

Enfin, une partie du montage, représentative de l'environnement du milieu cellulaire, a été modélisée sous le code de simulation Geant4, ce qui permettra comme illustré dans le chapitre suivant de caractériser la relation entre la réponse en énergie des détecteurs avec la distribution spatiale des radionucléides dans le milieu de culture (**Chapitre 3**). Ces simulations permettront également d'évaluer la dose déposée aux cellules lors d'essais *in vitro* à partir des différentes distributions spatiales évaluées au cours de l'irradiation (**Chapitre 4**).

3 | Détermination de la distribution spatiale des radionucléides

Sommaire du chapitre

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1 | Algorithme de déconvolution matricielle | 70 |
| 3.1.1 | Conventions et notations | 70 |
| 3.1.2 | Mise en équation du problème | 71 |
| 3.1.3 | Minimisation selon les moindres carrés non-négatifs | 75 |
| 3.1.4 | Optimisation à l'aide de l'algorithme de maximisation de vraisemblance | 76 |
| 3.1.5 | Contraintes physiques et expérimentales | 78 |
| 3.1.6 | Évaluation des incertitudes | 83 |
| 3.2 | Validation de l'algorithme de déconvolution matricielle | 85 |
| 3.2.1 | Simulation d'essais <i>in vitro</i> | 85 |
| 3.2.2 | Validation pour les essais simulés au ^{212}Pb | 89 |
| 3.2.3 | Validation pour les essais simulés au ^{223}Ra | 94 |
| 3.3 | Conclusions | 96 |

La méthodologie décrite au chapitre précédent permet l'acquisition de spectres en énergie des émissions α dont l'allure est fortement corrélée à la distribution spatiale des radionucléides dans le puits de culture au cours de l'irradiation. Cette corrélation entre spectre en énergie et distribution spatiale nécessite la création d'une méthode de déconvolution spectrale. Une telle méthode avait été développée en amont de cette thèse, et se basait sur un ajustement paramétrique de la distribution spatiale des radionucléides[78]. Cette méthode souffrait cependant de deux défauts majeurs : le temps de calcul nécessaire à la déconvolution des spectres acquis au cours d'une irradiation empêchaient la réalisation d'une dosimétrie *en ligne*, et le modèle paramétrique était particulièrement restrictif sur les distributions reconstituables. De plus, la méthode précédente n'a été appliquée qu'à la chaîne de décroissance du ^{212}Pb , qui est relativement simple contrairement à celles d'autres radiopharmaceutiques à l'étude ou utilisés en cliniques tels que l' ^{225}Ac ou le ^{223}Ra . Enfin, la justesse de la reconstruction de la distribution spatiale ainsi que les potentiels impacts sur la dosimétrie de cette méthode n'ont pas été évalués.

Afin de pallier à ces limitations, une majeure partie de ce travail de thèse a été consacrée au développement et à l'évaluation d'une nouvelle méthode de déconvolution spectrale pour l'estimation de la distribution spatiale des radionucléides au cours des irradiations *in vitro*. Ce chapitre décrit dans un premier temps la construction de cette méthode, fondée sur la décomposition des spectres acquis sur une base de spectres élémentaires à l'aide d'une méthode d'optimisation matricielle. La seconde partie de ce chapitre porte quant à elle sur la validation de cette méthode, en discutant ses performances et ses limites, en ré-étudiant le cas de départ du ^{212}Pb ainsi que le cas de la chaîne de décroissance plus complexe du ^{223}Ra .

3.1 Algorithme de déconvolution matricielle

Le TEL des particules α dans l'eau et l'air étant relativement élevé ($58,8 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ pour une particule α de $8,8 \text{ MeV}$ dans l'eau), un spectre en énergie des particules α mesuré par le détecteur aura une allure plus complexe que celle du spectre d'émission des radionucléides présents dans le milieu de culture. L'énergie d'une particule α lors de son entrée dans le détecteur dépend à la fois de son énergie initiale lors de la désintégration du radio-isotope, mais aussi de la quantité de matière traversée avant d'atteindre le détecteur. Comme montré en **Figure 3.1**, le spectre en énergie des particules α atteignant le détecteur est donc un spectre continu, contrairement au spectre en énergie d'émission qui est discret. Différentes distributions spatiales des radio-isotopes émetteurs α vont donc être associées à différentes distributions de probabilité de l'énergie détectée, et donc à différentes allures de spectres. La méthode présentée dans ce chapitre consiste à décomposer les spectres mesurés sur une base de spectres élémentaires correspondant à différentes positions d'émission dans le puits de culture.

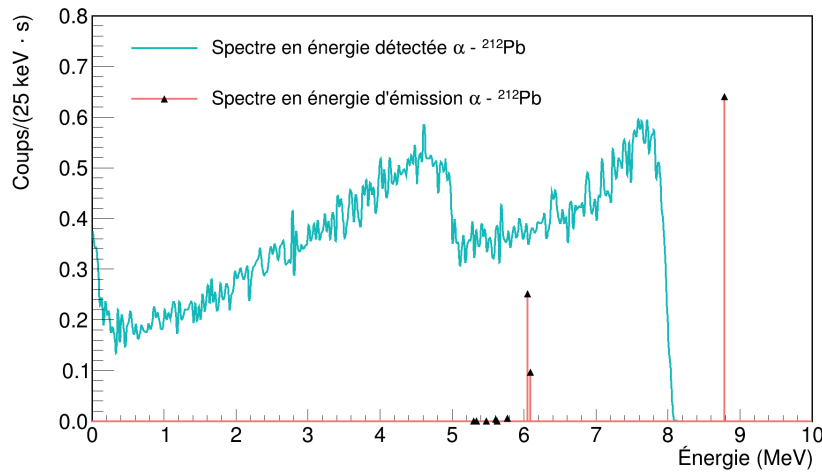


Figure 3.1 – Comparaison entre le spectre d'émission en énergie α de la décroissance du ^{212}Pb et un spectre mesuré au cours d'une irradiation selon la géométrie de détection décrite dans le **Chapitre 2**.

3.1.1 Conventions et notations

Dans la suite de ce manuscrit, qui fait intervenir des notations scalaires et matricielles, les notations suivantes seront utilisées :

- les scalaires seront notés en police normale, majuscule ou minuscule : s
- les vecteurs seront notés en gras, désignés par une lettre minuscule : \mathbf{v}
- les matrices seront notées en gras, désignées par une lettre majuscule : \mathbf{M}
- la transposée d'une matrice \mathbf{M} ou d'un vecteur \mathbf{v} est désignée par : \mathbf{M}^T ou \mathbf{v}^T
- le i -ème élément d'un vecteur \mathbf{v} est noté : v_i
- l'élément en i -ème ligne et j -ème colonne d'une matrice \mathbf{M} est noté : $M_{i,j}$
- soit $P = \{p_1, p_2, \dots\}$ une liste d'indices. Si \mathbf{M} est une matrice carrée, la matrice \mathbf{M} restreinte à P est notée \mathbf{M}^P . Elle est composée uniquement des lignes et colonnes de \mathbf{M} dont les indices sont inclus dans P . Le vecteur \mathbf{v}^P désigne similairement le vecteur \mathbf{v} restreint à P , et est composé des éléments de \mathbf{v} dont les indices sont inclus dans P .
- Dans un processus itératif, la n -ième évaluation d'un vecteur \mathbf{v} (respectivement d'une matrice \mathbf{M}) est désignée par : $\mathbf{v}_{(n)}$ (resp. $\mathbf{M}_{(n)}$)

- Soit \mathbf{D} une matrice diagonale, $\frac{1}{\mathbf{D}}$ désigne son inverse \mathbf{D}^{-1} .
- $\mathbf{V} = \text{diag}(\mathbf{v})$ est une matrice diagonale constituée des éléments de \mathbf{v} .
- soit \mathbf{x} un vecteur de variables aléatoires. $E(\mathbf{x})$ désigne le vecteur composé des espérances des différentes variables aléatoires contenues dans \mathbf{x} .

3.1.2 Mise en équation du problème

La géométrie de détection est telle que le détecteur se trouve sous le puits de culture. Le diamètre des détecteurs est par ailleurs près de deux fois supérieur à celui des puits de culture (27,64 mm contre 15 mm). De ce fait, la coordonnée selon l'axe vertical du lieu d'émission a un impact bien plus important sur l'énergie qui sera mesurée par le détecteur que la coordonnée radiale. La distribution spatiale des radionucléides a donc été considérée ici comme uniquement dépendante de la hauteur z séparant le lieu de la désintégration du fond en mylar du puits de culture, et fait l'hypothèse d'une distribution radiale homogène. Le milieu de culture a ainsi été divisé selon l'axe vertical en cylindres, dont le nombre est noté n_c , chacun d'entre eux ayant le même rayon que le puits et étant caractérisé par une distance au fond du puits z_i et une hauteur h_i . i désigne ici l'indice du cylindre, l'indice 1 correspondant au cylindre en contact avec le fond du puits et l'indice n_c au cylindre intégrant le sommet du milieu de culture (voir **Figure 3.2**). Dans chacun de ces cylindres, une hypothèse d'activité homogène est faite. La pertinence de cette discrétisation du milieu de culture a été vérifiée lors d'évaluations de la cinétique de la distribution d'activité spatiale du ^{212}Pb réalisés préliminairement à cette thèse [78]. L'atténuation en énergie des particules α avant d'atteindre le détecteur est un phénomène stochastique, et une désintégration se produisant dans un des cylindres génèrera un signal descriptible par une distribution de probabilité. Cette distribution correspond au signal moyen observé par désintégration.

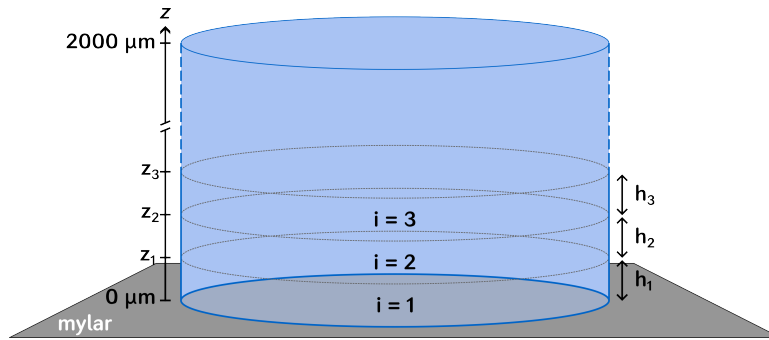


Figure 3.2 – Schéma descriptif de la discrétisation du puits de culture et des notations employées pour la déconvolution.

Le choix de la dimension des cylindres est quant à lui dépendant de deux facteurs. Premièrement, les cylindres les plus proches du fond du puits sont caractérisés par une atténuation en énergie moyenne plus faible ainsi qu'une probabilité de génération de signal dans le détecteur plus élevée du fait d'une plus grande efficacité géométrique de détection. Ainsi, la majorité de l'information spectrale sera donnée par les émissions ayant lieu à proximité du fond du puits. En second lieu, dans la géométrie que nous considérons, les cellules se trouvent en monocouche au fond du puits, et les émissions ayant lieu à proximité contribuent donc en plus grande partie à la dose délivrée. Ces aspects ont motivé le choix d'attribuer des hauteurs variables aux différents cylindres, ceux-ci devant être plus petits à proximité du fond du puits pour mieux décrire le signal ainsi que pour mieux estimer la dose délivrée aux cellules.

En suivant le schéma de discrétisation établi, des simulations Monte-Carlo à l'aide de Geant4 ont été réalisées pour déterminer les spectres en énergie moyen par désintégration du

radionucléide considéré (les émetteurs α des chaînes de décroissance du ^{212}Pb et du ^{223}Ra dans le cadre de ce travail) pour chacun des cylindres. Les contributions des émissions β sont détectées à basse énergie ($<1\text{ MeV}$). Elles se confondent au signal des particules α arrivant avec une énergie faible. L'efficacité de détection de ces particules est particulièrement sensible, dans les simulations, à la modélisation de la géométrie de détection, qui influe fortement sur la forme des spectres moyens simulés dans la gamme d'énergie entre 0 et 1 MeV. Pour s'en affranchir, seules les émissions α des radionucléides ont été simulées, et le processus d'analyse des spectres utilise un seuil minimum en énergie autour de 1 MeV. Le nombre de particules simulées dans chacun des cylindres est également progressivement augmenté avec la position verticale du cylindre pour prendre en compte les effets géométriques et d'atténuation en énergie.

Ces contributions moyennes en fonction de l'altitude d'émission dans le puits de culture ont ici été évaluées pour deux radionucléides, le ^{212}Pb et le ^{223}Ra . Comme expliqué au **Chapitre 2**, la chaîne de décroissance du ^{223}Ra contient quatre groupes d'émissions α distincts. Cette séparation se justifie par la présence de faibles taux d'embranchement et de demi-vies significatives séparant clairement les principaux émetteurs des différents groupes. Pour chacun de ces groupes d'émissions, une base de spectres élémentaires a été simulée. Les paramètres de simulation pour la construction des bases de déconvolution pour ces deux radionucléides sont présentés en **Table 3.1**, et représentés schématiquement pour le ^{212}Pb en **Figure 3.3**. Du fait du faible parcours des émissions α , aucune information sur la distribution spatiale des radio-isotopes ne peut être obtenue au delà d'une certaine hauteur dans le puits de culture. Le schéma de discrétisation comporte un cylindre incluant la fin de parcours des émissions α et se prolongeant jusqu'au sommet du puits (entre $90\ \mu\text{m}$ et 2 mm dans le cas du ^{212}Pb). Dans ce volume, par manque d'information, une distribution homogène du radio-isotope est supposée.

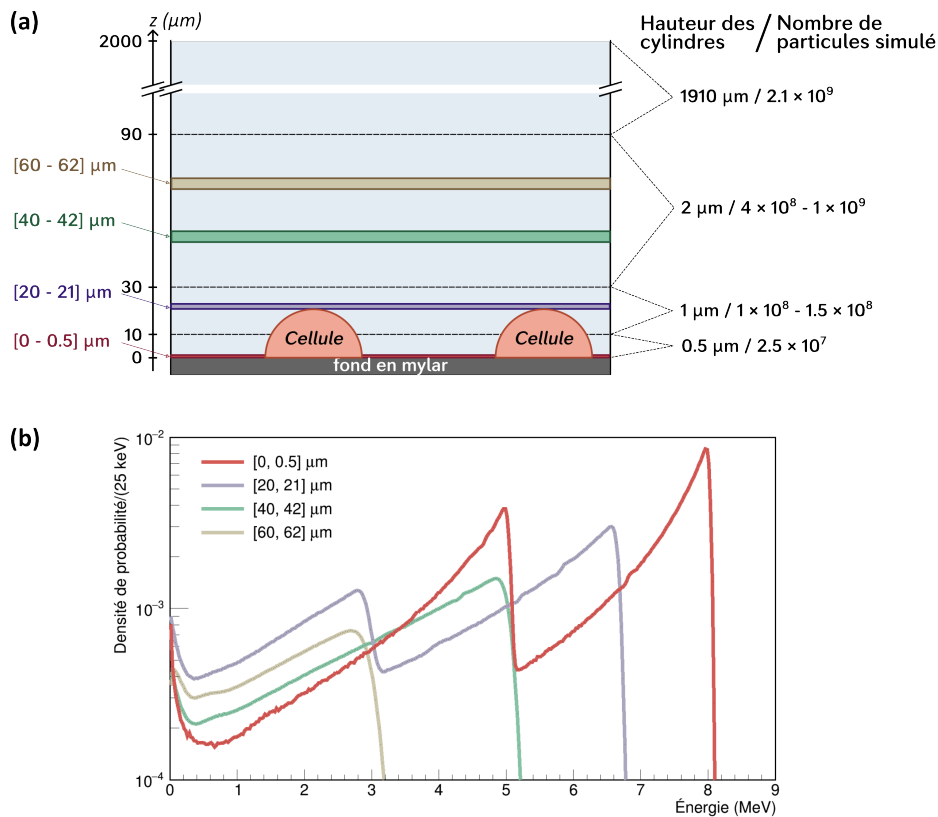


Figure 3.3 – (a) Schéma descriptif de la discrétisation du puits de culture. À droite du puits sont indiqués la hauteur des cylindres ainsi que le nombre de particules simulées. (b) Quatre des spectres de la base de déconvolution du ^{212}Pb simulés pour les cylindres de même couleur dans le schéma (a). La légende indique les hauteurs minimales et maximales pour lesquelles des émissions α ont été simulées dans chacun des cylindres.

Tableau 3.1 – Conditions de simulation des spectres élémentaires pour la déconvolution des spectres obtenus par irradiation au ^{212}Pb et au ^{223}Ra .

| Radionucléide | Groupes d'émissions α | Distance au mylar (z_i) | Hauteur des cylindres (h_i) | Nombre de particules simulées | Nombre de spectres élémentaires (n_c) |
|-------------------|--|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| ^{212}Pb | $^{212}\text{Bi} + ^{212}\text{Po}$ | 0 - 10 μm | 0,5 μm | $2.5 \cdot 10^7$ | 71 |
| | | 10 - 30 μm | 1 μm | $1 \cdot 10^8 - 1.5 \cdot 10^8$ | |
| | | 30 - 90 μm | 2 μm | $4 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$ | |
| | | 90 - 2000 μm | 1910 μm | $2.1 \cdot 10^9$ | |
| ^{223}Ra | ^{223}Ra ^{219}Rn $^{215}\text{Po} + ^{215}\text{At}$ $^{211}\text{Bi} + ^{211}\text{Po}$ | 0 - 10 μm | 0,5 μm | $2.5 \cdot 10^7$ | 224 |
| | | 10 - 30 μm | 1 μm | $1 \cdot 10^8 - 1.5 \cdot 10^8$ | |
| | | 30 - 60 μm | 2 μm | $4 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$ | |
| | | 60 - 2000 μm | 1940 μm | $2.1 \cdot 10^9$ | |

Chaque spectre simulé est finalement normalisé au nombre de particules simulées par unité de hauteur afin de constituer une base de spectres élémentaires dénotée $SP_X(z_i, E)$, illustrée en **Figure 3.3b**, qui comprend les différentes distributions de probabilité en énergie de détecter un évènement par désintégration, en $\alpha \cdot \mu\text{m} \cdot \text{Bq}^{-1}$. Notons ensuite $SP_Y(E)$ un spectre mesuré, auquel à chaque intervalle en énergie est associé un nombre de coups. Alors, en introduisant $\{\tilde{A}_l(z_i)\}$ la distribution des activités linéiques intégrées (en $\text{Bq} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) sur la durée d'acquisition de $SP_Y(E)$, réaliser une décomposition de la mesure sur la base des spectres élémentaires revient à décrire le spectre mesuré selon l'équation :

$$SP_Y(E) = \sum_{i=1}^{n_c} \tilde{A}_l(z_i) \cdot SP_X(z_i, E) + \epsilon(E) \quad (3.1)$$

L'objectif est ici de déterminer la distribution d'activités $\{\tilde{A}_l(z_i)\}$ constituant la solution optimale de cette équation. Le terme $\epsilon(E)$ représente ici les erreurs faites par le modèle pour chaque intervalle en énergie. Nous distinguerons ici deux sources d'erreurs : une erreur aléatoire $\epsilon_A(E)$ liée aux fluctuations statistiques des nombres de coups mesurés aux différentes énergies due à l'intégration des spectres sur une durée finie, et une erreur systématique $\epsilon_S(E)$ liée à un mauvais choix de modèle ou à des sources d'erreur dans l'ajustement, telles qu'une mauvaise calibration, ou une discrétisation spatiale insuffisante. Une solution est dite optimale si elle vérifie $\epsilon(E) = \epsilon_A(E)$.

L'**Équation 3.1** peut aussi se mettre sous une forme matricielle, plus synthétique :

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{a} + \boldsymbol{\epsilon} \quad (3.2)$$

où \mathbf{y} est le vecteur constitué des nombres de coups mesurés dans chacun des n_e intervalles en énergie, $\mathbf{X} = [SP_X(z_i, E)]$ la matrice dont les colonnes sont constituées des spectres simulés de la base de déconvolution, de mêmes dimensions que le vecteur \mathbf{y} , \mathbf{a} le vecteur des activités linéiques intégrées en fonction de l'altitude et $\boldsymbol{\epsilon}$ le vecteur des erreurs d'ajustement. La résolution de cette équation pour \mathbf{a} se fait alors selon une fonction de minimisation :

$$\mathbf{a}_{\text{sol}} = f(\mathbf{a}, \mathbf{X}, \mathbf{y}) \quad (3.3)$$

Le choix de cette fonction de minimisation est critique pour résoudre adéquatement le problème. Une fonction de minimisation idéale permet de vérifier $\boldsymbol{\epsilon} = \boldsymbol{\epsilon}_A$. Si certaines composantes

du vecteur erreur ont une espérance supérieure à celle des erreurs aléatoires, alors la minimisation est sujette à du sous-ajustement. Si au contraire certaines composantes du vecteur erreur ont une espérance inférieure à celle des erreurs aléatoires, on parle alors de sur-ajustement.

Une fonction de minimisation classique consiste en une résolution selon le critère des moindres carrés (LS, pour *least squares* en anglais) :

$$\mathbf{a}_{LS} = \min_{\mathbf{a}} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2 = \min \sum_{i=1}^{n_e} \left(\left[\sum_{j=1}^{n_c} a_j \cdot X_{i,j} \right] - y_i \right)^2 \quad (3.4)$$

Cette fonction de minimisation ne fait cependant que peu d'hypothèses sur la nature des vecteurs \mathbf{a} et \mathbf{y} , ce qui la rend peu adaptée à de nombreux problèmes de minimisation. Premièrement, elle considère que l'ensemble des composantes du vecteur \mathbf{y} sont des variables aléatoires suivant une distribution de Gauss de même écart-type, ce qui n'est pas le cas en spectroscopie comme mentionné plus en détail plus loin, dans le paragraphe 3.1.4. De plus, elle est particulièrement sujette aux phénomènes de sur-ajustement lorsque le nombre de composantes de \mathbf{a} (égal au nombre de spectres élémentaires), égal au nombre de degrés de liberté de la minimisation, est du même ordre de grandeur que le nombre d'intervalles en énergie de \mathbf{y} . L'objectif était donc ici de diminuer le sur-ajustement de cette minimisation en la soumettant à un ensemble de contraintes physiques détaillé dans les paragraphes 3.1.3 à 3.1.5. Enfin, il convient de noter que cette méthode de minimisation ne fait aucune hypothèse sur la forme de la solution \mathbf{a}_{LS} , qui peut par exemple comprendre des valeurs négatives. Un exemple d'ajustement sans contrainte d'un spectre correspondant à une irradiation au ^{212}Pb est présenté en **Figure 3.4**.

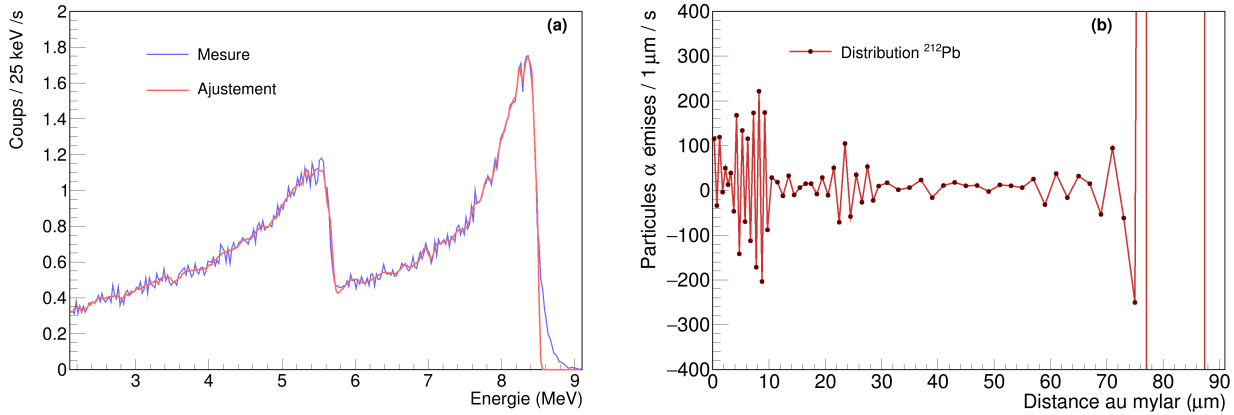


Figure 3.4 – Exemple de déconvolution obtenue par la méthode des moindres carrés pour un spectre obtenu expérimentalement lors d'une irradiation au ^{212}Pb . (a) Superposition du spectre mesuré (violet) et de son ajustement par la méthode décrite en **Équation 3.4** (rouge). (b) Distribution d'activité linéique en ^{212}Pb solution du problème. Par soucis de lisibilité, l'échelle ne permet pas de représenter tous les points.

Cet ajustement témoigne des limitations mentionnées de la méthode des moindres carrés. Les valeurs de comptage les plus élevées, au niveau des fronts observés à 5.8 et 6,6 MeV, sont ajustées aussi strictement que les plus basses valeurs de comptage observées à plus faible énergie. Un sur-ajustement est clairement observé avec un spectre ajusté beaucoup trop irrégulier. Enfin, la distribution d'activité évaluée comporte plusieurs composantes négatives, mais est également largement discontinue, et ne correspond donc pas à une solution physiquement acceptable.

3.1.3 Minimisation selon les moindres carrés non-négatifs

La méthode de minimisation selon les moindres carrés fournissant des solutions irréalistes au problème de minimisation, contraindre l'espace des solutions acceptables est nécessaire pour pouvoir obtenir des distributions d'activité réalistes. La plus fondamentale des contraintes physiques à appliquer porte sur la positivité des coefficients du vecteur solution. Cette contrainte en apparence simpliste transforme le problème de minimisation initialement linéaire de l'Équation 3.4 en un nouveau problème d'optimisation dont la résolution est non-linéaire : celui des moindres carrés non-négatifs (NNLS, pour *non-negative least squares* en anglais). Ce problème de minimisation, qui consiste à déterminer :

$$\mathbf{a}_{\text{NNLS}} = \min_{\mathbf{a} \geq \mathbf{0}} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2 \quad (3.5)$$

a initialement été décrit par Lawson et Hanson, qui ont également proposé un algorithme pour sa résolution [144]. Des améliorations en termes de performance et de robustesse de leur algorithme ont ensuite été proposées [145]. La résolution de ce problème d'optimisation, employée dans l'algorithme de déconvolution implémenté au cours de cette thèse, se base sur l'algorithme *Fast Non Negative Least Squares* proposé par Bro et de Jong[146]. L'Algorithme 1 ci-après décrit cette version de l'optimisation en pseudo-code.

Algorithme 1 Algorithme fnnls

Rappel : Une matrice \mathbf{M}^P ou un vecteur \mathbf{v}^P est l'objet constitué des éléments issus de \mathbf{M} ou de \mathbf{v} dont les indices sont dans l'ensemble P

Initialisation : $P = \{\emptyset\}$, $A = \{1, 2, \dots, n_c\}$, $\mathbf{a} = \mathbf{0}$

- 1: Calculer $\mathbf{X}^T \mathbf{y}$ et $\mathbf{X}^T \mathbf{X}$
 - 2: $\mathbf{w} = \nabla_{\mathbf{a}} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2 = \mathbf{X}^T \mathbf{y} - (\mathbf{X}^T \mathbf{X}) \mathbf{a}$
 - 3: **Tant que** $A \neq \{\emptyset\}$ et $\max_{i \in A}(w_i) > 0$:
 - 4: $j =$ indice du $\max_{i \in A}(w_i)$
 - 5: Inclure j dans P , le sortir de A
 - 6: $\mathbf{s}^P = [(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^P]^{-1} \cdot (\mathbf{X}^T \mathbf{y})^P$
 - 7: $\mathbf{s}^A = \mathbf{0}$
 - 8: **Tant que** $\min \mathbf{s}^P \leq 0$:
 - 9: $\alpha = \min_{i \in P, s_i \leq 0} [a_i / (a_i - s_i)]$
 - 10: $\mathbf{a} = \mathbf{a} + \alpha(\mathbf{s} - \mathbf{a})$
 - 11: Les indices des coefficients de \mathbf{a} égaux à 0 vont dans A , les autres dans P
 - 12: $\mathbf{s}^P = [(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^P]^{-1} \cdot (\mathbf{X}^T \mathbf{y})^P$
 - 13: $\mathbf{s}^A = \mathbf{0}$
 - 14: **Fin Tant que**
 - 15: $\mathbf{a} = \mathbf{s}$
 - 16: $\mathbf{w} = \mathbf{X}^T \mathbf{y} - (\mathbf{X}^T \mathbf{X}) \mathbf{a}$
 - 17: **Fin Tant que**
 - 18: **Sortie :** \mathbf{a}
-

La résolution, itérative, se base sur l'utilisation d'ensembles *actif* et *passif*. Dans le cadre d'une contrainte de non-négativité, chacun des éléments d'un vecteur inclus dans l'espace des solutions autorisées se trouve soit strictement à l'intérieur du domaine de définition ($a_i > 0$), soit sur sa bordure ($a_i = 0$). Dans le premier cas, la contrainte d'inégalité est dite *passive*, alors que dans le second, elle est *active* : si une meilleure solution selon la fonction de minimisation n'est accessible qu'en voyant certains coefficients quitter le domaine de définition ($a_i < 0$), ceux-ci sont *activement* contraints à rester égaux à zéro.

La résolution du problème des moindres carrés non-négatifs à l'aide d'ensemble passifs et actifs se déroule de la façon suivante. En toute première itération, le vecteur nul est proposé comme solution. Tous ses coefficients se trouvant sur la bordure de l'espace de définition, l'ensemble actif est actuellement composé de tous les indices, et l'ensemble passif est vide. Le gradient de la fonction de minimisation des moindres carrés, noté \mathbf{w} (pour l'Équation 3.4, $\mathbf{w} = \nabla_{\mathbf{a}} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2 = \mathbf{X}^T \cdot (\mathbf{y} - \mathbf{X}\mathbf{a})$), est calculé, et le coefficient associé au plus grand gradient positif dans l'ensemble actif est transféré vers l'ensemble passif (lignes 2 à 5 de l'Algorithme 1). Le problème des moindres carrés (sans contrainte de positivité) est résolu uniquement pour les coefficients dont les indices se trouvent dans l'ensemble passif, ce qui fournit alors une nouvelle solution candidate (ligne 6 et 7). Cette nouvelle solution peut potentiellement posséder des coefficients négatifs; dans ce cas, elle est remplacée par un vecteur intermédiaire avec le vecteur d'entrée (lignes 9 et 10), le plus proche possible de la nouvelle solution. Enfin, les ensembles actifs et passifs sont mis à jour (ligne 11) en regard de la nouvelle solution, et un nouveau problème des moindres carrés sur l'ensemble passif est résolu (lignes 12 et 13). Ce procédé est répété jusqu'à ce que le calcul du gradient après une itération ne soit plus positif pour aucun des coefficients de l'ensemble actif, ou bien si l'ensemble actif est vide.

A la fin de chaque itération, Lawson et Hanson ont démontré que les nouveaux ensembles actifs et passifs sont nécessairement inédits. La convergence de l'algorithme est donc assurée. Beaucoup d'implémentations de cet algorithme imposent cependant un second critère d'arrêt de l'algorithme sur l'amplitude du gradient maximum calculé à chaque itération (ligne 3). En effet, dans le cas le plus défavorable, le nombre d'itérations maximal de l'algorithme est égal au nombre de paires de listes actives et passives qu'il est possible de construire, soit 2^n pour une optimisation à n paramètres, ce qui peut rendre le temps de calcul inacceptable. Le choix de ce critère d'arrêt est cependant subjectif et doit être adapté au problème considéré. Après plusieurs essais réalisés lors de la conception du code, le temps de calcul demeurerait suffisamment faible pour qu'aucune condition d'arrêt ne soit imposée ici.

A chaque itération, l'algorithme implique au moins un calcul de matrice pseudo-inverse pour la résolution du problème des moindres carrés sur l'ensemble passif. Ces calculs font intervenir des inversions matricielles qui sont d'autant plus sensibles aux erreurs de précision numériques que la matrice est de grande taille. Bien que, comme démontré également par Lawson et Hanson, le coefficient de \mathbf{s}^P associé à l'indice nouvellement entré dans l'ensemble P est nécessairement strictement positif, celui-ci peut être calculé comme négatif par l'algorithme à cause de la précision numérique limitée. Dans ce cas, le scalaire α calculé en ligne 9 vaudra zéro, et le vecteur déterminé en ligne 15 sera le même qu'au début de l'itération. L'algorithme rentre donc dans une boucle infinie. Pour parer à cela, les auteurs de l'algorithme préconisaient de retourner à la ligne 3 si α est calculé comme égal à 0, et de considérer pour l'itération en cours que le gradient associé au coefficient bloquant l'algorithme est égal à zéro. Un contrôle supplémentaire est également réalisé en ligne 10, où tous les potentiels coefficients négatifs sont mis à zéro.

Les inversions matricielles des lignes 6 et 12 sont réalisées sur des matrices symétriques et positives par construction. L'inversion par factorisation de CHOLESKY, qui est la méthode d'inversion la plus stable numériquement pour ce type de matrice, a systématiquement été utilisée pour limiter les erreurs dues à la précision numérique [147].

3.1.4 Optimisation à l'aide de l'algorithme de maximisation de vraisemblance

Les méthodes de résolutions introduites jusqu'ici se basent sur une minimisation selon le critère des moindres carrés. Cette optimisation se base cependant sur deux hypothèses fortes concernant la mesure à reproduire : les fluctuations de chacune des composantes du vecteur \mathbf{y} sont supposées être distribuées selon une loi normale, et définies par une même variance [144, 148]. Si ces hypothèses ne sont pas vérifiées, comme dans le cas des comptages spectraux décrit

ci-après, des modifications doivent être apportées à la fonction de minimisation.

Une façon de prendre en compte la variation des fluctuations associées à chacune des composantes de la mesure \mathbf{y} est de minimiser la valeur du χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n_e} \frac{\left(\left[\sum_{j=1}^{n_c} a_j \cdot X_{i,j} \right] - y_i \right)^2}{\sigma^2(y_i)} \quad (3.6)$$

Ici, les déviations de l'optimisation par rapport à la mesure sont pénalisées proportionnellement aux amplitudes des fluctuations de chacune des composantes de \mathbf{y} .

Dans notre cas, les composantes de \mathbf{y} sont des nombres de coups mesurés dans chacun des intervalles en énergie. Ceux-ci sont nécessairement positifs, prennent des valeurs entières, et les fluctuations associées à la mesure sont donc plus justement décrites par une loi de Poisson. Cette description est ici d'autant plus pertinente que, du fait de la statistique limitée pour assurer une résolution temporelle suffisante, le nombre de coups mesurés dans chacun des intervalles en énergie sera systématiquement inférieur à 10^3 , et fréquemment de l'ordre de 10^1 . Les distributions de Poisson et normales associées à ces valeurs de moyenne et d'écart-type divergent alors significativement. Sous l'hypothèse d'une description des composantes de \mathbf{y} par des lois de Poisson, le problème d'optimisation peut aussi s'écrire comme une recherche du vecteur de paramètres $\boldsymbol{\lambda}$ tel que :

$$\mathbf{y} \sim \mathcal{P}(\boldsymbol{\lambda}) \iff (y_1, y_2, \dots, y_{n_e}) \sim (\mathcal{P}(\lambda_1), \mathcal{P}(\lambda_2), \dots, \mathcal{P}(\lambda_{n_e})) \quad (3.7)$$

Le problème consiste alors à évaluer, en supposant $\mathbf{X}\mathbf{a} = \boldsymbol{\lambda}$, le vecteur des distributions de probabilité $\boldsymbol{\lambda}$ à l'origine de la mesure \mathbf{y} (dans le cas d'une loi de Poisson, la loi de probabilité est entièrement décrite par sa moyenne). Une façon d'évaluer ce vecteur de distributions est de résoudre un problème de maximisation de vraisemblance, qui consiste à trouver le vecteur $\boldsymbol{\lambda}$ ayant la plus grande probabilité d'avoir généré la mesure \mathbf{y} [149].

En supposant chacune des valeurs des différents comptages indépendante des autres, la probabilité d'avoir observé le vecteur \mathbf{y} , si celui-ci est décrit par un vecteur de paramètres de lois de Poisson $\boldsymbol{\lambda}$, est :

$$\mathcal{L}(\mathbf{a} | \mathbf{y}) = \mathbb{P}_{\boldsymbol{\lambda}}(\mathbf{y}) = \prod_{i=1}^{n_e} \mathbb{P}_{\lambda_i}(y_i) = \prod_{i=1}^{n_e} \frac{\lambda_i^{y_i}}{y_i!} e^{-\lambda_i} \quad (3.8)$$

$\mathcal{L}(\mathbf{a} | \mathbf{y})$ correspond à la *vraisemblance pour l'observation \mathbf{y} d'avoir été générée par le vecteur de la distribution spatiale en activité \mathbf{a}* . Pour simplifier la maximisation de cette grandeur, la log-vraisemblance $\ell(\mathbf{a} | \mathbf{y}) = \ln \mathcal{L}(\mathbf{a} | \mathbf{y})$ est plus souvent considérée [28, 148, 150]. Dans ce cas, il convient de maximiser la grandeur suivante :

$$\ell(\mathbf{a} | \mathbf{y}) = \ln \mathbb{P}_{\boldsymbol{\lambda}}(\mathbf{y}) = \sum_{i=1}^{n_e} y_i \ln \lambda_i - \lambda_i - \ln y_i! \quad (3.9)$$

La log-vraisemblance est plus facilement dérivable, et la résolution de ce problème peut se faire par descente de gradient [151]. Le formalisme du Modèle Linéaire Généralisé (GLM, pour *Generalized Linear Model* en anglais) permet de réaliser cette descente de gradient par résolution de problèmes linéaires successifs. Dans le cadre d'une maximisation de vraisemblance, notons $\boldsymbol{\eta} = \mathbf{X}\mathbf{a}$ le prédicteur linéaire, et g la fonction *lien* entre la mesure et le prédicteur : $E(\mathbf{y}) = \boldsymbol{\lambda} = g(\boldsymbol{\eta})$. Avec l'introduction du formalisme GLM, NEDDER et WEDDERBURN ont montré que maximiser un problème de vraisemblance défini selon ces paramètres revient à résoudre itérativement un problème des moindres carrés repondérés (IRLS, pour *Iteratively*

Reweighted Least Squares en anglais) [28] :

$$\mathbf{a}_{(n+1)} = \min_{\mathbf{a}} \mathbf{W}_{(n)} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}'\|^2 \quad (3.10)$$

avec :

$$\mathbf{W}_{(n)} = \frac{1}{\text{Var}(\boldsymbol{\eta}_{(n)})} \left(\frac{\partial \boldsymbol{\lambda}}{\partial \boldsymbol{\eta}} \right)^2 \quad \text{et} \quad \mathbf{y}' = \boldsymbol{\eta}_{(n)} + (\mathbf{y} - \boldsymbol{\lambda}_{(n)}) / \left(\frac{\partial \boldsymbol{\lambda}}{\partial \boldsymbol{\eta}} \right) \quad (3.11)$$

Puisque dans notre cas, la fonction *lien*, g , est égale à l'identité¹ ($\boldsymbol{\eta} = \boldsymbol{\lambda}$), il suffit de résoudre itérativement, en posant $\boldsymbol{\Lambda} = \text{diag}(\boldsymbol{\lambda})$:

$$\mathbf{a}_{(n+1)} = \min_{\mathbf{a}} \frac{1}{\boldsymbol{\Lambda}_{(n)}} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|^2 \quad (3.12)$$

A partir d'une solution de départ, il est possible d'approcher la solution maximisant la fonction de vraisemblance en résolvant itérativement des problèmes de minimisation selon les moindres carrés de l'**Équation 3.12**. Pour contraindre les solutions à être positives, les résolutions successives des problèmes LS sont finalement remplacées par des résolutions de problèmes NNLS selon l'**Algorithme 1** :

$$\mathbf{a}_{(n+1)} = \min_{\mathbf{a} > \mathbf{0}} \frac{1}{\boldsymbol{\Lambda}_{(n)}} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|^2 = \min_{\mathbf{a} > \mathbf{0}} \left\| \frac{\mathbf{X}}{\sqrt{\boldsymbol{\Lambda}}} \mathbf{a} - \frac{\mathbf{y}}{\sqrt{\boldsymbol{\Lambda}}} \right\|^2 \quad (3.13)$$

3.1.5 Contraintes physiques et expérimentales

L'ajustement des spectres mesurés par la résolution itérative proposée en **Équation 3.13** permet d'obtenir des solutions positives et prenant en compte la distribution de probabilité des nombres de coups mesurés dans chacun des intervalles en énergie. Cependant, le grand nombre de degrés de liberté pour cette régression, nécessaires à une reconstruction précise de la distribution d'activité (voir **Table 3.1**), conduit encore systématiquement à un sur-ajustement. Les distributions d'activité calculées par cette méthode ne sont toujours pas acceptables du fait des fortes discontinuités apparentes. Un exemple d'ajustement est présenté en **Figure 3.5**. On y observe que l'ajustement tend encore à reproduire les fluctuations liées au bruit statistique, ce qui se traduit par une distribution d'activité significativement discontinue.

3.1.5.1 Contrainte de monotonie des dérivées successives

Il est donc nécessaire de contraindre davantage l'espace des solutions. Pour réduire les discontinuités, une contrainte de monotonie a été imposée sur la distribution spatiale calculée ainsi que sur ses dix premières dérivées. Préliminairement à ce travail de thèse, une description exponentielle des gradients d'activités avait été proposée :

$$a(z, t) = a_0(t) \cdot \exp(-b(t) \cdot z) + d(t) \quad (3.14)$$

Bien que ce modèle soit empirique et non-basé sur des justifications physiques, son utilisation avait permis d'ajuster correctement des spectres acquis à l'aide d'un montage expérimental similaire à celui étudié dans cette thèse, pour des irradiations au ^{212}Pb [78]. Pour prendre en compte l'efficacité de ce modèle, nous avons choisi ici de contraindre l'espace des solutions à

1. Autrement dit, les activités présentes aux différentes altitudes contribuent linéairement au signal. Pour d'autres problèmes modélisés, les paramètres peuvent contribuer multiplicativement et la fonction lien serait exponentielle.

l'aide d'une des propriétés des exponentielles, liée à la continuité de ces fonctions :

$$\frac{\partial^{2p} a}{\partial z^{2p}} \geq 0 \text{ et } \frac{\partial^{2p+1} a}{\partial z^{2p+1}} \leq 0, \forall p \in \mathbb{N}, \forall z \geq 0 \quad (3.15)$$

S'il n'est pas possible de parler de dérivation sur la suite discrète des coefficients $(a_i)_{i \in [1, n_c]}$, il est en revanche possible de définir une dérivation numérique, dont la définition se base sur celle de la dérivation des fonctions continues. Pour intégrer l'alternance du signe des dérivées successives de l'**Équation 3.15**, nous définissons désormais les vecteurs des dérivées d'ordre k de la distribution en activité, notés $\mathbf{a}^{(k)}$, par :

$$\begin{cases} a_i^0 = a_i, \\ \forall k \in [1, n_c], a_i^{(k)} = \begin{cases} \frac{a_i^{(k-1)} - a_{i+1}^{(k-1)}}{h_i} & \text{si } i \leq n_c - k, \\ a_i^{(k-1)} & \text{sinon.} \end{cases} \end{cases} \quad (3.16)$$

Cette construction considère l'alternance des signes des dérivées de l'**Equation 3.15** que nous souhaitons reproduire. Dans ces conditions, il suffit de contraindre l'ensemble des vecteurs dérivées, tels que définis en **Equation 3.16**, à être non-négatifs. Le système d'équation pour la construction des vecteurs dérivées peut se mettre sous forme matricielle :

$$\mathbf{a}^{(k)} = \mathbf{D}_g^{(k)} \cdot \mathbf{a}^{(k-1)} = \left(\prod_{j=k, j--}^1 \mathbf{D}_g^{(j)} \right) \cdot \mathbf{a} \quad (3.17)$$

où le produit matriciel est un produit à gauche, avec :

$$\mathbf{D}_g^{(k)} = \begin{pmatrix} \frac{1}{h_1} & \frac{-1}{h_1} & & & & & \\ & \frac{1}{h_2} & \frac{-1}{h_2} & & & & \\ & & \ddots & \ddots & & & \\ & & & \frac{1}{h_{n_s-k}} & \frac{-1}{h_{n_s-k}} & & \\ & & & & 1 & & \\ (0) & & & & & \ddots & \\ & & & & & & 1 \end{pmatrix} \quad (3.18)$$

$\mathbf{D}_g^{(k)}$ est appelée matrice de dérivation à gauche de l'ordre $(k-1)$ à l'ordre (k) . La construction de la matrice intègre l'alternance du signe de la dérivation à chaque ordre. Puisque dans l'opération de discrétisation numérique de l'**Equation 3.16**, un degré de liberté est perdu à chaque dérivation, une diagonale de 1 apparaît dans $\mathbf{D}_g^{(k)}$, sa taille augmentant avec la valeur de k . La construction des vecteurs dérivées, à l'aide de cette matrice, assure que la non-négativité d'un vecteur dérivé $\mathbf{a}^{(k)}$ implique la non-négativité de tous les vecteurs dérivées d'ordre inférieurs².

Dans le cadre d'un problème NNLS, si l'on souhaite imposer cette monotonie alternée aux vecteurs dérivées jusqu'à un ordre k_{\max} , on cherche désormais à minimiser $\|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2$ pour \mathbf{a} vérifiant $\mathbf{a}^{(k_{\max})} = \mathbf{E}_{k_{\max}} \cdot \mathbf{a} \geq \mathbf{0}$, avec $\mathbf{E}_{k_{\max}} = \prod_{j=k_{\max}, j--}^1 \mathbf{D}_g^{(j)}$ (où les produits sont à gauche). Le problème d'optimisation reviendrait alors à résoudre :

$$\min_{\mathbf{a}^{(k_{\max})} \geq \mathbf{0}} \|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2 = \min_{\mathbf{a}^{(k_{\max})} \geq \mathbf{0}} \|\mathbf{X}\mathbf{E}_{k_{\max}}^{-1} \mathbf{a}^{(k_{\max})} - \mathbf{y}\|_2^2 = \min_{\mathbf{a}^{(k_{\max})} \geq \mathbf{0}} \|\mathbf{X}_{k_{\max}} \mathbf{a}^{(k_{\max})} - \mathbf{y}\|_2^2 \quad (3.19)$$

2. Démontrable par récurrence.

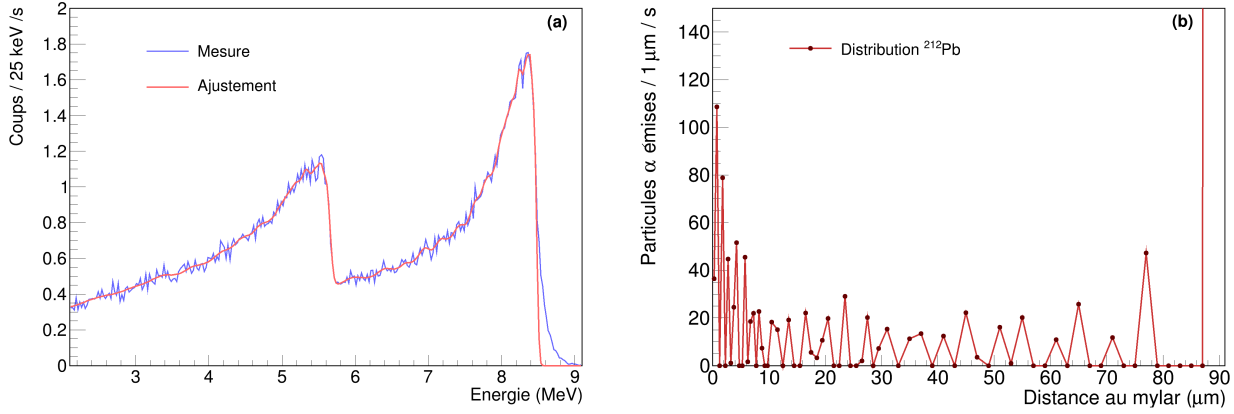


Figure 3.5 – Exemple de déconvolution obtenue pour un spectre obtenu expérimentalement lors d’une irradiation au ^{212}Pb . (a) Superposition du spectre mesuré (en violet) et de son ajustement par la méthode décrite en **Équation 3.13** (en rouge). (b) Distribution d’activité linéique en ^{212}Pb solution de la déconvolution.

qui constitue un nouveau problème NNLS. La résolution de ce problème pour $\mathbf{a}^{(k_{\max})}$, en multipliant la solution par la matrice $\mathbf{E}_{k_{\max}}^{-1}$, permet de restreindre grandement l’espace des solutions (tout en autorisant davantage de solutions qu’un simple modèle exponentiel) et donc de réduire les risques de sur-ajustement. Il est possible de coupler cette minimisation avec l’optimisation selon un critère de maximisation de vraisemblance, en appliquant la méthode de minimisation des moindres carrés par pondération itérative de l’**Equation 3.13** :

$$\mathbf{a}_{(n+1)}^{(k_{\max})} = \min_{\mathbf{a}^{(k_{\max})} > \mathbf{0}} \frac{1}{\mathbf{\Lambda}_{(n)}} \|\mathbf{X}_{k_{\max}} \mathbf{a}^{(k_{\max})} - \mathbf{y}\|^2 \quad (3.20)$$

Dans l’ensemble de cette thèse, l’ordre maximum de contrainte a été fixé à $k_{\max} = 10$. Cet ordre a été choisi comme un compromis entre la nécessité d’avoir un ordre suffisamment grand pour forcer une solution continue et contraindre l’espace des solutions, et la nécessité de ne pas réaliser trop de multiplications successives par les matrices $\mathbf{D}_g^{(k)}$ qui élargissent la gamme d’ordre de grandeurs présents dans la matrice $\mathbf{X}_{k_{\max}}$ et donc rendent l’optimisation plus sensible aux erreurs de précision numérique. Des exemples de déconvolution, pour un même spectre, sont donnés en **Figure 3.6**. Elle montre notamment que les ajustements et les distributions estimés pour $k_{\max} = 5, 10$ ou 20 sont très similaires, et qu’augmenter la valeur de k_{\max} présente rapidement un intérêt limité.

3.1.5.2 Contrainte sur l’activité totale mesurée

La dernière contrainte introduite permet d’obtenir des distributions d’activité continues, plus vraisemblables et qui rendent possible leur interprétation. Pour accroître encore davantage la crédibilité des distributions obtenues, une contrainte sur l’activité totale correspondant à la solution, qui doit être proche de l’activité totale réelle présente dans le puits, a été implémentée.

Régularisation de Tikhonov – Dans la construction de méthodes d’optimisation, la régularisation est une technique employée pour limiter les phénomènes de sur-ajustement. Elle consiste à ajouter un poids dans la fonction de minimisation, généralement dans le but de pénaliser les solutions proposant des coefficients de fortes amplitudes, ou discontinues³. Une des techniques de régularisation les plus utilisées pour les problèmes d’optimisation matriciels

3. La contrainte de monotonie des dérivées successives présentée auparavant est une forme de régularisation.

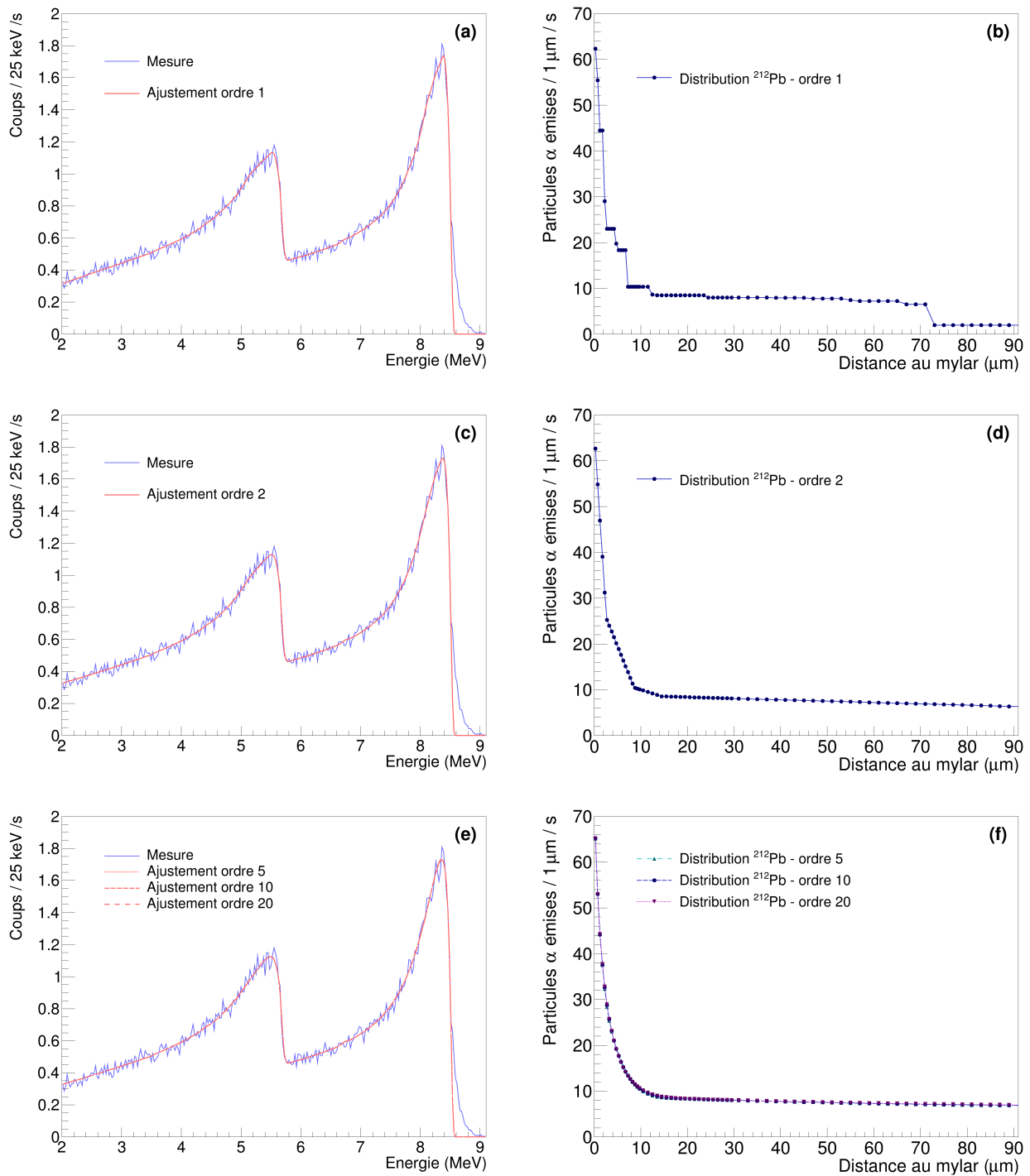


Figure 3.6 – Exemples de déconvolution obtenue pour un spectre obtenu expérimentalement lors d’une irradiation au ^{212}Pb . (a,c,e) Superposition du spectre mesuré (violet) et de son ajustement par la méthode décrite en **Équation 3.20**, pour cinq différentes valeurs d’ordre de dérivation maximal ($k_{\text{max}} = 1$ (a), 2(c), 5,10 ou 20 (e)). (b,d,f) Distribution d’activité linéique en ^{212}Pb solution du problème.

est la régularisation de Tikhonov, qui consiste à ajouter un second terme à la fonction de minimisation :

$$\min_{\mathbf{a}} \left(\|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2 + \|\mathbf{\Gamma}\mathbf{a}\|_2^2 \right) \quad (3.21)$$

La matrice $\mathbf{\Gamma}$ ajoute un poids dans la fonction de minimisation qui permet de favoriser certaines distributions des coefficients composant le vecteur \mathbf{a} . Par exemple, choisir $\mathbf{\Gamma}$ comme proportionnelle à la matrice identité produit des solutions dont les coefficients sont tous du même ordre de grandeur, la pénalité portant alors sur leur somme quadratique, alors qu'une matrice $\mathbf{\Gamma}$ proportionnelle à la matrice de dérivation numérique première ou seconde agit comme un filtre empêchant des discontinuités trop importantes des coefficients de \mathbf{a} [152]. Concernant son implémentation, une régularisation de Tikhonov peut se mettre sous la forme d'une optimisation classique. Résoudre le problème de minimisation régularisée avec la contrainte de positivité pour une matrice \mathbf{X} et un vecteur \mathbf{y} donné revient en effet à écrire :

$$\min_{\mathbf{a} \geq 0} \left(\|\mathbf{X}\mathbf{a} - \mathbf{y}\|_2^2 + \|\mathbf{\Gamma}\mathbf{a}\|_2^2 \right) = \min_{\mathbf{a} \geq 0} \|\mathbf{X}_{\mathbf{\Gamma}}\mathbf{a} - \mathbf{y}_{\mathbf{\Gamma}}\|_2^2 \text{ avec } \mathbf{X}_{\mathbf{\Gamma}} = \begin{pmatrix} \mathbf{X} \\ \mathbf{\Gamma} \end{pmatrix} \text{ et } \mathbf{y}_{\mathbf{\Gamma}} = \begin{pmatrix} \mathbf{y} \\ \mathbf{0} \end{pmatrix} \quad (3.22)$$

Le choix de la norme de la matrice $\mathbf{\Gamma}$, très dépendant du problème étudié, peut se faire par processus d'essai-erreur sur des exemples représentatifs ou bien en se basant sur des critères analytiques [148].

Matrice de régularisation – Notons A l'activité totale correspondant à une solution du problème d'optimisation \mathbf{a} . Puisque le vecteur solution est composé d'activités linéiques, l'activité totale est égale à la somme des coefficients de \mathbf{a} pondérés par la hauteur de chacun des cylindres de la base de déconvolution :

$$A = \mathbf{h}^T \mathbf{a} \text{ avec } \mathbf{h}^T = (h_1 \ h_2 \ \dots \ h_{n_c}) \quad (3.23)$$

La matrice ligne \mathbf{h}^T peut ici constituer une matrice de régularisation de Tikhonov. Le vecteur \mathbf{y} ne sera pas augmenté d'un 0, mais de l'activité totale réellement présente A_r afin d'imposer une pénalité sur la différence des activités. A_r est connue à partir de l'activité initialement injectée A_0 , de la demi-vie du radionucléide $T_{1/2}$, et du temps écoulé depuis le début de l'irradiation. Pour un spectre intégré entre deux instants t_1 et t_2 :

$$A_r(t_1, t_2) = \frac{\int_{t_1}^{t_2} A_0 e^{-\ln 2 \frac{t}{T_{1/2}}} dt}{t_2 - t_1} = \frac{A_0}{\ln 2} \frac{T_{1/2}}{t_2 - t_1} \left(e^{-\frac{t_1}{T_{1/2}}} - e^{-\frac{t_2}{T_{1/2}}} \right) \quad (3.24)$$

L'implémentation d'une pénalité supplémentaire sur l'écart quadratique entre activité mesurée et activité attendue, $(A - A_r)^2$, se fait en résolvant itérativement le problème suivant :

$$\mathbf{a}_{(n+1)}^{(k_{\max})} = \min_{\mathbf{a}^{(k_{\max})} > \mathbf{0}} \frac{1}{\mathbf{\Lambda}_{(n)}} \left\| \begin{pmatrix} \mathbf{X}_k \\ p \cdot \mathbf{h}^T \end{pmatrix} \mathbf{a}^{(k_{\max})} - \begin{pmatrix} \mathbf{y} \\ p \cdot A_r \end{pmatrix} \right\|_2^2 \quad (3.25)$$

Le réel p sert ici de pondération pour la pénalité. Comme mentionné auparavant, l'amplitude de la régularisation peut avoir un impact fort sur le processus de minimisation, et doit être déterminé selon des critères objectifs.

L'incertitude sur le facteur de calibration de l'activimètre qui a servi à la préparation des solutions diluées de radio-isotopes dans ce travail de thèse est de 5%. La calibration de

cet activimètre a été réalisée à l'aide de sources étalons de $^{99}\text{Tc}^m$ et de ^{18}F . Une calibration additionnelle pour le ^{223}Ra a montré une incertitude supplémentaire sur l'activimètre pouvant atteindre 1%. Enfin, les incertitudes sur l'activité liées aux évaluations de t_1 et t_2 sont inférieures à 1%, du fait de la longue demi-vie des radio-isotopes testés par rapport à la durée d'intégration pour générer un spectre. Afin de prendre en compte ces incertitudes expérimentales, considérons le cas du calcul de p de sorte qu'une déviation de 10% entre A et A_r contribuerait autant à la fonction de minimisation qu'un ajustement à un écart-type de distance de l'ensemble des comptages pondérés de \mathbf{y} ($\mathbf{y}/\sqrt{\Lambda}$, voir Équation 3.13). Notons $\mathbf{a}_{1\sigma}$ une telle solution. Alors, la fonction de minimisation prend pour valeur :

$$\begin{aligned} \frac{1}{\Lambda_{(n)}} \left\| \begin{pmatrix} \mathbf{X}_{k_{\max}} \\ p \cdot \mathbf{h}^T \end{pmatrix} \mathbf{a}^{(k_{\max})} - \begin{pmatrix} \mathbf{y} \\ p \cdot A_r \end{pmatrix} \right\|^2 &= \sum_{i=1}^{n_e} \left(\left(\frac{\mathbf{X}}{\sqrt{\Lambda}} \mathbf{a}_{1\sigma} \right)_i - \frac{\mathbf{y}}{\sqrt{\Lambda}_i} \right)^2 + p^2 (A - A_r)^2 \\ &= \sum_{i=1}^{n_e} \left(\sqrt{\left(\frac{\mathbf{y}}{\sqrt{\Lambda}} \right)_i} \right)^2 + p^2 (A - A_r)^2 \\ &= \sum_{i=1}^{n_e} \left(\sqrt{\sqrt{\lambda_i}} \right)^2 + p^2 (A - A_r)^2 \\ &= \sum_{i=1}^{n_e} \sqrt{\lambda_i} + p^2 (A - A_r)^2 \end{aligned} \quad (3.26)$$

Ainsi, pour qu'une erreur de 10% sur l'activité totale estimée soit aussi pénalisante qu'un ajustement avec $\mathbf{a}_{1\sigma}$, p doit vérifier :

$$p^2 (A - A_r)^2 = \sum_{i=1}^{n_e} \sqrt{\lambda_i} \Rightarrow p = 10 \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{n_e} \sqrt{\lambda_i}}}{A_r} \quad (3.27)$$

La valeur de p , dépendant de l'estimation $\boldsymbol{\lambda}$, est donc également actualisée à chaque itération. Notons enfin que le critère permettant le calcul de p proposé est adapté à un modèle permettant un ajustement spectral de qualité, sans erreur systématique (voir **Équation 3.1**). Dans le cas inverse, le critère sur l'erreur d'activité doit être assoupli, ce qui résulte en une diminution de la valeur de p .

La méthode itérative décrite en **Équation 3.25**, testée progressivement durant sa conception, a montré une convergence systématique de l'optimisation en cinq itérations ou moins (sans variation des coefficients à 10^{-5} près). Par sécurité, dix itérations sont systématiquement réalisées dans le code et un test sur la convergence lors de la dernière itération est effectuée. Ainsi, il est possible de s'affranchir d'un choix potentiellement mauvais de critère sur la convergence, un critère trop strict ralentissant la minimisation et un critère trop lâche risquant de produire une solution partielle trop éloignée.

Cette nouvelle méthode, que nous avons proposé de nommer *Maximisation non-négative avec contrainte de la vraisemblance*, abrégée C-NNML (pour *Constrained Non-Negative Maximum Likelihood* en anglais), en référence aux méthodes d'optimisations incluses dans sa conception, permet ainsi de déterminer une solution basée sur des justifications physiques, permettant d'interpréter les distributions d'activité estimées et renforçant la crédibilité des calculs dosimétriques effectués en conditions *in vitro* selon le formalisme du MIRD [153].

3.1.6 Évaluation des incertitudes

Du fait de la non-linéarité du problème de minimisation à résoudre, les incertitudes associées à une distribution d'activité évaluée par l'algorithme C-NNML ne sont pas évaluables analytiquement.

ment [154]. L'espace des solutions étant fortement contraint, les covariances entre les différents coefficients sont également non-négligeables et elles-mêmes inaccessibles analytiquement.

Une alternative consiste à estimer les incertitudes sur chacun des coefficients par méthode Monte-Carlo. Bien que très inefficace en terme de temps de calcul, cette méthode a gagné en popularité grâce aux gains en performances des unités de calcul modernes [155, 156], et a l'avantage de ne pas se baser sur des hypothèses simplificatrices pouvant générer une estimation biaisée. La description de la méthode d'évaluation des incertitudes proposée ici est appliquée au problème d'analyse spectrale de ce sujet.

La base de déconvolution \mathbf{X} étant fixée, les seules variables dont dépend la distribution d'activité évaluée sont les composantes du vecteur \mathbf{y} , qui suivent différentes lois de Poisson de paramètres *a priori* inconnu. En l'absence d'informations supplémentaires sur \mathbf{y} , les valeurs les plus vraisemblables des espérances associées à chacun des comptages y_i sont égales à chacun des comptages eux-mêmes. Dans ce calcul d'incertitude, nous faisons donc l'hypothèse :

$$\mathbf{y} \sim \mathcal{P}(\mathbf{y}) \iff \forall i \in [1, n_e] \quad y_i \sim \mathcal{P}(y_i) \quad (3.28)$$

Il a été choisi ici d'ignorer l'information supplémentaire sur les distributions des différents y_i pouvant être obtenue à partir d'un ajustement, bien que celui-ci permette en théorie d'obtenir les espérances de chacun des comptages constituant \mathbf{y} (comme décrit en **Équation 3.7**). Ce choix est motivé par les risques d'un ajustement ponctuellement trop éloigné de la mesure, du fait de potentielles erreurs de calibration en énergie des spectres, de présence de queues de signal exponentielles non reproductibles (présentes aux énergies maximales dans les **Figures 3.4** et **3.5**), ou de pertes de signal dans certains intervalles en énergie liées à des défauts de la carte d'acquisition (voir **Chapitre 5**).

La méthode d'évaluation des incertitudes consiste à générer aléatoirement des spectres virtuels obtenus à partir de la loi de distribution supposée de la mesure \mathbf{y} , et de recalculer par analyse spectrale une loi de distribution pour chacune des mesures virtuelles générées. Si le nombre de spectres virtuels générés est suffisamment grand, il devient alors possible de déterminer, par étude statistique, l'espérance de chacun des coefficients de la fonction de distribution d'activité, ainsi que leurs écart-types, et éventuellement les distributions de probabilités qui leur sont associées [157]. Notons n_{MC} le nombre de spectres déconvolués pour une mesure, incluant donc la mesure et l'ensemble des spectres virtuels générés. Notons, pour $v \in \llbracket 1, n_{MC} \rrbracket$, \mathbf{a}_v une déconvolution réalisée sur un spectre virtuel. La moyenne des vecteurs calculés, qui est la solution retenue de notre problème d'optimisation, est donné par :

$$\bar{\mathbf{a}} = \frac{\sum_{v=1}^{n_{MC}} \mathbf{a}_v}{n_{MC}} \quad (3.29)$$

et la matrice de covariance des coefficients de la solution est donnée par [158] :

$$\text{Cov}(\bar{\mathbf{a}}) = \frac{\sum_{v=1}^{n_{MC}} (\mathbf{a}_v - \bar{\mathbf{a}}) \cdot (\mathbf{a}_v - \bar{\mathbf{a}})^T}{n_{MC} - 1} \quad (3.30)$$

Ces grandeurs sont essentielles à la détermination de l'incertitude sur la dose délivrée aux cellules, calculée par le formalisme linéaire du MIRD (*cf.* **Équation 3.41**) et auquel la loi de propagation des incertitudes peut s'appliquer [159].

Pour l'estimation d'un intervalle de confiance à $q\%$, l'Annexe 1 du *Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure* [157] préconise de réaliser un nombre de tirages :

$$n_{MC} \gg \frac{1}{1 - q} \quad (3.31)$$

Le cas le plus défavorable de la distribution Gaussienne assure que 99,7% des tirages d'une variable aléatoire se trouvent à moins de trois écarts-types de son espérance. Un intervalle de confiance à 3σ nécessite donc :

$$n_{MC, 3\sigma} \gg \frac{1}{1 - 0.997} \simeq 333 \quad (3.32)$$

Dans notre cas , pour un spectre analysé, 500 autres spectres virtuels sont créés puis analysés à leur tour. Ce nombre est relativement faible pour une estimation rigoureuse des incertitudes par méthode Monte-Carlo, mais est dû à la vitesse limitée du processus de déconvolution, qui peut prendre jusqu'à une seconde par spectre. Dans ces conditions, l'Annexe 1 du *Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure* préconise de ne pas chercher à estimer un intervalle de confiance sur la grandeur calculée, le nombre de tirages étant trop limité pour correctement évaluer la loi de distribution caractérisant cette grandeur. A la place, seules la moyenne et l'écart-type de la distribution constituent des grandeurs évaluables pouvant être éventuellement propagées ensuite dans d'autres calculs d'incertitude, dans notre cas celui de l'incertitude sur la dose délivrée aux cellules [157].

3.2 Validation de l'algorithme de déconvolution matricielle

Avant de pouvoir appliquer l'algorithme C-NNML à la déconvolution de spectres acquis lors d'essais *in vitro*, ses performances doivent auparavant être validées. L'objectif est ici d'évaluer l'aptitude de la méthode de déconvolution spectrale par algorithme C-NNML à reconstruire avec justesse la distribution spatiale à l'origine d'un spectre mesuré, et de quantifier les conséquences d'éventuelles erreurs sur cette reconstruction en terme de dose délivrée aux cellules. La validation de la méthode de déconvolution matricielle C-NNML nécessite de comparer, pour une analyse réalisée sur des spectres acquis lors d'irradiations en conditions *in vitro*, les distributions d'activités déconvoluées et les doses calculées correspondantes à leurs homologues vérités-terrain. Ces dernières étant inaccessibles expérimentalement, la validation de la méthodologie a été réalisée sur des simulations d'essais *in vitro*.

3.2.1 Simulation d'essais *in vitro*

Des irradiations *in vitro* ont été simulées afin de construire une base de données de spectres en énergie, chacun associé à une dose délivrée aux cellules, pour des distributions spatiales d'activité prédéfinies. Les distributions d'activité simulées pour la génération des spectres et des doses délivrées aux cellules ont été choisies pour être plausibles au regard des mesures sans cellules réalisées au moment de la conception du code, en l'absence de cellules et avec un milieu de culture constitué uniquement d'eau, mais aussi pour anticiper certaines distributions potentiellement observables en présence de cellules et d'un vrai milieu de culture.

Le ^{212}Pb et le ^{223}Ra dont les chaînes de décroissance sont décrites au **Chapitre 2**, ont été utilisés dans le processus de validation de l'algorithme de déconvolution. Pour le ^{212}Pb , cinq formes de distributions ont été considérées pour modéliser des gradients de concentration au fond des puits de culture. La première fonction, f_1 , est la somme d'une exponentielle à une composante homogène, afin de se replacer dans le cadre de l'ancien modèle paramétrique utilisé pour déconvoluer les spectres en énergie acquis. Les valeurs des constantes ont été prises en considérant les essais réalisés en amont de cette thèse [78] :

$$f_1(z) = 40 \exp(-0.3z) + 7 \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.33)$$

La seconde fonction, f_2 , est quant à elle une somme de deux exponentielles, une de hauteur caractéristique faible ($1 \mu\text{m}$) et l'autre de hauteur plus grande ($10 \mu\text{m}$), pour modéliser une

superposition de deux gradients d'activité :

$$f_2(z) = 30 \exp(-z) + 15 \exp(-0.1 z) + 7 \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.34)$$

La troisième fonction choisie, f_3 , est une loi de puissance. Cette fonction, qui vérifie la propriété de l'**Équation 3.15**, est cependant caractérisée par une décroissance beaucoup plus lente que les fonctions exponentielles et donc par un gradient plus étalé spatialement :

$$f_3(z) = \frac{40}{(z+1)^{0.6}} + 6.05 \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.35)$$

La quatrième forme de distribution testée, f_4 , est composée d'une fonction exponentielle, pondérée par un terme réduisant l'amplitude de la distribution d'activité à proximité du fond du puits. Ce terme modélise une éventuelle répulsion des radionucléides par les cellules ou par le fond du puits, ou bien une accumulation du milieu de culture au fond du puits empêchant la diffusion des radionucléides à proximité des cellules :

$$f_4(z) = (1 - 0.8 \exp(-0.5 z)) \cdot (40 \exp(-0.3 z) + 7) \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.36)$$

La cinquième et dernière fonction choisie, f_5 , est une distribution homogène, qui représente l'hypothèse généralement faite en l'absence de spectroscopie α . Cette distribution est également en théorie la distribution initialement observée, au moment du dépôt des radionucléides dans le milieu de culture.

$$f_5(z) = 7 \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.37)$$

Chacune de ces cinq fonctions, représentées en **Figure 3.7** a ensuite été renormalisée pour que les activités totales dans le puits soient proches de trois valeurs possibles d'activité : **14 kBq** qui est légèrement inférieure aux 15 kBq souhaités lors des irradiations *in vitro* et qui permet donc de déterminer une limite inférieure aux performances de notre algorithme, **10,5 kBq** qui est représentatif de l'activité attendue après 4 h d'irradiation, et **3,9 kBq** afin de couvrir la possibilité de réaliser des essais avec une activité injectée plus faible, sur une plus grande durée, ou avec une plus petite résolution temporelle.

Pour réaliser une évaluation dosimétrique de la méthode de déconvolution, des cellules ont été modélisées et simulées sous Geant4. Pour être représentatif d'essais *in vitro*, les cellules sont modélisées ici par des demi-ellipsoïdes de hauteur 20 μm , et de demi-longueurs 15 μm et 25 μm , les dimensions ayant été choisies à partir d'images de microscopie à deux photons de cellules tumorales MDA-MB-231-Br [78]. 50 000 cellules ont été simulées. Dans la simulation, un volume sensible à la dose a été défini comme l'union de l'ensemble des cellules. Les cellules ont été distribuées de façon régulière dans le fond du puits de culture, à l'aide de l'algorithme de positionnement *sunflower head* (voir **Figure 2.26, p65**). Cette description géométrique du milieu cellulaire, simpliste, ne préjuge pas de la vraie géométrie cellulaire. Elle permet cependant, en étant reprise à l'identique pour la simulation de la dose délivrée et pour le calcul des facteurs S, de s'affranchir de l'incertitude liée à la modélisation du milieu cellulaire, discutée plus en détail au **Chapitre 4**. Comme décrit au **Chapitre 1**, les cellules MDA-MB-231-Br ne sont pas spécifiques du radiopharmaceutique $^{212}\text{Pb-}\alpha\text{VCAM-1}$. Pour cette validation, afin de ne considérer que la dose dues aux radionucléides en solution dans le milieu et donc une non-intériorisation des radionucléides par les cellules, les désintégrations ont été exclusivement simulées en dehors des cellules. Les distributions linéiques réellement simulées prennent donc en compte le volume occupé par les cellules, comme montré en **Figure 3.7**.

Afin de respecter le caractère continu des distributions testées, le milieu de culture a été discrétisé le long de l'axe vertical selon le schéma présenté dans la **Table 3.2**, de meilleure

résolution que celui utilisé pour construire la base de déconvolution.

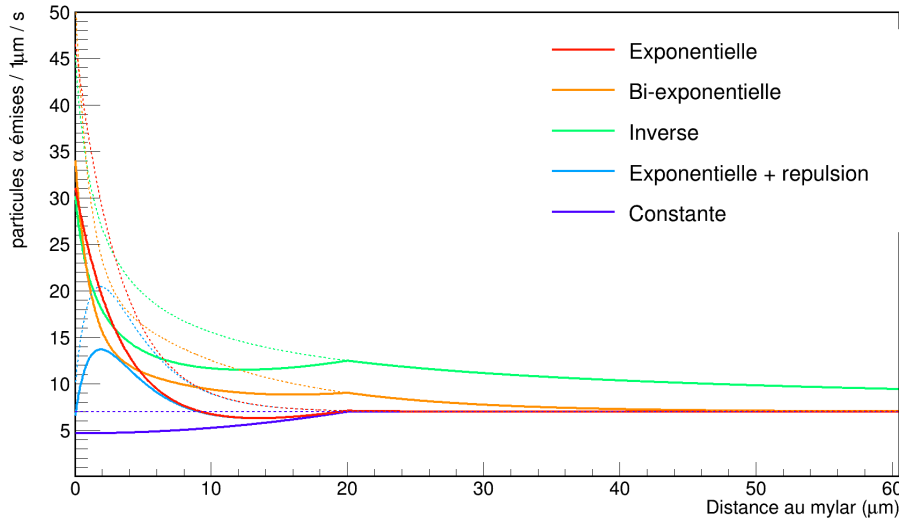


Figure 3.7 – Distributions linéiques d'activité simulées pour la validation de la méthode pour les irradiations au ^{212}Pb . Les courbes en traits pleins correspondent aux distributions linéiques, les courbes en trait pointillés sont les distributions linéiques en l'absence de cellules, proportionnelles aux distributions volumiques.

Pour chacune des 15 paires distributions/activités totales, 10 simulations de spectres en énergie et de la dose aux cellules correspondante ont été réalisées, correspondant à des irradiations de 600 s. La validation de la méthode pour les irradiations au ^{212}Pb repose donc sur la déconvolution de 150 spectres.

Une validation similaire a été réalisée pour les irradiations au ^{223}Ra . Afin de prendre en compte la possibilité pour les émetteurs α de la chaîne de décroissance d'avoir différentes distributions spatiales, quatre groupes de radionucléides émetteurs α ont été distingués. Néanmoins, étant donné la courte demi-vie du ^{215}Po (1,8 ms), qui décroît exclusivement par émission d'une particule α suite à celle du ^{219}Rn , ces deux radionucléides ont été regroupés en une source unique et ont donc été supposés partager la même distribution spatiale, à la fois pour la simulation d'irradiations ainsi que pour la déconvolution des spectres simulés. Cette hypothèse, validée lors d'essais sans cellules réalisées au ^{223}Ra (présentées au **Chapitre 5**), permet de réduire significativement la taille de la base de déconvolution, réduisant donc les risques de sur-ajustement spectral sans pour autant compromettre la fiabilité de la distribution déconvoluée.

Comme pour le ^{212}Pb , l'analyse des essais sans cellules réalisés avec du ^{223}Ra a montré des gradients de grande amplitude plus ou moins étalés spatialement (*cf.* **Chapitre 5**). Trois fonctions de distribution ont donc été définies et attribuées à chacun des trois groupes de radionucléides. Deux distributions bi-exponentielles, notées g_1 et g_3 , ont été modélisées avec des longueurs caractéristiques différentes, ainsi qu'une loi inverse (g_2) simulant un gradient plus faible :

$$g_1(z) = s \times \left(\frac{1}{6} \cdot \exp(-0.3z) + \frac{5}{6} \cdot \exp(-z) \right) + c \quad \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.38)$$

$$g_2(z) = \frac{s}{(z + 0.5)(z + 0.5)^2} + c \quad \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.39)$$

$$g_3(z) = s \times (0.03 \cdot \exp(-0.02z) + 0.97 \cdot \exp(-2z)) + c \quad \alpha/\mu\text{m/s} \quad (3.40)$$

Tableau 3.2 – Paramètres de la discrétisation employée pour la simulation d'irradiations *in vitro* utiles à la validation de la méthode de déconvolution.

| Radionucléide | Émetteurs α | Distance au mylar | Hauteur des cylindres | Nombre de spectres (simulation d'irradiations) |
|-------------------|--|--------------------------|-----------------------|--|
| ^{212}Pb | $^{212}\text{Bi} + ^{212}\text{Po}$ | 0 - 10 μm | 0,1 μm | 341 |
| | | 10 - 30 μm | 0,25 μm | |
| | | 30 - 110 μm | 0,5 μm | |
| | | 110 - 2000 μm | 1890 μm | |
| ^{223}Ra | ^{223}Ra ^{219}Rn $^{215}\text{Po} + ^{215}\text{At}$ $^{211}\text{Bi} + ^{211}\text{Po}$ | 0 - 10 μm | 0,1 μm | 2144 (4 \times 536) |
| | | 10 - 30 μm | 0,25 μm | |
| | | 30 - 110 μm | 0,5 μm | |
| | | 110 - 200 μm | 1 μm | |
| | | 200 - 350 μm | 2 μm | |
| | | 350 - 500 μm | 5 μm | |
| | | 500 - 2000 μm | 1500 μm | |

Pour chacune des fonctions, s et c sont des constantes qui ont été choisies à partir des mesures réalisées. Un gradient de concentration significativement plus important avait été observé pour la distribution du ^{211}Bi , et significativement plus faible pour le regroupement du ^{219}Rn et du ^{215}Po . Les distributions spatiales simulées pour le groupe $^{219}\text{Rn} + ^{215}\text{Po}$, normalisées à une activité totale dans le puits proche de 9 kBq, sont présentées en **Figure 3.8**. Les valeurs des constantes pour les différentes fonctions et les différents groupes de radionucléides sont données en **Table 3.3**.

Tableau 3.3 – Paramètres utilisés pour chacun des groupes de radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra et activité totale simulée pour chaque distribution.

| | g_1 | | | g_2 | | | g_3 | | |
|-------------------------------------|-------|-----|------------------|-------|-----|------------------|-------|-----|------------------|
| | s | c | A_{tot} | s | c | A_{tot} | s | c | A_{tot} |
| ^{223}Ra | 140 | 4.4 | 8912 Bq | 105 | 4.4 | 8860 Bq | 140 | 4.4 | 9020 Bq |
| $^{219}\text{Rn} / ^{215}\text{Po}$ | 30 | 4.5 | 9008 Bq | 22.5 | 4.5 | 8997 Bq | 30 | 4.5 | 9031 Bq |
| ^{211}Bi | 500 | 4.2 | 8850 Bq | 375 | 4.3 | 8866 Bq | 500 | 4.1 | 9036 Bq |

Chacun des arrangements possible des fonctions g_1 , g_2 et g_3 a été attribué aux différents groupes de radionucléides, permettant de tester au total six distributions totales différentes (pour chacun des groupes $^{223}\text{Ra} - ^{219}\text{Rn} + ^{215}\text{Po} - ^{211}\text{Bi}$, respectivement $g_1 - g_2 - g_3$, $g_1 - g_3 - g_2$, $g_2 - g_1 - g_3$, $g_2 - g_3 - g_1$, $g_3 - g_1 - g_2$ et $g_3 - g_2 - g_1$). Chacun des arrangements de distributions a été simulé 10 fois, similairement au ^{212}Pb , créant une base de données de 60 spectres et des doses aux cellules associées pour la validation de la méthode de déconvolution, dans le cas du ^{223}Ra .

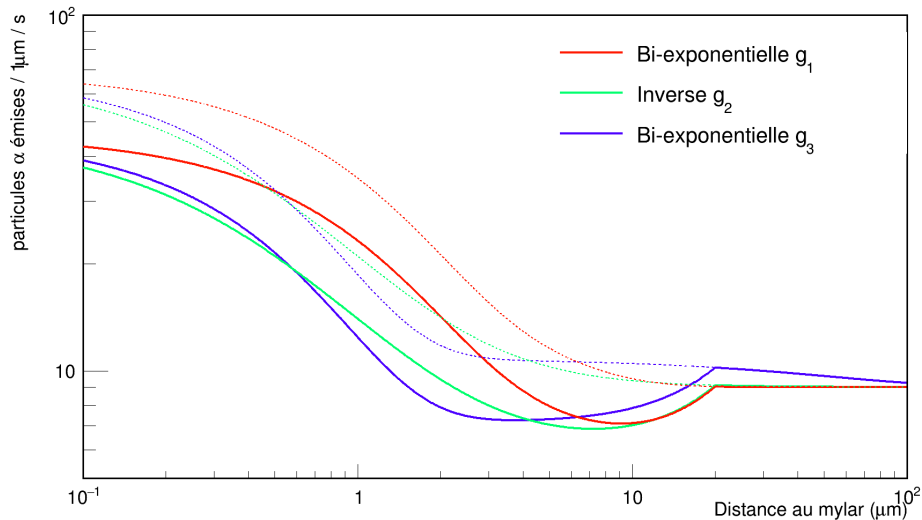


Figure 3.8 – Distributions linéiques d'activité simulées pour la validation de la méthode pour les irradiations au ^{223}Ra . Les courbes en traits pleins correspondent aux distributions linéiques en présence de cellules, et les courbes en trait pointillés aux distributions linéiques en l'absence de cellules.

3.2.2 Validation pour les essais simulés au ^{212}Pb

3.2.2.1 Distributions spatiales d'activité

Comme décrit précédemment, une base de 150 spectres ainsi que les doses aux cellules associées ont été simulées pour des irradiations au ^{212}Pb . Les spectres générés ont été déconvolués à l'aide de l'algorithme C-NNML. Des exemples d'ajustement des spectres par la méthode C-NNML et de déconvolution de la distribution en activité sont donnés pour chacune des cinq fonctions de distribution, pour chacune des activités simulées, en **Figures 3.9, 3.10 et 3.11** (respectivement 14 kBq, 10 kBq et 4 kBq).

L'ensemble des spectres acquis, du moins visuellement, sont correctement ajustés pour l'ensemble des distributions simulées. Les distributions d'activité déconvoluées montrent également une très bonne correspondance avec les distributions simulées. Une exception subsiste cependant, celle de la distribution exponentielle incluant un terme de répulsion. Les écarts observés entre simulation et déconvolution étaient prévisibles, du fait de la non-correspondance entre le modèle de répulsion et les contraintes appliquées au modèle de déconvolution de l'**Équation 3.15**. En effet, celui-ci implique la monotonie de la fonction de distribution ; un phénomène de compensation prend donc place, avec une surestimation de la distribution au fond du milieu de culture, suivie par une sous-estimation jusqu'à $20\ \mu\text{m}$ d'altitude. Au delà, les fonctions simulées et estimées sont en accord. Dans le cas des distributions suivant une loi inverse, des barres d'erreur de plus grande amplitude sont observées sur la distribution estimée à plus grande distance du mylar, malgré un bon accord entre l'estimation et la distribution testée. Ce phénomène peut être expliqué par la largeur plus importante de la discrétisation spatiale à plus grande altitude dans le puits de culture, alors que la fonction de distribution simulée varie encore significativement en comparaison des quatre autres fonctions simulées. La discrétisation implique en effet de moyenniser la distribution sur chacun des intervalles. Ce phénomène, qui avait été anticipé, a motivé une discrétisation plus importante du milieu de culture à proximité du fond des puits, où les variations de distribution attendues sont les plus importantes et avec des conséquences plus importantes sur l'estimation de la dose délivrée du fait de la plus grande proximité entre les radionucléides et les cellules.

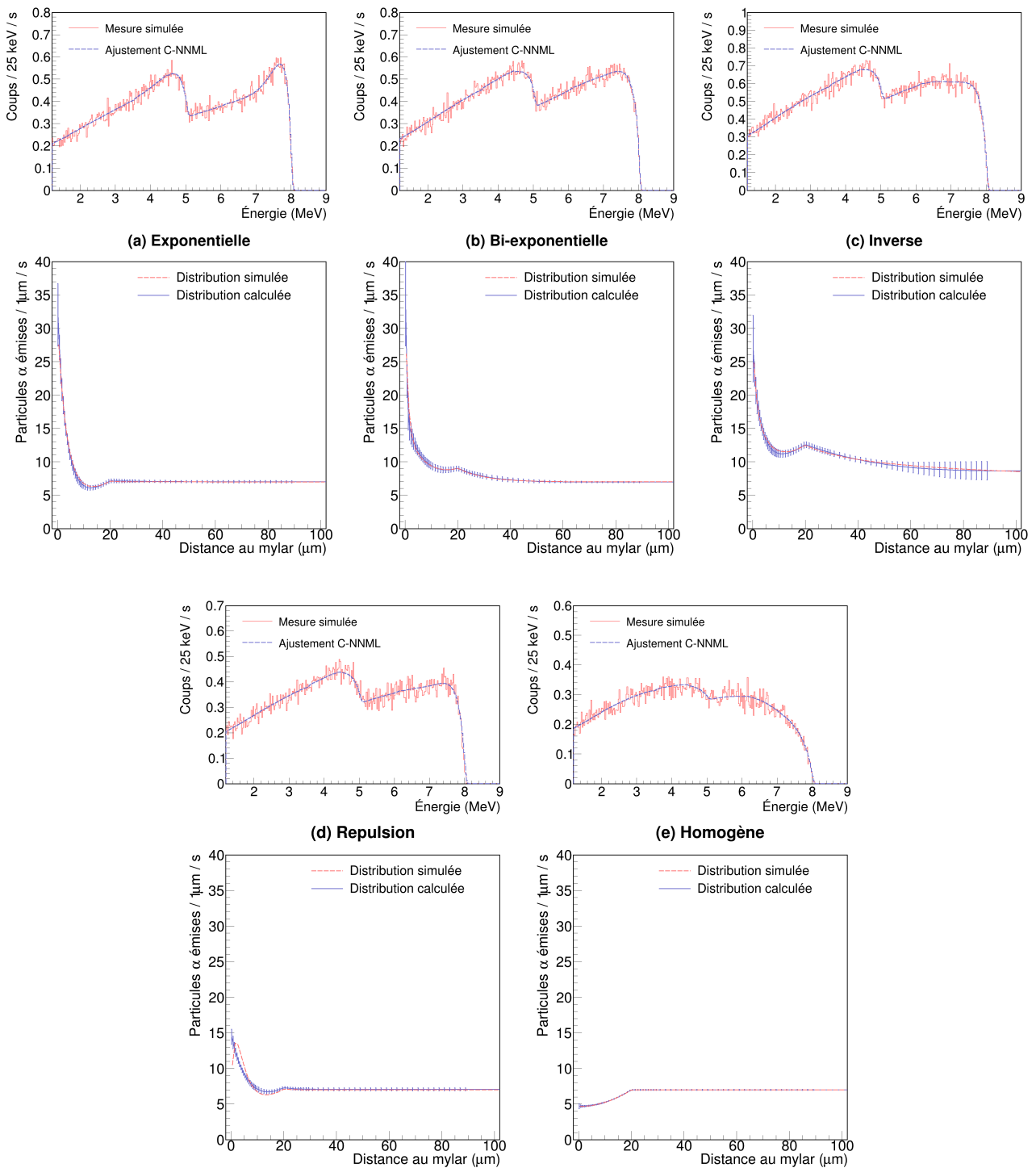


Figure 3.9 – Exemples de déconvolutions de spectres simulés avec les fonctions de distribution volumique des radionucléides exponentielle (a), bi-exponentielle (b), inverse (c), exponentielle avec répulsion (d) et homogène (e). Pour chaque distribution, la figure du haut représente le spectre simulé (en rouge pointillés) et l’ajustement obtenu par la méthode C-NNML (en violet). La figure du bas représente la distribution linéique déconvoluée (en violet), à comparer à la distribution simulée (en rouge, pointillés). Les barres d’erreurs sur les distributions déconvoluées correspondent à trois écarts-types estimés par méthode Monte-Carlo. L’activité totale des distributions simulées est d’environ 14 kBq.

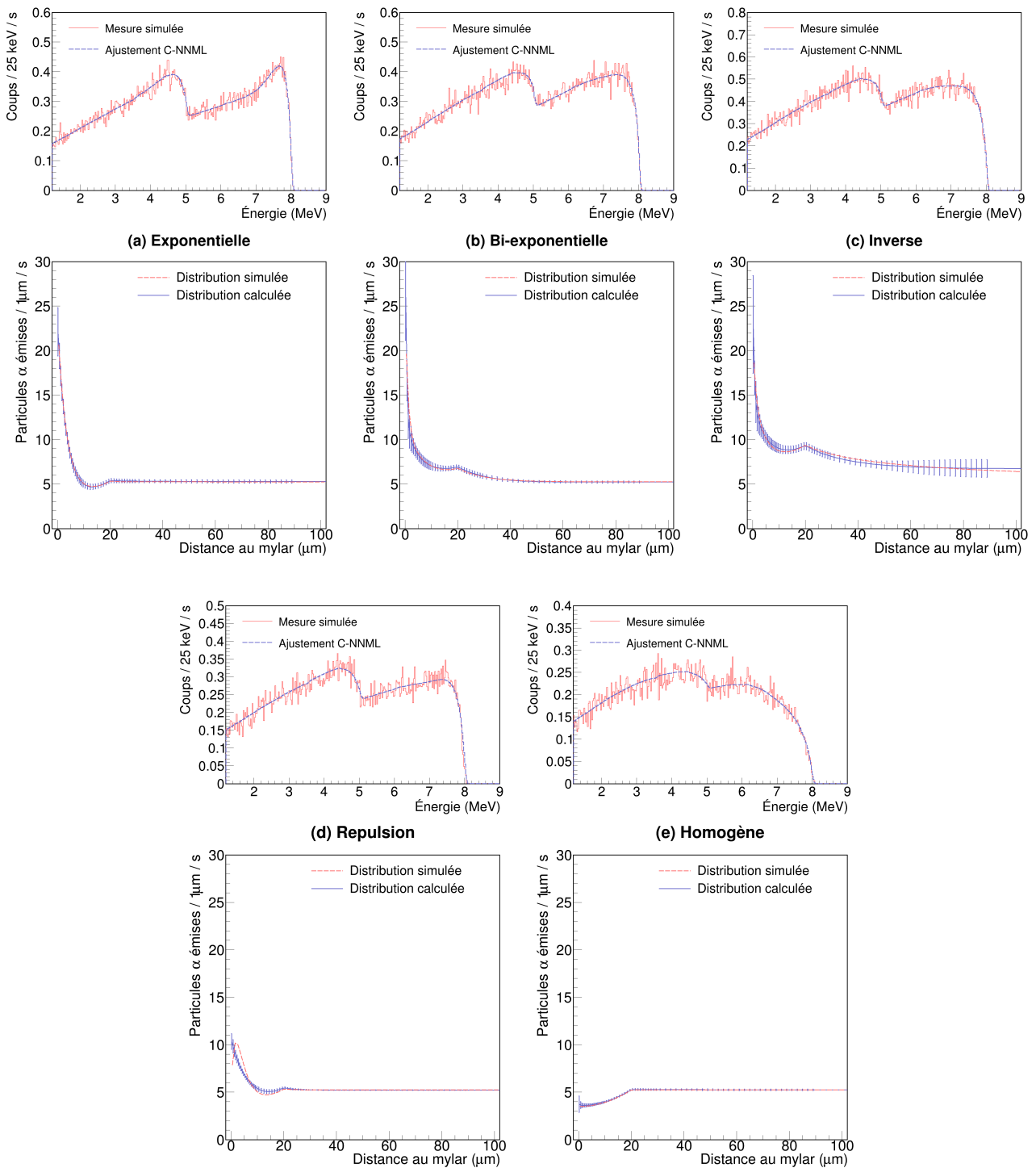


Figure 3.10 – Exemples de déconvolutions de spectres simulés avec les fonctions de distribution volumique des radionucléides exponentielle (a), bi-exponentielle (b), inverse (c), exponentielle avec répulsion (d) et homogène (e). Pour chaque distribution, la figure du haut représente le spectre simulé (en rouge pointillés) et l'ajustement obtenu par la méthode C-NNML (en violet). La figure du bas représente la distribution linéique déconvoluée (en violet), à comparer à la distribution simulée (en rouge, pointillés). Les barres d'erreurs sur les distributions déconvoluées correspondent à trois écarts-types estimés par méthode Monte-Carlo. L'activité totale des distributions simulées est d'environ 10 kBq.

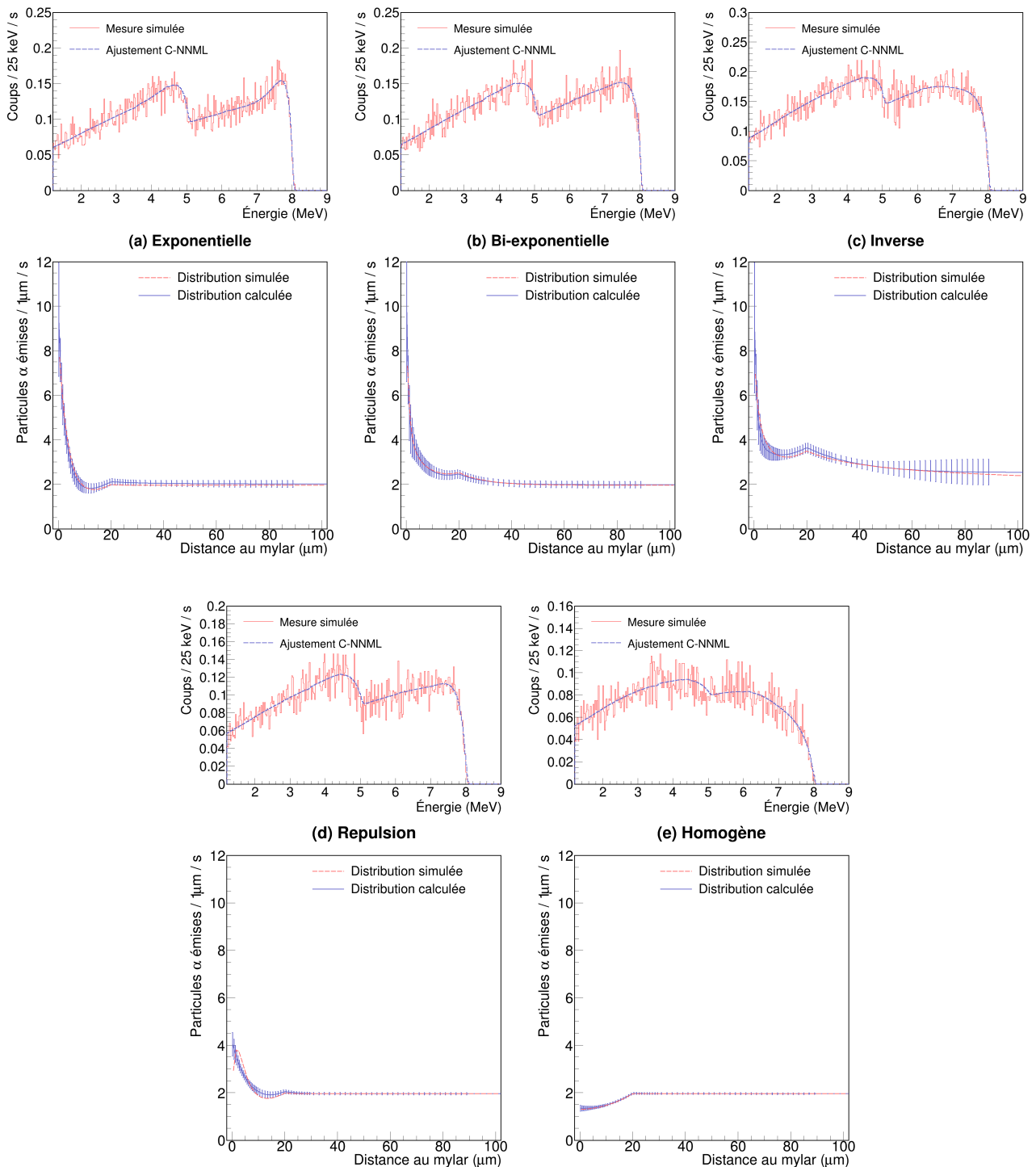


Figure 3.11 – Exemples de déconvolutions de spectres simulés avec les fonctions de distribution volumique des radionucléides exponentielle (a), bi-exponentielle (b), inverse (c), exponentielle avec répulsion (d) et homogène (e). Pour chaque distribution, la figure du haut représente le spectre simulé (en rouge pointillés) et l’ajustement obtenu par la méthode C-NNML (en violet). La figure du bas représente la distribution linéique déconvoluée (en violet), à comparer à la distribution simulée (en rouge, pointillés). Les barres d’erreurs sur les distributions déconvoluées correspondent à trois écarts-types estimés par méthode Monte-Carlo. L’activité totale des distributions simulées est d’environ 4 kBq.

3.2.2.2 Dose délivrée aux cellules

La dose délivrée aux cellules est déduite de la distribution spatiale en activité estimée à l'aide du formalisme du MIRD :

$$D = \sum_{i=1}^{n_c} a(z_i) d(z_i) \quad (3.41)$$

où $d(z_i)$ est la dose moyenne délivrée au milieu cellulaire par désintégration se produisant dans le cylindre à l'altitude z_i . Pour chacune des 150 simulations d'irradiations au ^{212}Pb , l'erreur relative sur la dose, c'est-à-dire la différence relative entre les doses simulées et les doses estimées, est toujours inférieure à 3 %, comme montré en **Figure 3.12**. En outre, les incertitudes associées à la dose délivrée sont distribuées normalement. L'erreur moyenne sur la dose est de $(-0,01 \pm 0,19)$ %, et les doses simulées se trouvent à moins d'un écart-type de la dose évaluée dans 104 cas (69,3 %), à moins de deux écart-types dans 141 cas (94,0 %) et à moins de trois écart-types dans 149 cas (99,3 %). Les **Figures 3.13** et **3.14** montrent qu'aucune des fonctions testées, même la fonction de distribution modélisant un terme de répulsion, n'est à l'origine d'un biais significatif en terme de dose.

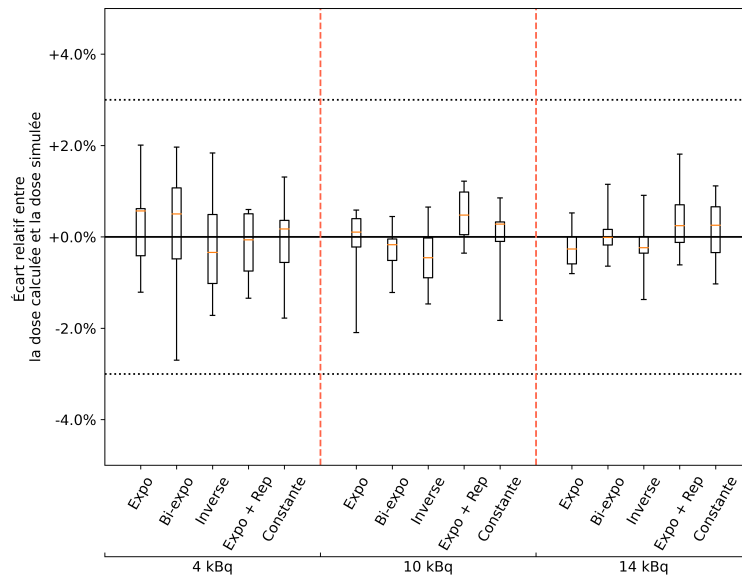


Figure 3.12 – Diagramme en boîtes des distributions des erreurs relatives sur la dose obtenue par la méthode de déconvolution, pour chaque modèle de distribution et chaque activité de ^{212}Pb simulés. La valeur médiane des erreurs est représentée par un trait horizontal orange. Chaque boîte correspond à dix spectres analysés.

Le calcul de dose distinguant la contribution des émissions α de celles des émissions non- α , l'erreur moyenne pour ces deux contributions a également été calculée. Aucun biais n'a pu être identifié pour les émissions α , avec une erreur moyenne évaluée à $(0,08 \pm 0,26)$ %, alors qu'un léger biais a été évalué pour les contributions des autres particules de $(-1,29 \pm 0,07)$ %. Ce biais s'explique une fois de plus par le fait que la distribution spatiale d'activité ainsi que la dose par désintégration soient toutes deux moyennées sur la partie supérieure du puits, qui représente une hauteur importante de 1910 μm .

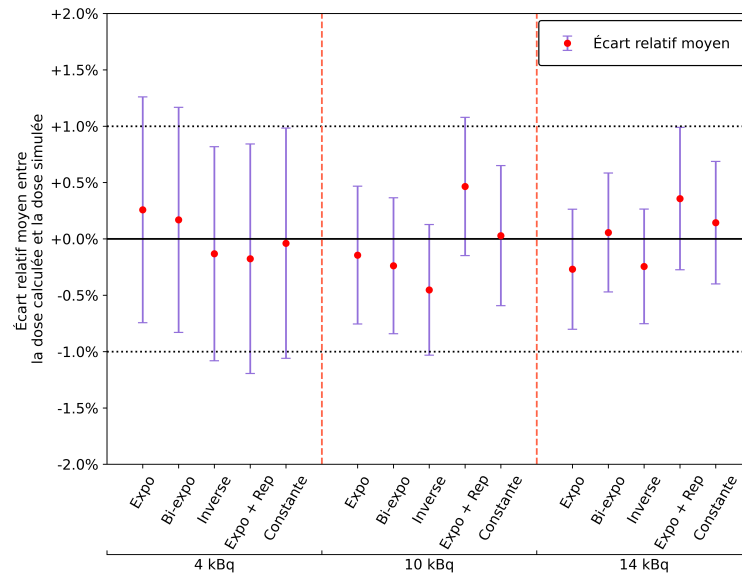


Figure 3.13 – Estimations des biais moyens pour chaque modèle de distribution de l'activité et chaque activité de ^{212}Pb simulés. Le biais est défini comme la valeur moyenne de l'erreur faite lors de l'estimation de la dose par la méthode de déconvolution développée. Les incertitudes associées aux biais correspondent à trois écart-types.

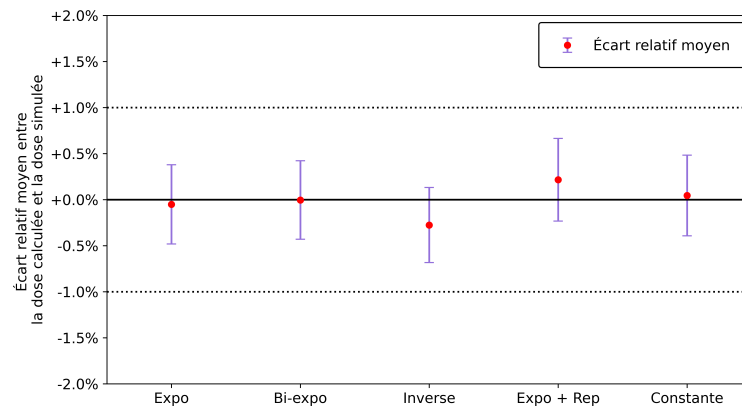


Figure 3.14 – Estimations des biais moyens pour chaque modèle de distribution de ^{212}Pb simulé. Le biais est défini comme la valeur moyenne de l'erreur faite lors de l'estimation de la dose par la méthode de déconvolution développée. Les incertitudes associées aux biais correspondent à trois écart-types.

3.2.3 Validation pour les essais simulés au ^{223}Ra

3.2.3.1 Distributions spatiales d'activité

Pour valider la méthode de déconvolution pour les irradiations au ^{223}Ra , 60 distributions d'activité ainsi que les doses correspondantes ont été simulées. Ces données sont associées à six types de distribution des différents radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra , chacune simulée dix fois. Pour chacune des distributions testées, un exemple de déconvolution et de l'ajustement spectral associé est présenté en **Figure 3.15**.

L'analyse des spectres obtenus par simulation d'irradiations avec le ^{223}Ra montre de plus grands écarts entre les distributions simulées et déconvoluées, associées à des incertitudes de plus grande amplitude que celles observées pour les simulations d'irradiations au ^{212}Pb . Cependant, pour chacune des six distributions, les spectres apparaissent tous correctement ajustés, ce qui suggère que des phénomènes de sur-ajustement ont lieu lorsque la déconvolution porte sur l'évaluation de plusieurs distributions superposées d'émetteurs α . Ces phénomènes de

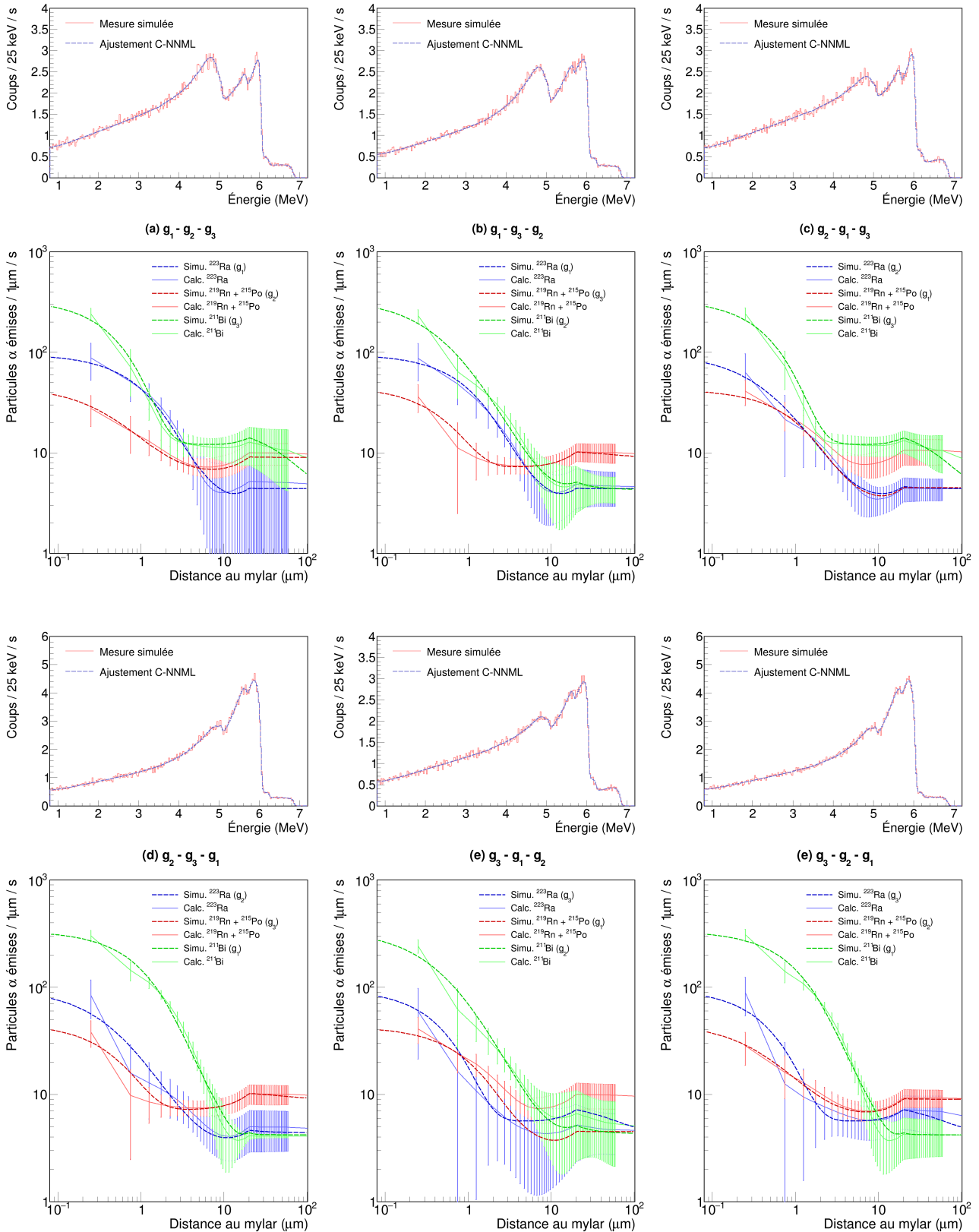


Figure 3.15 – Exemples de déconvolution de spectres simulés avec les 6 attributions possibles des fonctions de distribution bi-exponentielles, $g_1(z)$ et $g_3(z)$, et inverse, $g_2(z)$. Pour chaque sous-figure, le graphe du haut représente le spectre simulé (en rouge pointillés) et l'ajustement obtenu par la méthode C-NNML (en violet). Le graphe du bas représente les distributions linéiques d'activités déconvoluées (en traits pleins) pour chacun des groupes de radionucléides, à comparer aux distributions simulées (en pointillés). Les barres d'erreurs sur les distributions évaluées correspondent à trois écarts-types estimés. L'activité totale des distributions simulées est d'environ 9 kBq pour chacun des radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra .

sur-ajustement sont d'autant plus important que les incertitudes associées aux distributions évaluées, représentées à $\pm 3\sigma$ sur les graphes de la **Figure 3.15**, peuvent ne pas couvrir la distribution réelle.

La plus grande taille de la base de spectres élémentaires (168 dans le cas du ^{223}Ra , soit 56 spectres par groupe d'isotopes, contre 71 dans le cas du ^{212}Pb) est bien sûr un facteur explicatif du sur-ajustement observé, avec l'accroissement du nombre de degrés de liberté pour la déconvolution. Cependant, comme cela est confirmé par les résultats en terme de dose présentés juste après, des phénomènes de compensation entre les distributions des différents groupes d'isotopes prennent place, ce qui conduit non-seulement à un ajustement satisfaisant des spectres mais aussi à une évaluation fiable de la dose délivrée aux cellules.

La méthode de déconvolution C-NNML permet donc de déconvoluer les spectres acquis avec des radiopharmaceutiques à plus longue chaîne de décroissance, bien que les coefficients calculés soient associés à de plus grandes incertitudes et puissent parfois être incompatibles avec la distribution réelle. Cependant, les fonctions de distribution simulées suivant le modèle de l'**Equation 3.15**, et le modèle étant performant pour de telles distributions d'après la validation au ^{212}Pb , ces limitations sont attribuables davantage à la faible quantité d'information extractible des spectres qu'à la méthode C-NNML. Ce manque d'information est lié à deux aspects du ^{223}Ra . Premièrement, l'énergie maximale des particules α émises lors de la décroissance est de 7,450 MeV (contre 8,785 MeV pour le ^{212}Pb), réduisant la gamme d'altitudes dans le puits pouvant être sondée par spectroscopie α . En second lieu, les énergies associées aux différentes émissions α de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra (quatre émissions entre 5,539 MeV et 7,450 MeV) sont bien plus proches que pour le ^{212}Pb (une émission soit à 6,051 MeV ou à 8,785 MeV), ce qui entraîne un recouvrement plus important de l'information spectrale et donc un risque accru de sur-ajustement.

3.2.3.2 Dose délivrée aux cellules

Pour l'ensemble des 60 spectres analysés lors de cette validation, l'erreur sur la dose délivrée aux cellules est systématiquement inférieure à 2 %, comme montré en **Figure 3.16**. Cependant, il a été observé que les incertitudes associées aux doses estimées sont trop larges, avec un écart avec la dose simulée systématiquement inférieur à deux écarts-types. Une analyse plus poussée des résultats observés lors de la validation a montré que les estimations des contributions α et non- α sont biaisées, avec une sur-estimation systématique de la dose due aux émissions α de $(0,56 \pm 0,26) \%$ et une sous-estimation de la dose due aux autres émissions de $(-1,72 \pm 0,26) \%$. La sous-estimation de la contribution des autres types d'émissions est de même nature que celle observée pour le ^{212}Pb , c'est-à-dire liée au moyennage de la distribution spatiale et de la dose par désintégration (facteur S) sur la partie supérieure du puits, alors que la sur-estimation de la dose due aux émissions α est imputable aux phénomènes de sur-ajustement précédemment décrits. En effet, l'analyse de la différence entre les doses simulées et estimées pour chacun des groupes de radio-isotopes montre des erreurs importantes pour un spectre donné (allant de $-45,4 \%$ à $27,7 \%$), mais se compensant finalement, au vu des légers biais observés en **Figure 3.17**.

3.3 Conclusions

L'utilisation de l'algorithme C-NNML pour la déconvolution spectrale et l'analyse dosimétrique d'essais *in vitro* a été validée à partir de simulations d'irradiations au ^{212}Pb et au ^{223}Ra . Ces deux radionucléides possèdent chacun des intérêts différents pour le processus de validation. Le ^{212}Pb ne possède qu'une seule émission α dans sa chaîne de décroissance, dont l'énergie peut prendre deux valeurs très distinctes, à 6,1 ou 8,8 MeV. De fait, il représente un des cas les plus favorables pour valider l'algorithme de déconvolution. Le ^{223}Ra est, quant à lui, caractérisé par

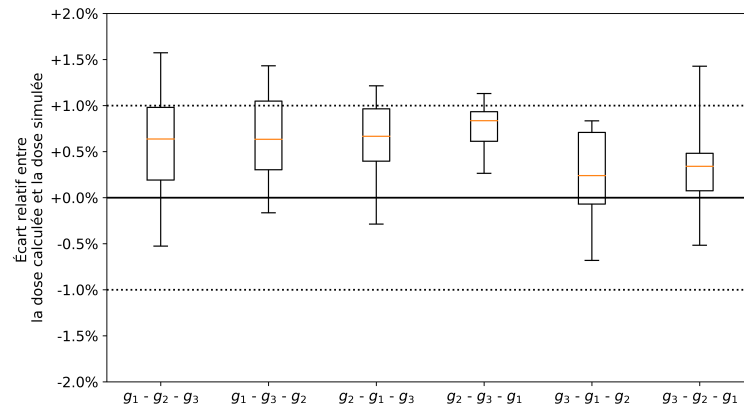


Figure 3.16 – Diagramme en boîtes des distributions des erreurs relatives sur la dose obtenue par la méthode de déconvolution, pour chaque modèle de distribution d'activité de ^{223}Ra simulé. La valeur médiane des erreurs est représentée par un trait horizontal orange. Chaque boîte correspond à dix spectres analysés.

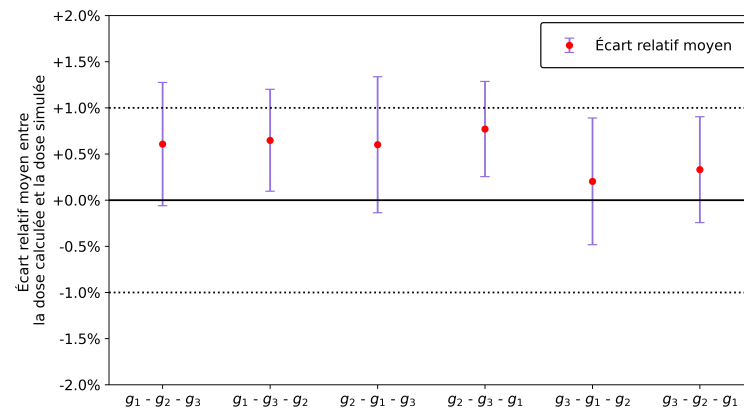


Figure 3.17 – Estimations des biais moyens pour chaque modèle de distribution de l'activité en ^{223}Ra . Le biais est défini comme la valeur moyenne de l'erreur faite lors de l'estimation de la dose par la méthode de déconvolution développée. Les incertitudes associées aux biais correspondent à trois écart-types.

une chaîne de décroissance beaucoup plus complexe, avec quatre émissions α successives dont les énergies les plus probables se trouvent dans une gamme en énergie plus réduite, entre 5,5 et 7,4 MeV. La déconvolution de spectres obtenus lors d'irradiations avec ce radionucléide constitue donc un cas beaucoup plus défavorable, avec un plus grand recouvrement de l'information spectrale, sur une plus petite gamme en énergie.

L'analyse des irradiations simulées avec du ^{212}Pb a montré que la méthode de déconvolution proposée permet de retrouver avec fiabilité la distribution d'activité présente dans les puits de culture si celle-ci suit les contraintes imposées à l'algorithme C-NNML. L'erreur sur la dose délivrée aux cellules commise par cette méthode ne dépasse pas **3%** pour un spectre donné. Le caractère aléatoire et non biaisé de cette erreur a été vérifié, ce qui indique qu'une dose totale évaluée pour une irradiation de plusieurs heures est fiable.

Les analyses des essais réalisés au ^{223}Ra montrent quant à eux les limites potentielles de la méthodologie. Bien que l'erreur réalisée en terme de dose soit systématiquement inférieure à **2%**, les erreurs beaucoup plus larges sur la distribution spatiale d'activité montrent que la quantité d'information exploitable par spectroscopie α peut être insuffisante dans le cas des radio-isotopes possédant une chaîne de décroissance plus complexe. Pour autant, la méthodologie est utile pour pouvoir distinguer les gradients de distribution des différents isotopes, et permet de s'affranchir de l'hypothèse d'homogénéité de la distribution des radionucléides dans les puits de culture afin

d'évaluer la dose délivrée aux cellules.

L'extension directe de ces conclusions à n'importe quel émetteur α nécessite cependant des précautions. Un processus de simulations d'irradiations pour la validation de la méthode pour un autre radiopharmaceutique est nécessaire, afin de mettre en évidence et de quantifier l'ampleur des biais observables sur la distribution spatiale de l'activité et sur la dose. Le nombre et les énergies des émissions α émises le long de la chaîne de décroissance ont probablement un impact significatif sur les performances de la méthode pour reconstruire la distribution spatiale, mais plus limité en terme de dosimétrie.

L'utilisation d'une spectroscopie des émissions β de la chaîne de décroissance d'un radio-isotope afin d'obtenir une source d'information sur la distribution supplémentaire a été envisagée et est discutée dans l'**Annexe C**. Cependant, le trop faible pouvoir d'arrêt des émissions β ne permet pas de distinguer avec précision différentes distributions d'activité spatiale. Ces émissions pourraient tout de même être exploitées, à l'aide d'un second détecteur, pour évaluer l'activité totale présente dans les puits de culture, dont l'incertitude expérimentale a un impact sur la contrainte d'activité appliquée dans la méthode C-NNML.

Enfin, ce nouvel algorithme C-NNML présente une faible durée de calcul, qui permet de rendre compatible l'analyse spectrale avec une dosimétrie *en ligne*. L'analyse d'un spectre intégrant 300 s ou 600 s d'irradiation prend en effet moins d'une seconde en l'absence d'évaluation des incertitudes par méthode Monte-Carlo. Bien que les incertitudes sur la dose soient sous-évaluées en l'absence d'une estimation des incertitudes sur la distribution spatiale, l'ensemble des tests réalisés au cours de la conception de l'algorithme a montré que la dose évaluée par le mode *rapide* est similaire à celle qui serait déterminée *a posteriori* avec le mode *complet*.

Le nouvel algorithme C-NNML développé constitue ainsi un outil fiable, rapide, et souple, et qui permettrait dans une implémentation future d'accéder en ligne à la distribution spatiale des radionucléides et donc à la dosimétrie au cours des essais *in vitro* de la RIV- α .

4 | Dosimétrie cellulaire par simulations Monte-Carlo

Sommaire du chapitre

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.1 | Grandeurs pour la caractérisation de l'irradiation | 100 |
| 4.1.1 | Facteurs S | 100 |
| 4.1.2 | Évaluation de la stochasticité de l'irradiation | 101 |
| 4.2 | Impact de la modélisation du milieu cellulaire sur les grandeurs dosimétriques | 102 |
| 4.2.1 | Modélisation des cellules | 102 |
| 4.2.2 | Impact de la confluence | 103 |
| 4.2.3 | Impact de la hauteur du milieu cellulaire | 104 |
| 4.3 | Application de la méthode dosimétrique | 108 |
| 4.3.1 | Distributions et conditions d'irradiation | 108 |
| 4.3.2 | Résultats | 109 |
| 4.4 | Conclusions | 113 |

Comme nous l'avons discuté au **Chapitre 1**, la dosimétrie des essais *in vitro* est un enjeu majeur pour l'établissement de modèles radiobiologiques et pour l'évaluation de la radiosensibilité des cellules à différentes sources d'irradiation. Lorsque l'irradiation provient de radiopharmaceutiques ou de radionucléides en dilution dans le milieu de culture, le caractère isotrope des émissions et la forte atténuation en énergie des rayonnements ionisants rend la dosimétrie fortement dépendante de la distribution spatiale des émissions et de son évolution au cours du temps.

Au chapitre précédent, une méthode de déconvolution spatiale des spectres en énergie acquis lors d'essais *in vitro* a été présentée, et permet de déterminer la distribution spatiale et temporelle des émetteurs α dans le milieu de culture. L'objectif de ce chapitre est de présenter la méthodologie permettant de convertir cette distribution spatiale en dosimétrie mais également en une caractérisation statistique de l'irradiation.

Dans une première partie, les grandeurs d'intérêt caractérisant l'irradiation et leur simulation seront introduites. La seconde partie présentera ensuite l'impact de la modélisation du milieu cellulaire sur la simulation de ces grandeurs d'intérêt pour le ^{212}Pb , en étudiant deux variables importantes pour la caractérisation de la géométrie du milieu cellulaire : la confluence (c'est-à-dire la proportion de la surface du puits occupé par des cellules) et la hauteur des cellules. Ces grandeurs permettront d'en déduire un ordre de grandeur de l'incertitude sur la caractérisation dosimétrique liée uniquement à la modélisation du milieu cellulaire, qui s'ajoute à l'incertitude due à la méthode de déconvolution précédemment évaluée.

Enfin, dans une troisième partie, nous introduirons un exemple d'application de la méthode de caractérisation dosimétrique pour des distributions spatiales d'activité de référence, afin d'évaluer l'utilisation des grandeurs introduites dans ce chapitre. L'incertitude sur la dosimétrie associée à la méthodologie présentée dans ce chapitre ainsi qu'à la modélisation du milieu cellulaire sera enfin estimée en appliquant la méthode à plusieurs configurations de cultures cellulaires.

4.1 Grandeurs pour la caractérisation de l'irradiation

Les modèles radiobiologiques nécessitent le calcul de la dose délivrée aux cellules lors de l'irradiation. Ce paragraphe présente la simulation des facteurs S utilisés dans le calcul de la dose délivrée selon le formalisme du MIRD introduit au **Chapitre 1**, ainsi que d'autres grandeurs permettant de déterminer l'utilité de la mise en place d'une étude microdosimétrique.

4.1.1 Facteurs S

A partir de la distribution spatiale des émetteurs α déterminée à l'aide de la nouvelle méthode de déconvolution spatiale présentée au **Chapitre 3**, la dose reçue par le milieu cellulaire peut être déterminée à l'aide de facteurs S correspondant à la dose moyenne reçue par désintégration dans chacun des volumes élémentaires constituant le schéma de discrétisation du milieu de culture présenté en **Table 3.1**. Si pour un spectre donné, acquis entre les instants t_1 et t_2 , l'activité moyenne cumulée dans les n_c différents cylindres d'altitudes z_i est notée $A(z_i, t_1, t_2)$, alors la dose moyenne reçue par les cellules est définie par le formalisme du MIRD comme :

$$D(t_1, t_2) = \sum_{i=1}^{n_c} D(z_i, t_1, t_2) = \sum_{i=1}^{n_c} A(z_i, t_1, t_2) \cdot S(z_i) \quad (4.1)$$

Les facteurs S peuvent être déterminés à l'aide de simulations Geant4, en reprenant la géométrie discrétisée du puits de culture précédemment introduite (**Chapitre 3, §3.1.2**). En notant n_p le nombre de particules simulées, et $d_k(z_i)$ la valeur de la dose délivrée aux cellules pour la k -ème particule simulée lors du calcul du facteur $S(z_i)$, la variance sur la dose délivrée aux cellules par désintégration, $d(z_i)$, est donnée par :

$$\sigma^2(d(z_i)) = \frac{1}{n_p - 1} \left[\sum_{k=1}^{n_p} d_k(z_i)^2 - \frac{1}{n_p} \left(\sum_{k=1}^{n_p} d_k(z_i) \right)^2 \right] \quad (4.2)$$

Du fait de l'émission isotrope des particules, de nombreuses particules émises lors des désintégrations n'atteignent pas le milieu cellulaire. La variance sur la dose délivrée par désintégration est donc généralement plusieurs ordres de grandeurs supérieurs à celle du facteur S, dont l'incertitude est donnée par :

$$\sigma^2(S(z_i)) = \sigma^2(\bar{d}(z_i)) = \frac{\sigma^2(d(z_i))}{n_p} \quad (4.3)$$

Pour la simulation des facteurs S et des autres grandeurs introduites dans la suite de ce chapitre, les émissions simulées intègrent l'ensemble des émissions α et β^- , ainsi que toutes les particules issues de la désexcitation des noyaux fils. Les désexcitations incluent notamment l'émission d'électrons Auger mais aussi de noyaux de reculs, qui, si elles se produisent à proximité des cellules, peuvent contribuer significativement à la dose délivrée. Les émissions de particules ont donc été simulées à l'aide de la liste de physique RadioactiveDecay de Geant4, qui simule le type et l'énergie des émissions selon les rapports d'embranchement théoriques associés aux désintégrations des noyaux considérés, ainsi que les processus de désexcitation des noyaux fils.

Les grandeurs ont donc, pour chaque noyau, été séparées par contribution des désintégrations α et β^- . Elles ont été calculées pour les différents radionucléides des chaînes de décroissance du ^{223}Ra et du ^{212}Pb .

4.1.2 Évaluation de la stochasticité de l'irradiation

Le formalisme du MIRD permet d'accéder à la dose délivrée au milieu cellulaire. Par définition, les facteurs S sont des caractérisations moyennes du dépôt d'énergie des irradiations dans les cellules. Pourtant, en RIV- α , du fait du fort TEL des particules α la dose est généralement délivrée par un faible nombre d'événements, qui peut fluctuer d'une cellule à l'autre.

Considérons en effet un volume d'eau de $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$, traversé par des traces de particules α de TEL $80 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ou par des particules β^- de TEL $0,2 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Pour délivrer une dose de 1 Gy, en considérant la trace des particules comme rectiligne et de longueur $10 \mu\text{m}$, seules 8 traces de particules α sont nécessaires contre plus de 3000 traces de particules β^- . Pour une dose moyenne délivrée donnée, la fluctuation de la dose délivrée à chacune des cellules sera donc beaucoup plus importante pour une irradiation par des particules α que par des émissions β^- .

Cette fluctuation de la dose délivrée aux différentes cellules peut se traduire par une fluctuation des effets biologiques observés. Dans ce cas, la pertinence de la dose moyenne comme indicateur de l'effet biologique aux cellules devient limitée, et une approche microdosimétrique, caractérisant avec plus de précision la fluctuation de la dose reçue par les différentes cellules, peut s'avérer intéressante. Pour autant, comme nous l'avons introduit au **Chapitre 1**, l'approche microdosimétrique peut être lourde à mettre en place, et nécessite davantage de précision sur la modélisation du milieu cellulaire. Afin de déterminer la pertinence ou non de réaliser une étude microdosimétrique de l'irradiation, un critère proposé par la Commission internationale des unités et mesures radiologiques (ICRU) et repris par le Comité du MIRD est d'évaluer si la dose délivrée à chacune des différentes cellules fluctue à plus ou moins de 20 % [160, 161].

Cette fluctuation peut être évaluée en simulant, en plus des facteurs S, les valeurs moyennes de la dose aux cellules par trace $\bar{\zeta}_1$ et du carré de la dose reçue $\bar{\zeta}_1^2$. L'incertitude sur la valeur de $\bar{\zeta}_1$, notée $\sigma(\bar{\zeta}_1)$, est également évaluée similairement aux facteurs S (**Équation 4.3**)¹. Toutes ces grandeurs ont été évaluées pour le ^{212}Pb à l'aide de simulations Geant4.

La connaissance du facteur S, de l'activité et de la dose par trace pour les particules émises en z_i permet de déterminer le nombre moyen de traces traversant chaque cellule $n(z_i)$:

$$\bar{n}(z_i, t_1, t_2) = \frac{A(z_i, t_1, t_2) \cdot S(z_i)}{\bar{\zeta}_1(z_i)} \quad (4.4)$$

La variance sur la dose reçue par les cellules liée à l'activité en z_i est alors donnée par :

$$\sigma^2(D(z_i, t_1, t_2)) = n(z_i, t_1, t_2) \cdot \bar{\zeta}_1^2 \quad (4.5)$$

La variance sur la dose totale reçue, issue des particules émises de toutes les altitudes z_i , s'obtient finalement comme la somme de l'ensemble des variances individuelles :

$$\sigma^2(D(t_1, t_2)) = \sum_{i=0}^{n_c} \sigma^2(D(z_i, t_1, t_2)) \quad (4.6)$$

La fluctuation sur le nombre de coups et la dose reçus par les cellules est ainsi facilement accessible.

1. La notation conventionnelle de la dose par coup est z_1 . Elle a été changée ici pour éviter toute confusion avec z_i , qui désigne la hauteur dans le milieu de culture dans cette étude.

4.2 Impact de la modélisation du milieu cellulaire sur les grandeurs dosimétriques

Lors de l'évaluation de la dosimétrie associée aux essais *in vitro* de la RIV, qui se fait à l'aide de simulations Monte-Carlo, la modélisation géométrique du milieu cellulaire semble avoir un impact majeur sur les conclusions pouvant être tirées sur la radiosensibilité des cellules tumorales à l'irradiation. Dans le cas d'essais de radiopharmaceutiques émetteurs β^- internalisés par les cellules, Tamborino *et al.* ont montré des variations sur les facteurs S calculés évoluant exponentiellement avec la taille de la cellule et de ses organelles, et à taille constante, des variations de la dose à la cellule pouvant atteindre jusqu'à 65 % selon la géométrie modélisée [76]. Dans le cas d'émetteurs Auger, Salim *et al.* ont quant à eux montré des variations sur le calcul des facteurs S aux noyaux pouvant atteindre 28 %.

La modélisation géométrique du milieu cellulaire est de façon générale complexe. Elle nécessite des méthodes d'imagerie cellulaire permettant une modélisation précise, ainsi qu'une prise en compte de la variabilité de la géométrie des différentes cellules présentes dans un même puits de culture. Nous nous intéresserons dans ce paragraphe à une étude préliminaire de l'impact de deux caractéristiques simples du milieu cellulaire sur l'évaluation des facteurs S et ζ_1 depuis le milieu de culture vers la cellule ou le noyau : la confluence du milieu cellulaire, et sa hauteur. La dose aux cellules et la dose aux noyaux sont généralement associées, respectivement, à deux grandeurs quantifiant l'impact biologique de l'irradiation : la survie cellulaire et la fréquence de cassures double brins de l'ADN.

4.2.1 Modélisation des cellules

Les cellules ont été modélisées comme des demi-ellipsoïdes. Ces volumes sont caractérisés par 3 grandeurs caractéristiques illustrées en **Figure 4.1** : r_x et r_y , les demi-axes caractérisant la surface occupée au fond du puits par la cellule, et r_z , sa hauteur. Par convention, r_x désigne ici le plus grand des deux demi-axes.

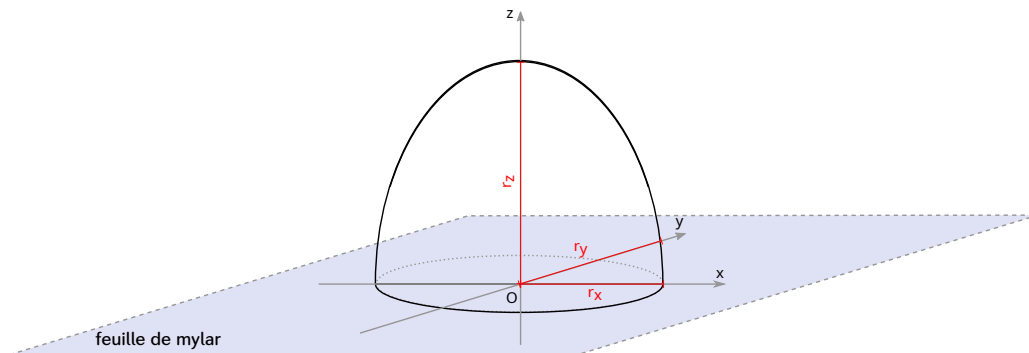


Figure 4.1 – Grandeurs caractéristiques d'une demi-ellipsoïde, utilisées pour la modélisation sous Geant4 des cellules individuelles.

L'évaluation de r_x et de r_y a été obtenue à partir d'images en microscopie de cellules MDA-MB-231-Br. Une des images est présentée en **Figure 4.2**. Une étude statistique des dimensions de plus de 40 cellules a été réalisée. Les valeurs moyennes des demi-axes mesurés sont de $r_x = (12,2 \pm 1,9) \mu\text{m}$ et $r_y = (9,45 \pm 1,27) \mu\text{m}$.

Quant à la dimension r_z , une image de microscopie confocale d'une cellule MDA-MB-231-Br, présentée dans l'étude préliminaire à cette thèse [78], a permis d'évaluer la hauteur moyenne du milieu cellulaire à $20 \mu\text{m}$. Comme illustré en **Figure 4.1**, le réalisme de cette modélisation peut être discutable, la géométrie cellulaire attendue devant normalement davantage s'étendre dans le plan du puits que sur l'axe vertical. Cette observation a motivé l'étude présentée en **Section 4.2.3** de l'impact de la modélisation de r_z sur le calcul des facteurs S.

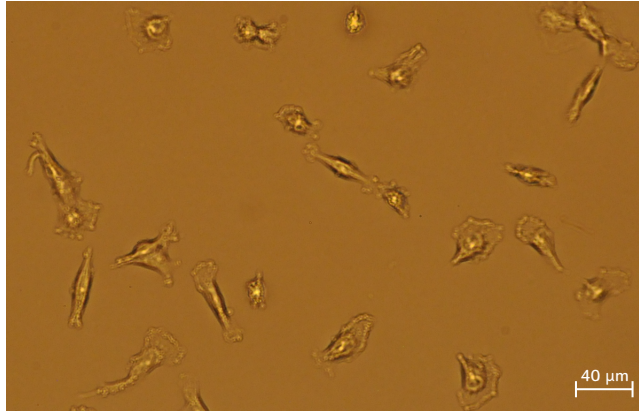


Figure 4.2 – Microscopie par contraste de phases de cellules MDA-MB-231-Br.

Au sein des cellules, un volume correspondant au noyau a également été modélisé comme une demi-ellipsoïde dont la position du centre coïncide avec celle de la cellule. Similairement, les images cellulaires à disposition ont été utilisées pour évaluer les dimensions r_x et r_y associées aux noyaux cellulaires. Les dimensions obtenues sont $r_x = (6,61 \pm 1,27) \mu\text{m}$ et $r_y = (4,92 \pm 0,91) \mu\text{m}$. r_z a été fixé comme égal à 11 nm pour assurer une forme relativement similaire aux cellules et aux noyaux.

Les cellules ont été placées pour occuper de façon homogène le puits de culture, à l'aide de l'algorithme de positionnement *sunflower head* (voir **Figure 2.26, p65**). L'ensemble des résultats présentés dans les paragraphes suivant ont été obtenus pour des simulations de désintégrations des différents radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{212}Pb .

4.2.2 Impact de la confluence

Le premier paramètre étudié ici est la confluence du milieu cellulaire lors de l'irradiation. La confluence est une grandeur correspondant au pourcentage de la surface occupée par les cellules au fond du puits. Elle a donc un impact sur le volume occupable par les radiopharmaceutiques non-intériorisés dans le milieu de culture. Dans le cas de la modélisation cellulaire proposée dans ce chapitre, avec les puits de culture utilisés dans le système de mesure (de diamètre 15 mm), la confluence est évaluée comme :

$$\text{Confluence} = N_{\text{cell}} \cdot \frac{S_{\text{cell}}}{S_{\text{puits}}} = N_{\text{cell}} \cdot \frac{r_x \times r_y}{(7,5 \text{ mm})^2} \quad (4.7)$$

où N_{cell} désigne le nombre de cellules dans le puits, S_{cell} leur surface de contact avec le mylar et S_{puits} la surface du puits de culture. Pour évaluer l'influence de la confluence cellulaire sur la dosimétrie, les facteurs S, les valeurs de ζ_1 et de ζ_1^{-2} ont été simulées sous GEANT4 pour cinq valeurs de confluence, données en **Table 4.1**. Pour une confluence supérieure à 60 %, les volumes associés aux cellules commencent à se superposer dans la simulation, ce qui fausse les valeurs grandeur calculées. La modélisation de déformations liées aux contacts cellulaires devient alors nécessaire, et n'a pas été réalisée dans cette étude.

Les **Figures 4.3c** à **4.3f** proposent une comparaison de l'évolution des facteurs S et ζ_1 à la cellule entière, en fonction de l'altitude d'émission dans le fond du puits, en distinguant les désintégrations α et β^- .

Les évolutions des facteurs S en fonction de z_i , pour les deux types de désintégration, suivent une tendance similaire pour l'ensemble des confluences testées. Dans les 20 premiers micromètres, qui correspondent à la zone du milieu de culture occupé partiellement par les cellules, les facteurs S croissent vers un maximum avant de décroître. L'amplitude de ce phénomène croît et la position du maximum décroît avec la confluence cellulaire. Pour les deux types de désintégration,

la variation du facteur S en fonction de la confluence est plus importante dans les premiers 10 micromètres, et atteint 20 % pour $z_i = 5 \mu\text{m}$ entre les deux confluences extrêmes présentées dans le cas des désintégrations α . Cette allure s'explique par l'efficacité géométrique de l'irradiation qui augmente pour une position donnée avec la densité du milieu cellulaire, du fait d'une plus forte proximité des lieux d'émissions avec les cibles irradiées. Ceci permet d'expliquer la superposition des courbes de confluence pour les émissions se produisant au-delà du milieu cellulaire (c'est-à-dire de $20 \mu\text{m}$), où l'efficacité géométrique pour une cellule donnée devient indépendante de la densité cellulaire.

Au delà de $20 \mu\text{m}$, le facteur S relatif aux désintégrations α décroît significativement avec la hauteur d'émission dans le milieu de culture, du fait d'une plus faible probabilité pour une émission d'atteindre la cellule. Cet effet est moins intense dans le cas des désintégrations β^- , les traces non-rectilignes des électrons permettant de délivrer une dose aux cellules pour davantage d'incidences initiales. Pour autant, la valeur des facteurs S liés aux désintégrations β^- reste comprise entre 2 % (en $z_i = 0 \mu\text{m}$) et 13 % (en $z_i = 90 \mu\text{m}$) des valeurs relatives aux désintégrations α , du fait des valeurs de TEL plus élevées de ces dernières. Il peut être noté que dans le dernier volume du schéma de discrétisation, correspondant à la partie non-analysable par spectroscopie α (entre 90 et $2000 \mu\text{m}$), la dose par désintégration β^- est 10 fois supérieure à celle liée aux désintégrations α ($(1,0196 \pm 0,0003) \cdot 10^{-7} \text{ mGy}$ contre $(1,030 \pm 0,009) \cdot 10^{-8} \text{ mGy}$) du fait de la plus grande portée des émissions β^- .

Les courbes décrivant l'évolution des énergies spécifiques ζ_1 diffèrent significativement selon que l'on considère les désintégrations α et β^- . Dans le cas des désintégrations α , l'allure générale pour les différentes valeurs de confluence testées consiste en deux étapes successives de croissance puis de chute des valeurs de ζ_1 . Ces fronts correspondent en réalité aux pics de Bragg des deux énergies possibles pour la particule α émise dans le schéma de décroissance du ^{212}Pb , convolués par la hauteur du milieu cellulaire traversée. Quant aux allures des courbes dans les 20 premiers micromètres, qui ne se superposent pas pour les différentes valeurs de confluence, la variation des valeurs de ζ_1 est due à une variation du LET moyen des particules α lorsqu'elles atteignent le milieu cellulaire en fonction de la confluence. Plus la confluence est élevée, plus les émissions α sont proches des cellules, entraînant une énergie initiale lors de la traversée de la cellule, des valeurs de TEL et donc d'énergie spécifique plus faibles. Ceci explique également la superposition des courbes pour le cas des désintégrations β^- , pour lesquelles le TEL ne varie pas avec l'énergie de la particule incidente.

Les facteurs S et les énergies spécifiques ζ_1 ont également été évaluées pour le noyau, et sont représentés en **Figures 4.3a** et **4.3b** pour les désintégrations α .

Pour les deux grandeurs, dans la zone à proximité des cellules, les valeurs calculées sont sujettes à une dispersion plus réduite que pour la cellule entière, en raison de la distance minimale non-nulle entre le noyau et le lieu d'émission du fait de la non-internalisation. Les variations des effets géométriques et des valeurs de TEL sont ainsi plus faibles, résultant en une plus faible fluctuation des grandeurs dosimétriques. Notons également que la plus faible hauteur du noyau, comparativement à la cellule, se traduit en un pic de Bragg plus prononcé pour l'évolution de ζ_1 en fonction de la hauteur d'émission. Enfin, les valeurs de ζ_1 pour le noyau sont beaucoup plus élevées que pour la cellule entière, en raison des dimensions associées bien plus réduites. Malgré une efficacité géométrique plus faible que pour la cellule entière, cette dose beaucoup plus élevée par désintégration se traduit en facteurs S légèrement plus élevés pour le noyau.

4.2.3 Impact de la hauteur du milieu cellulaire

La hauteur des cellules est un autre paramètre influant significativement sur la localisation des radiopharmaceutiques dans le milieu de culture. C'est en effet pour les positions d'émissions au-delà de la hauteur des cellules que les facteurs S et les énergies spécifiques ζ_1 deviennent indépendants de la confluence cellulaire.

Tableau 4.1 – Valeurs de confluences et nombre de cellules modélisées pour la simulation Monte-Carlo des grandeurs utiles à la dosimétrie des essais *in vitro*. La géométrie cellulaire utilisée est celle illustrée en **Figure 4.1**.

| Confluence (%) | 2,5 % | 10 % | 20 % | 35 % | 60 % |
|--------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
| Nombre de cellules | 12 197 | 48 790 | 97 580 | 170 765 | 292 740 |

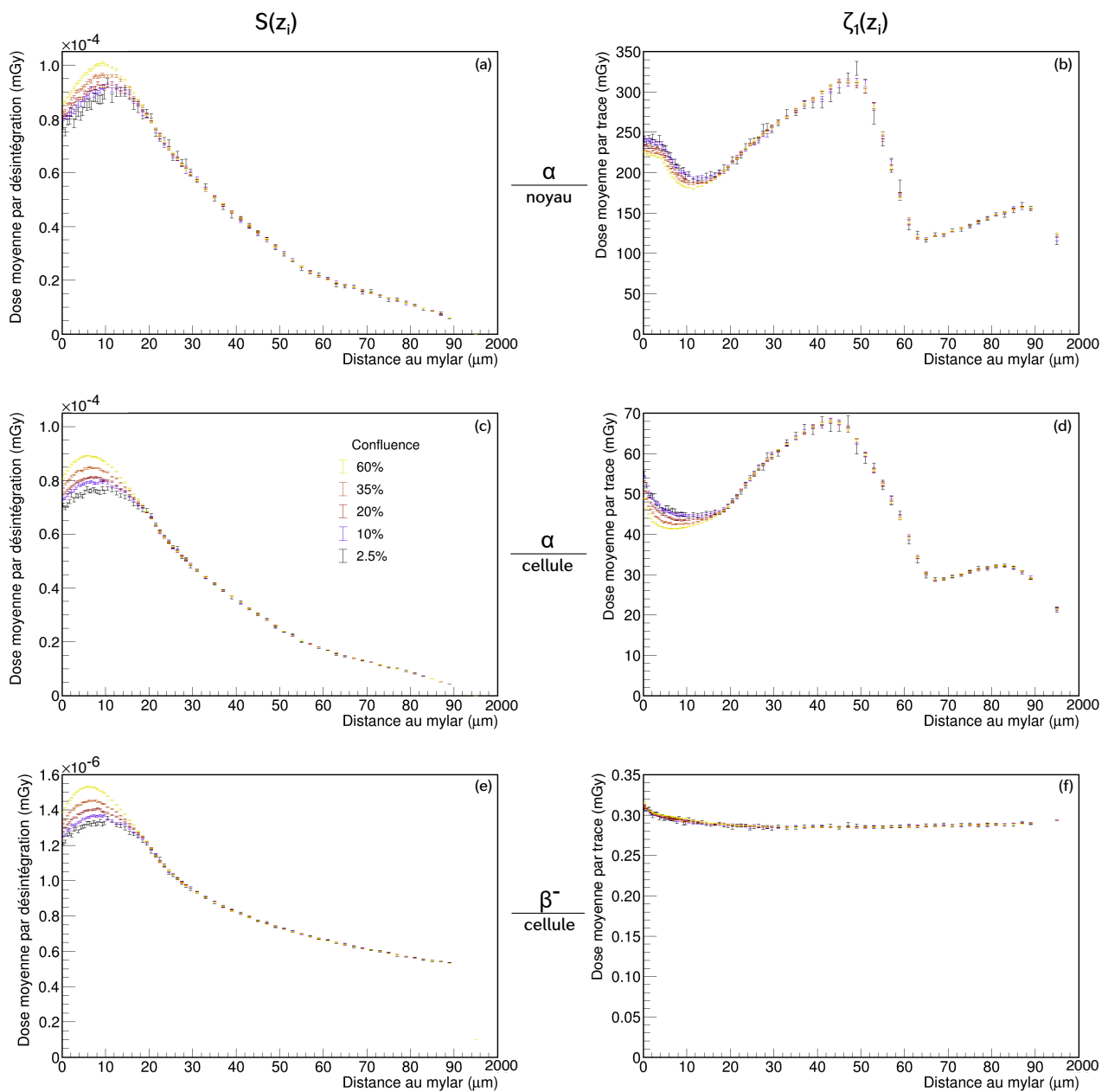


Figure 4.3 – Simulation des facteurs S et des évènements spécifiques ζ_1 pour le noyau (a-b) ou la cellule entière (c-f), à différentes confluences en fonction de la position de désintégration dans le puits, pour les désintégrations α (a-d) ou β^- (e-f). Les barres d'erreurs sont données à 1σ .

Les facteurs S, les valeurs de ζ_1 et de ζ_1^2 ont donc été simulés sous GEANT4 pour cinq hauteurs de cellule et de noyau illustrées en **Table 4.2**. Pour l'ensemble des configurations testées, le ratio entre le volume des cellules et des noyaux est identique. La confluence a été fixée à 12,5 % pour l'ensemble des simulations. Les **Figures 4.5c** à **4.5f** comparent l'évolution des facteurs S et ζ_1 pour la cellule entière en fonction de la hauteur des cellules, pour les deux types de désintégration.

Pour les deux types de désintégration, les courbes associées aux facteurs S ont des allures similaires. Dans les premiers micromètres correspondant à la hauteur de la cellule, la croissance puis la décroissance des facteurs S n'a pas la même allure selon la configuration testée, avec une discontinuité claire au-delà de la hauteur de la cellule lorsque celle-ci est de $5\ \mu\text{m}$. De plus, dans cette zone, la valeur des facteurs S varie significativement avec la hauteur du milieu cellulaire, avec jusqu'à 28 % de différence (en $z_i = 5\ \mu\text{m}$) entre $r_z = 5\ \mu\text{m}$ et $r_z = 20\ \mu\text{m}$ ($(10,19 \pm 0,06) \cdot 10^{-7}\ \text{mGy}$ contre $(7,94 \pm 0,03) \cdot 10^{-7}\ \text{mGy}$).

Pour les désintégrations au delà des cellules, les courbes de facteur S ne se superposent pas. Une partie du décalage est liée à la distance minimale entre le milieu cellulaire et les isotopes, qui dépend de la valeur de r_z . Cependant, l'écart horizontal observé entre les différentes courbes ne correspond pas à l'écart entre les différentes valeurs de r_z testées, ce qui laisse supposer que d'autres effets géométriques liés aux volumes cellulaires modélisés sont en jeu.

L'écart observé est beaucoup plus important pour les courbes de ζ_1 . Pour les deux types de désintégration, la dose délivrée par trace est inversement proportionnelle à la hauteur du milieu cellulaire dans les premiers micromètres. Pour les émissions au delà de r_z , cet effet de proportionnalité s'atténue progressivement, et les courbes de ζ_1 sont convoluées avec la variation de TEL pour les deux types de désintégrations. L'allure des deux jeux de courbes est liée à la variation de l'incidence des particules émises atteignant les cellules en fonction de la hauteur d'émission z_i , et de r_z , comme illustré en **Figure 4.4**.

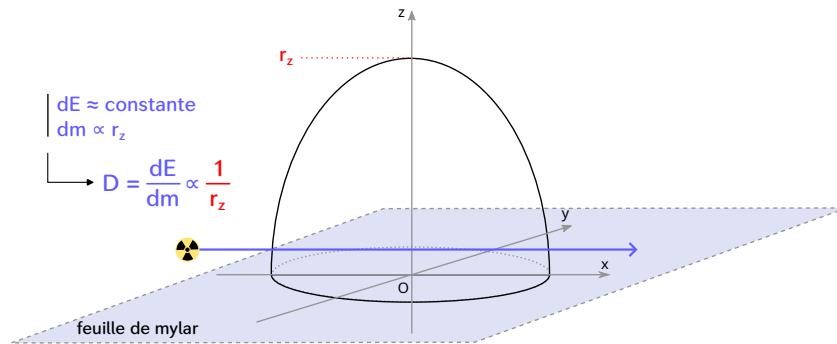


Figure 4.4 – Évolution des évènements spécifiques ζ_1 aux cellules en fonction de leur hauteur r_z . Pour des traces de particules rectilignes et normales à l'axe z , émises depuis $z_i < r_z$, la dose délivrée depuis une hauteur d'émission est proportionnelle à $1/r_z$.

Émission en $z_i \leq r_z$ – Au vu des dimensions des cellules par rapport aux puits de culture, la plupart des irradiations ont lieu à incidence proche de l'horizontale. Ainsi, l'énergie délivrée demeure constante quel que soit la valeur de r_z , alors que la masse de la cellule est proportionnelle à r_z , ce qui se traduit en une évolution linéaire avec $1/r_z$ de la dose délivrée par trace. Cette règle de proportionnalité est approximative dans les premiers micromètres, puisque toutes les incidences des traces ne sont pas strictement normales à l'axe z , mais le comportement global reste visible sur les **Figures 4.5d** et **4.5f**.

Émission en $z_i \geq r_z$ – Ce défaut de proportionnalité en $1/r_z$ augmente ensuite avec la hauteur d'émission, du fait du changement de la distribution des incidences qui inclue des

Tableau 4.2 – Hauteurs des cellules et des noyau utilisées pour la simulation Monte-Carlo des grandeurs utiles à la dosimétrie des essais *in vitro*. La géométrie cellulaire utilisée est celle illustrée en **Figure 4.1**.

| | | | | |
|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Hauteur des cellules | 5 μm | 10 μm | 15 μm | 20 μm |
| Hauteur des noyaux | 2,75 μm | 5,5 μm | 8,25 μm | 11 μm |

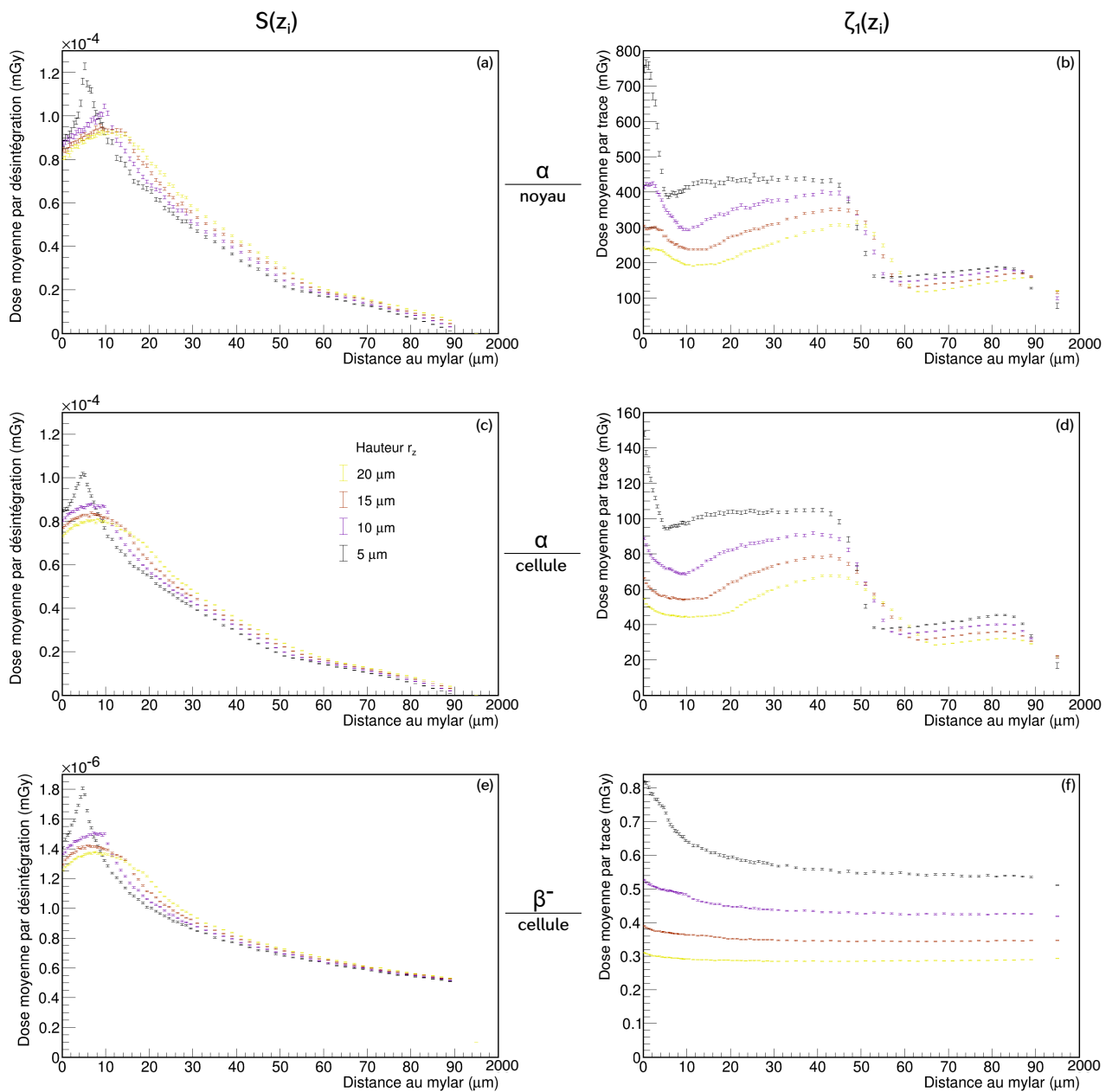


Figure 4.5 – Simulation des facteurs S et des événements spécifiques ζ_1 pour le noyau (a-b) ou la cellule entière (c-f), pour différentes hauteurs de cellules en fonction de la position de désintégration dans le puits, pour les désintégrations α (a-d) ou β^- (e-f). Les barres d'erreurs sont données à 1σ .

irradiations à incidence plus proche de la verticale. En effet, pour une irradiation parfaitement verticale, dans une approximation simpliste, l'énergie déposée serait proportionnelle à r_z , ce qui résulte en une dose constante (à la variation du TEL près) pour toutes les hauteurs de milieu cellulaire. Cependant, au regard de la dimension des cellules par rapport à la portée des émissions α et β^- , l'incidence moyenne n'a pas de composante verticale majeure, et une distinction claire entre les courbes de ζ_1 est apparente.

Les pics de Bragg observés sont également plus nets lorsque la hauteur de la cellule diminue, ce qui est cohérent avec l'observation précédente selon laquelle le pic de Bragg est convolué sur une largeur correspondant à la hauteur du milieu cellulaire.

Enfin, comme illustré en **Figures 4.5a** et **4.5b**, des comportements similaires pour les courbes des facteurs S et de ζ_1 sont observés selon que la cible d'intérêt est le noyau ou la cellule. La différence principale, au delà des valeurs plus faibles en raison du plus petit volume du noyau, porte une fois de plus sur l'allure des courbes observées pour les émissions à proximité du milieu cellulaire. Ces différences d'allures sont, une fois de plus, principalement liées à des effets géométriques.

4.3 Application de la méthode dosimétrique

Dans ce dernier paragraphe, la méthode dosimétrique décrite en **Section 4.1** est appliquée à deux exemples de distributions d'activités volumiques, afin d'évaluer les sources d'erreur sur la dosimétrie liées à la géométrie cellulaire, similairement à l'évaluation de l'impact de la déconvolution spatiale présentée au **Chapitre 3**.

4.3.1 Distributions et conditions d'irradiation

Le formalisme dosimétrique a été appliqué à deux distributions d'activités linéiques représentatives de ^{212}Pb , correspondant à une activité totale d'environ 15 kBq (la plus faible des activités injectées lors des essais avec ce radionucléide présentés au **Chapitre 5**). En premier lieu, une distribution de fort gradient, réaliste en regard des mesures réalisées, a été considérée :

$$f_{\text{gradient}}(z) = 100 \exp(-0.1 z) + 7.5 \alpha/\mu\text{m/s} \quad (4.8)$$

Cette distribution correspond à une accumulation importante de l'activité au fond du puits de culture, et à un gradient de concentration dont la hauteur caractéristique (10 μm) est semblable aux dimensions caractéristiques du milieu cellulaire. En comparaison, la méthode de calcul a également été appliquée à une distribution homogène de l'activité dans le puits de culture (l'hypothèse fréquente en l'absence de quantification expérimentale) :

$$f_{\text{homogène}}(z) = 7.5 \alpha/\mu\text{m/s} \quad (4.9)$$

L'utilisation de cette distribution permet d'évaluer l'impact d'un gradient d'activité sur la dose mais également sur la stochasticité de l'irradiation.

Les distributions testées ici correspondant à des distributions linéiques en l'absence de cellules, une hypothèse de non-intériorisation a été réalisée et le milieu cellulaire est donc modélisé avec la géométrie présentée en **Section 4.2**, avec une hauteur des cellules de 20 μm et une confluence de 12,5 % ou de 60 %, pour étudier l'impact des fluctuations des facteurs S et des événements spécifiques ζ_1 avec la confluence sur la dosimétrie. Le calcul dosimétrique prenant en compte l'espace disponible pour convertir les distributions d'activité volumique en activité linéique (*cf. Chapitre 3, Figure 3.9 à 3.11*), les bases de données de facteurs S et de ζ_1 associées aux confluences testées ont été utilisées. Enfin, pour déterminer l'impact d'un mauvais accord entre la confluence effective et le choix d'une base de données, la dosimétrie a également été

réalisée pour les deux distributions en supposant une confluence de 95 % et en utilisant la base de données associées à une confluence de 60 %.

Enfin, l'ensemble de la dosimétrie a été considérée pour une irradiation de 4 h au ^{212}Pb . La diminution de l'activité par décroissance a été considérée dans l'ensemble des résultats présentés dans le paragraphe suivant.

4.3.2 Résultats

Dans l'ensemble des résultats présentés ci-dessous, les doses au noyau ou à la cellule entière ont été considérées. Une distinction entre les grandeurs associées aux désintégrations α ou β^- a également été réalisée.

4.3.2.1 Impact de la distribution

Pour introduire et discuter les grandeurs de sortie pour la dosimétrie des essais *in vitro*, ce paragraphe présente les résultats associés à une confluence cellulaire de 12,5 %. La **Figure 4.6** présente l'évolution du débit de dose, de la dose cumulée avec son incertitude, et de la fluctuation estimée de la dose reçue entre les différentes cellules au cours de l'irradiation, en considérant soit la cellule entière, soit uniquement le noyau.

Les courbes associées aux débit de dose et à la dose cumulée montrent, pour une distribution donnée, une plus grande dose délivrée au noyau qu'à la cellule. Ceci n'est que la conséquence de la légère supériorité des facteurs S associés à la dose au noyau par rapport à la dose à la cellule. Cependant, les incertitudes sur ces courbes sont sensiblement plus élevées pour la dose au noyau, en conséquence de la variance plus importante pour le noyau pour chaque désintégration. Cette variance, calculée lors des simulations à l'aide de l'**Équation 4.2**, croît avec la dose par trace ζ_1 mais également lorsque l'efficacité géométrique diminue. La dose délivrée à l'ensemble des noyaux est davantage caractérisée par un *tout ou rien* qui se traduit en une plus grande incertitude sur la dose moyenne reçue.

Les valeurs de ζ_1 beaucoup plus élevées au noyau qu'à la cellule, malgré des doses similaires reçues, se traduisent également par une fluctuation stochastique de la dose reçue entre les différents noyaux beaucoup plus élevée qu'entre les cellules. Pour la distribution volumique homogène, la fluctuation des doses aux noyaux atteint 64 % de la dose moyenne, alors qu'elle n'est que de 39 % pour les cellules. Dans les deux cas, cette fluctuation est largement supérieure au seuil de 20 % et donc suggérerait la pertinence d'une approche microdosimétrique. Cependant, en présence d'un fort gradient, ces fluctuations s'atténuent à 33 % de la dose moyenne pour les noyaux et à 20 % de la dose moyenne pour les cellules. L'accumulation de l'activité au fond du puits rend en effet logiquement l'irradiation moins stochastique.

Le bilan dosimétrique associé aux deux distributions, après 4 h d'irradiation, est présenté en **Table 4.3**. Il confirme l'impact de la distribution spatiale sur la dosimétrie d'une irradiation et donc la nécessité de son évaluation, ainsi que l'impact de la cible sur laquelle la dosimétrie est réalisée. Il met de plus en évidence l'impact relatif des désintégrations α et β^- sur la dose délivrée.

Comme le montre le résumé des grandeurs d'intérêt en **Table 4.3**, les désintégrations β^- contribuent à environ 8 % en l'absence de gradient ou 4 % si l'activité se concentre au fond du puits à la dose délivrée à la cellule et aux noyaux. Cette évolution du pourcentage montre une sensibilité beaucoup plus forte de la dose due aux émissions α à la présence d'un gradient d'activité. Pour autant, le nombre de coups moyen à chacune des différentes cibles est beaucoup plus important pour les émissions β^- du fait de leur plus grande portée et notamment leur aptitude à atteindre plusieurs cibles en une seule désintégration à proximité du milieu cellulaire. Les émissions β^- sont ainsi associées à une fluctuation sur leur composante de dose beaucoup plus faible que leurs contreparties associées aux émissions α .

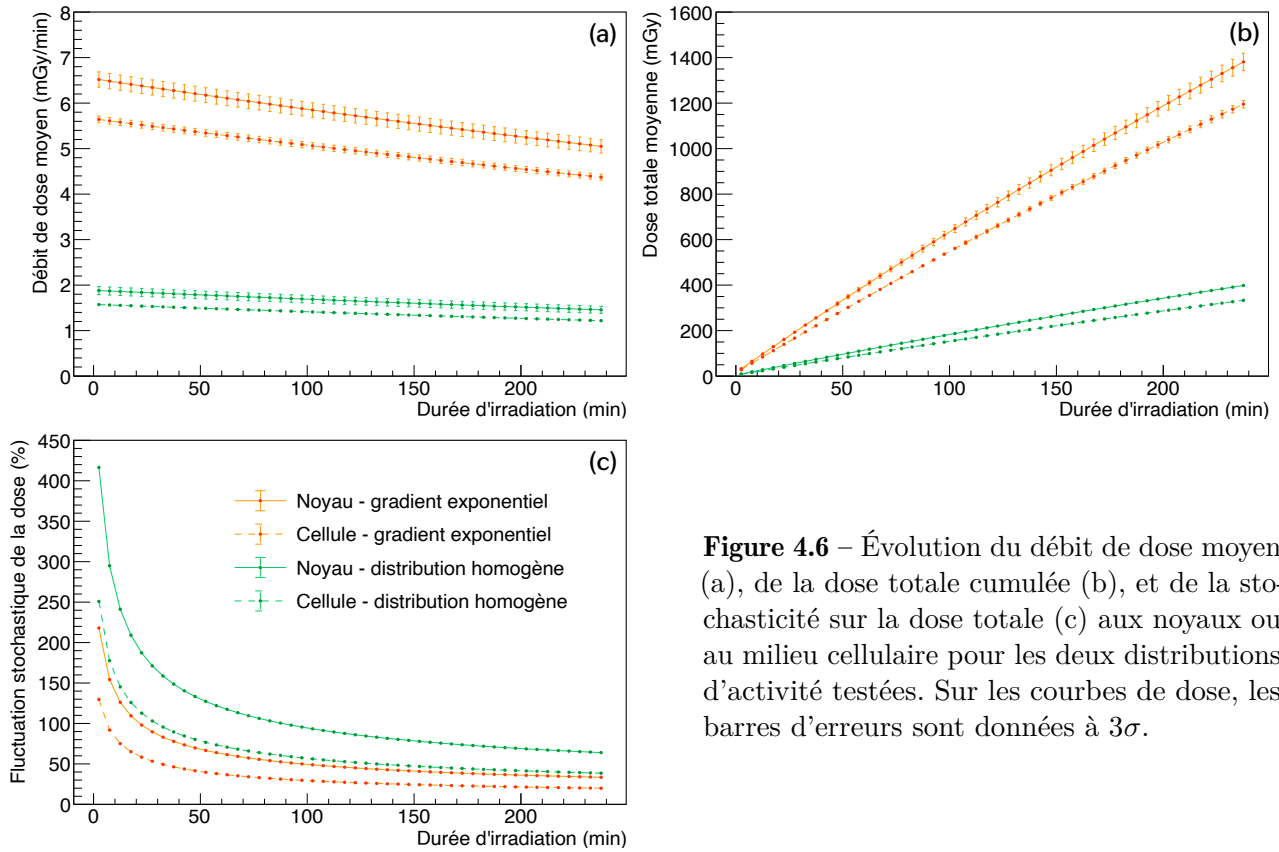


Figure 4.6 – Évolution du débit de dose moyen (a), de la dose totale cumulée (b), et de la stochasticité sur la dose totale (c) aux noyaux ou au milieu cellulaire pour les deux distributions d'activité testées. Sur les courbes de dose, les barres d'erreurs sont données à 3σ .

Notons enfin que le nombre de coups au noyau est particulièrement faible dans le cas de la distribution d'activité homogène. Le nombre de traces dans une cible suivant une statistique de Poisson, une moyenne de 1,7 coups par noyau correspond à une proportion de noyaux touchés ne recevant aucune particule α de $\exp(-1.7) = 18\%$. La dose par trace ζ_1 au noyau étant ici du même ordre de grandeur que la dose moyenne à l'ensemble des noyaux, cette proportion significative de noyaux non touchés par les émissions α explique les 69% de fluctuation sur la dose estimée, et peut potentiellement biaiser les conclusions tirées si les effets biologiques observés sur une zone du puits sont rapportés à la dose moyenne.

Cette étude confirme ainsi la nécessité absolue d'évaluer la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture, la dose au milieu cellulaire et aux noyaux augmentant d'un facteur 3.5 en présence du gradient d'activité considéré par rapport à une distribution homogène de l'activité. De plus, le choix de la cible pour la quantification dosimétrique a un impact sur les grandeurs évaluées, avec des fluctuations entre la dose à la cellule ou au noyau variant entre 15 et 20%, et des conséquences beaucoup plus importantes dans l'évaluation de la stochasticité de l'irradiation.

4.3.2.2 Impact de la confluence

Comme mentionné dans la section précédente, les mêmes calculs ont été réalisés également pour une confluence de 60%. Le bilan dosimétrique associé est présenté en **Table 4.4**.

L'augmentation de la confluence a un impact clair sur la dosimétrie. Bien que les facteurs S et les valeurs de ζ_1 augmentent légèrement avec la confluence, l'espace disponible à proximité des cellules pour les radionucléides non-intériorisés pour une distribution volumique donnée diminue (*cf.* **Chapitre 3, Figure 3.9 à 3.11**). Ainsi, pour l'ensemble des émissions et des distributions d'activité volumique, la dose à la cellule et au noyau diminue significativement lorsque la confluence augmente (d'un facteur 1.4). L'écart-type sur la dose délivrée, du fait de la plus

Tableau 4.3 – Bilan dosimétrique d'une irradiation de 4 h pour les distributions homogènes ou avec gradient exponentiel. Les distributions linéiques ont été corrigées pour prendre en compte la présence de cellules de 20 μm de haut, pour une confluence de 12,5 %. La base de données de facteurs S et de valeurs de ζ_1 utilisées correspond à des cellules de 20 μm de haut, pour une confluence de 12,5 %.

| | | A la cellule | | Au noyau | |
|--------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Sans gradient | Avec gradient | Sans gradient | Avec gradient |
| Émissions α | Dose délivrée (moyenne) | (307 \pm 1) mGy | (1155 \pm 17) mGy | (368 \pm 3) mGy | (1334 \pm 38) mGy |
| | Écart-type sur la dose délivrée | 128 mGy (42 %) | 238 mGy (21 %) | 255 mGy (69 %) | 462 mGy (35 %) |
| | Nombre de traces (moyenne) | 6,4 | 24,3 | 1,7 | 6,1 |
| Émissions β | Dose délivrée (moyenne) | (25,75 \pm 0,03) mGy | (40,48 \pm 0,28) mGy | (30,52 \pm 0,07) mGy | (47,12 \pm 0,63) mGy |
| | Écart-type sur la dose délivrée | 2,93 mGy (11 %) | 3,67 mGy (9 %) | 5,84 mGy (19 %) | 7,25 mGy (15 %) |
| | Nombre de traces (moyenne) | 88,1 | 138,0 | 25,4 | 39,1 |
| Total | Dose délivrée (moyenne) | (333 \pm 1) mGy | (1195 \pm 17) mGy | (398 \pm 3) mGy | (1381 \pm 38) mGy |
| | Écart-type sur la dose délivrée | 128 mGy (39 %) | 238 mGy (20 %) | 255 mGy (64 %) | 463 mGy (33 %) |
| | Nombre de traces (moyenne) | 94,5 | 162,3 | 27,1 | 45,3 |

Tableau 4.4 – Bilan dosimétrique d'une irradiation de 4 h pour les distributions homogènes ou avec gradient exponentiel. Les distributions linéiques ont été corrigées pour prendre en compte la présence de cellules de 20 μm de haut, pour une confluence de 60 %. La base de données de facteurs S et de valeurs de ζ_1 utilisées correspond à des cellules de 20 μm de haut, pour une confluence de 60 %.

| | | A la cellule | | Au noyau | |
|--------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Sans gradient | Avec gradient | Sans gradient | Avec gradient |
| Émissions α | Dose délivrée (moyenne) | (267 \pm 1) mGy | (822 \pm 7) mGy | (322 \pm 1) mGy | (950 \pm 15) mGy |
| | Écart-type sur la dose délivrée | 120 mGy (45 %) | 200 mGy (24 %) | 240 mGy (75 %) | 389 mGy (41 %) |
| | Nombre de traces (moyenne) | 5,6 | 18,1 | 1,5 | 4,6 |
| Émissions β | Dose délivrée (moyenne) | (25,12 \pm 0,02) mGy | (34,81 \pm 0,16) mGy | (29,79 \pm 0,04) mGy | (40,60 \pm 0,32) mGy |
| | Écart-type sur la dose délivrée | 2,90 mGy (12 %) | 3,42 mGy (10 %) | 5,79 mGy (19 %) | 6,76 mGy (17 %) |
| | Nombre de traces (moyenne) | 85,9 | 118,7 | 24,7 | 33,7 |
| Total | Dose délivrée (moyenne) | (292 \pm 1) mGy | (857 \pm 7) mGy | (351 \pm 1) mGy | (991 \pm 15) mGy |
| | Écart-type sur la dose délivrée | 120 mGy (41 %) | 200 mGy (23 %) | 240 mGy (68 %) | 389 mGy (39 %) |
| | Nombre de traces (moyenne) | 91,6 | 136,8 | 26,2 | 38,3 |

faible proportion d'émissions à proximité des cellules, subit une plus faible diminution, ce qui se traduit logiquement en une augmentation de la stochasticité de l'irradiation.

4.3.2.3 Impact d'une erreur de confluence

La confluence moyenne du milieu de culture n'est pas forcément connue au moment de l'irradiation, et deux valeurs de confluence cellulaire différentes peuvent mener à des spectres en énergie mesurés très similaires, qui seraient donc indistinguables de ce point de vue. Nous nous proposons donc d'évaluer l'impact d'une erreur dans l'estimation de la confluence sur le bilan dosimétrique, en faisant l'hypothèse d'une sous-évaluation de la confluence menant à l'utilisation d'une mauvaise base de données de facteurs S et ζ_1 (celle associée à une confluence de 12,5 % au lieu de 60 %). Les erreurs commises sur le bilan dosimétrique sont présentées en **Table 4.5**.

Tableau 4.5 – Comparatif des bilans dosimétriques d'une irradiation de 4 h pour les distributions homogènes ou avec gradient exponentiel, pour une sous-estimation de la confluence du milieu cellulaire. Les distributions linéiques ont été corrigées pour prendre en compte la présence de cellules de 20 μm de haut, pour une confluence de 60 %. La base de données de facteurs S et de valeurs de ζ_1 utilisée correspond à des cellules de 20 μm de haut, pour une confluence de 12,5 %.

| | A la cellule | | | | Au noyau | | | |
|----------------------------------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|---------------|---------------|----------|
| | Sans gradient | | Avec gradient | | Sans gradient | | Avec gradient | |
| Erreur | Absolue | Relative | Absolue | Relative | Absolue | Relative | Absolue | Relative |
| Sur la dose totale | -6 mGy | -2,5 % | -44 mGy | -5,1 % | -6 mGy | -1,7 % | -39 mGy | -3,9 % |
| Sur le nombre de traces α | -0.2 | -3,6 % | -1.8 | -9,9 % | < ± 0.1 | < $\pm 6,7$ % | -0.4 | -8,7 % |

La comparaison des doses calculées montre assez logiquement, en raison de la diminution des facteurs S pour les plus faibles valeurs de confluence, une sous-évaluation de la dose délivrée aux cellules et aux noyaux par rapport à celle qui serait obtenue avec la base de donnée adaptée comme en **Table 4.4**. En présence de gradient, la sous-estimation est la plus critique, et est de 5,1 % ((813 \pm 13) mGy contre (857 \pm 7) mGy) pour la dose moyenne aux cellules et de 3,9 % ((952 \pm 31) mGy contre (991 \pm 15) mGy) pour la dose moyenne aux noyaux.

Ces sous-estimations sont proches de l'erreur induite par l'incertitude sur la distribution spatiale, évaluée à 3 % pour la cellule entière au **Chapitre 3**. De plus, nous avons considéré un choix de facteurs S et de ζ_1 particulièrement inadapté ici, avec une erreur sur la confluence très importante. **En première estimation, l'incertitude dosimétrique liée à la méconnaissance de la confluence réelle (ou à sa fluctuation) dans le puits de culture peut-être prise, en limite supérieure, égale à 5 %.**

Impact d'une erreur de hauteur des cellules – Comme pour la confluence, la hauteur des cellules n'est pas forcément connue, ou peut présenter des variations au sein de la culture irradiée. Les courbes de facteurs S et ζ_1 se différenciant beaucoup plus significativement avec la hauteur simulée du milieu cellulaire, le bilan dosimétrique pour les deux distributions spatiales a été réalisé pour une hauteur du milieu cellulaire de 20 μm , en utilisant la base de données de facteurs S et ζ_1 associée à une hauteur de 10 μm . La confluence étant fixée à 12,5 %, les résultats présentés ont été comparés avec ceux de la **Table 4.3**. Le comparatif est présenté en **Table 4.6**.

Bien que les courbes de facteurs S associées aux hauteurs de cellules de 10 μm et de 20 μm diffèrent significativement, les résultats sur la dose totale délivrée à la cellule ou au noyau pour les deux jeux de données dosimétriques sont relativement proches. En sous-estimant la hauteur

Tableau 4.6 – Comparatif des bilans dosimétriques d’une irradiation de 4 h pour les distributions homogènes ou avec gradient exponentiel, pour une sous-estimation de la hauteur du milieu cellulaire. Les distributions linéiques ont été corrigées pour prendre en compte la présence de cellules de 20 μm de haut, pour une confluence de 12,5 %. La base de données de facteurs S et de valeurs de ζ_1 utilisée correspond à des cellules de 10 μm de haut, pour une confluence de 12,5 %.

| | A la cellule | | | | Au noyau | | | |
|----------------------------------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|
| | Sans gradient | | Avec gradient | | Sans gradient | | Avec gradient | |
| Erreur | Absolue | Relative | Absolue | Relative | Absolue | Relative | Absolue | Relative |
| Sur la dose totale | -24 mGy | -7,2 % | +4 mGy | +0,3 % | -31 mGy | -7,8 % | -8 mGy | -0,6 % |
| Sur le nombre de traces α | -2.3 | -35,9 % | -8.6 | -35,4 % | -0.6 | -35,3 % | -2.2 | -36,1 % |

du milieu cellulaire, en l’absence de gradient, la dose obtenue est inférieure de 7,2 % pour les cellules et de 7,8 % pour les noyaux, alors qu’en présence de gradient, la dose aux cellules est supérieure de 0,3 % et celle aux noyaux inférieure de 0,6 %. Ces résultats sont cohérents avec la position relative des courbes associées aux facteurs S, qui sont supérieurs pour les cellules de 10 μm au fond du puits, alors que la hiérarchie s’inverse au delà des cellules. **L’erreur dosimétrique induite par une mauvaise modélisation de la hauteur du milieu cellulaire est donc dépendante de la distribution d’activité dans le milieu, mais reste du même ordre de grandeur que celle associée à une mauvaise modélisation de la confluence.**

En revanche, les grandeurs associées à la stochasticité de l’irradiation diffèrent significativement avec la hauteur du milieu cellulaire. Similairement à la tendance observée avec les courbes associées aux facteurs S et aux grandeurs ζ_1 , la stochasticité estimée de l’irradiation augmente significativement lorsque la hauteur du milieu cellulaire diminue. De façon corolaire, le nombre de coups moyen estimé aux différentes cibles pour une plus faible hauteur cellulaire est significativement inférieur. Cette observation semble confirmer que les grandeurs décrivant la stochasticité de l’irradiation ne dépendent pas du milieu cellulaire dans son ensemble, mais davantage de la modélisation individuelle des cellules.

4.4 Conclusions

Dans ce chapitre, la mise en œuvre de la dosimétrie à partir de l’évaluation de la distribution spatiale de l’activité dans le puits de culture a été présentée. Basée sur le formalisme du MIRD, la dosimétrie reprend le schéma de discrétisation utilisé dans la méthode de déconvolution spectrale, en utilisant des facteurs S calculés par simulation Monte-Carlo dans les différentes régions définies au **Chapitre 3**.

Simultanément à la simulation des facteurs S, la valeur moyenne des évènements individuels et du carré des évènements individuels, des grandeurs couramment rencontrées dans le formalisme de la microdosimétrie, ont également été déterminées aux différentes positions d’émission. Ces grandeurs permettent une première estimation de la stochasticité de l’irradiation, en permettant d’accéder à la fluctuation de la dose reçue par les différentes cibles considérées au cours de l’irradiation, ainsi qu’à la moyenne du nombre de traces. La fluctuation de la dose est utile pour déterminer la pertinence d’une étude microdosimétrique de l’irradiation, alors que le nombre de coups moyens permet de déterminer le nombre de cibles ne recevant aucune irradiation.

En appliquant ce formalisme à deux distributions classiquement rencontrées lors des essais *in vitro*, l’aspect critique de la modélisation du milieu cellulaire sur la dosimétrie des essais *in vitro* a été mis en évidence. Un modèle cellulaire complexe impacte dans un premier temps le calcul des facteurs S utiles à la dosimétrie par le formalisme du MIRD. La géométrie cellulaire influe à

la fois sur l'efficacité géométrique du dépôt de dose pour une source donnée, mais également sur la quantité d'énergie pouvant être déposée dans la cible considérée, et enfin sur la masse de cette cible. L'impact relatif de ces différentes considérations sur la dosimétrie est difficile à évaluer, du fait d'une forte corrélation des différents effets, mais l'ensemble mène à des variations de facteurs S significatives pour les émissions se produisant à proximité du puits de culture.

La modélisation de la confluence cellulaire impacte également la distribution spatiale de l'activité non-intériorisée, et donc la dose reçue par les cellules. Pour une même distribution volumique de l'activité, des différences de doses calculées de 28 % ont été observées entre des configurations de confluence faible (12,5 %) ou moyenne (60 %). Pour autant, de telles erreurs dosimétriques ne devraient pas être observées avec le système de dosimétrie présenté dans cette thèse, la détermination de l'activité linéique pouvant compenser une mauvaise modélisation du milieu cellulaire et de la confluence. L'utilisation d'une mauvaise base de données de facteurs S se traduit ainsi en une erreur dosimétrique limitée, tout juste supérieure à 5 % pour une erreur sur la confluence de près de 50 %. La hauteur du milieu cellulaire est également une source d'erreur sur la dosimétrie qui apparaît également limitée à 8 %. En comparaison des incertitudes observées dans la littérature sur la dosimétrie associée aux radionucléides intériorisés, les erreurs dosimétriques associées à la méthodologie présentée sont modérées. Pour autant, les paramètres de modélisation cellulaire utilisés ici sont particulièrement primaires, et nécessiteraient une étude plus approfondie. Par exemple, l'implémentation de contacts cellulaires dans la simulation Monte-Carlo de facteurs S et de grandeurs microdosimétriques permettrait de modéliser des géométries cellulaires et des positions de sources d'irradiation plus réalistes, et donc d'améliorer la fiabilité de la dosimétrie [162].

Enfin, l'incertitude sur la modélisation cellulaire et l'incertitude sur la distribution spatiale n'étant pas entièrement décorréelées, il reste difficile d'évaluer l'incertitude sur notre méthode dosimétrique. L'incertitude dosimétrique liée à la déconvolution de l'activité a été évaluée à 3 % au **Chapitre 3**, et l'incertitude dosimétrique liée à la modélisation cellulaire semble être inférieure à $5 + 8 = 13$ % d'après l'analyse présentée dans ce chapitre. **En supposant une corrélation maximale entre les deux composantes de l'incertitude sur la dose, l'incertitude sur la dose évaluée par notre système de mesure peut être majorée à $13 + 3 = 16$ %.** Cette valeur d'incertitude sera réutilisée dans le chapitre suivant, en particulier lors de l'analyse dosimétrique d'essais *in vitro* réalisés au ^{212}Pb .

5 | Application de la méthode de dosimétrie par déconvolution en conditions de mesures *in vitro*

Sommaire du chapitre

| | |
|---|------------|
| 5.1 Irradiations préliminaires au ^{223}Ra | 116 |
| 5.1.1 Évaluation expérimentale du nouveau système de dosimétrie | 116 |
| 5.1.2 Impact du milieu de culture | 120 |
| 5.1.3 Impact de l'activité injectée et de la présence de cellules | 123 |
| 5.1.4 Conclusions | 125 |
| 5.2 Irradiations <i>in vitro</i> au ^{212}Pb | 126 |
| 5.2.1 Protocole expérimental | 126 |
| 5.2.2 Analyse des acquisitions | 128 |
| 5.2.3 Analyse des spectres en énergie | 130 |
| 5.2.4 Évaluation des grandeurs dosimétriques | 133 |
| 5.2.5 Évaluation des effets biologiques | 137 |
| 5.3 Conclusions | 138 |

Au **Chapitre 3**, une nouvelle méthode de déconvolution des spectres acquis à l'aide de notre système de dosimétrie (introduit au **Chapitre 2**) a été présentée, permettant de reconstruire la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture. Son impact en termes d'incertitudes sur la dosimétrie a également été évalué. Ensuite, au **Chapitre 4**, le calcul des facteurs S associés aux différentes hauteurs d'émission de particules α et β a été étudié, en particulier en termes d'incertitudes sur le calcul dosimétrique.

Le nouveau système dosimétrique étant désormais entièrement caractérisé, ce chapitre présente des applications de la nouvelle méthode de dosimétrie des essais *in vitro* par spectroscopie en énergie des émissions α . En première partie de ce chapitre, une analyse de plusieurs essais préliminaires réalisés hors incubateur, au ^{223}Ra , est proposée. Ces essais ont permis d'établir une preuve de concept du nouveau système de dosimétrie, en particulier dans le cas d'une chaîne de décroissance complexe, mais aussi de discuter de l'impact des conditions expérimentales sur la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture et donc sur la dosimétrie. En seconde partie, un essai *in vitro* d'irradiations de cellules tumorales par du ^{212}Pb est présenté. Des analyses spectrales et dosimétriques sont proposées, et sont suivies en dernier lieu d'une présentation de résultats préliminaires sur l'évaluation des effets biologiques.

5.1 Irradiations préliminaires au ^{223}Ra

Afin de tester l'utilisation du nouveau système de dosimétrie développé au cours de cette thèse, des essais préliminaires, hors incubateur, ont été réalisés. Ces essais avaient pour but d'évaluer le bon fonctionnement du système de dosimétrie, en particulier l'acquisition des spectres en énergie mais également l'analyse spectrale pour l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture.

L'ensemble des essais présentés dans la première partie de ce chapitre ont été réalisés au Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, à Caen, qui a permis ces essais en fournissant le radionucléide ^{223}Ra (sous forme de *Xofigo*, une solution saline de $\text{Cl}_2^{223}\text{Ra}$). Trois séries de mesures, associées à des objectifs différents, et donc réalisées dans des conditions expérimentales différentes, sont présentées dans cette section.

5.1.1 Évaluation expérimentale du nouveau système de dosimétrie

L'ensemble des premières séries de mesures réalisées ont eu but de valider l'utilisation de la nouvelle méthode de déconvolution spectrale présentée au **Chapitre 3**, sur des spectres acquis avec notre nouveau système de dosimétrie. Ce paragraphe présente l'analyse de l'une de ces séries mesures.

5.1.1.1 Protocole expérimental

Durant cet essai, en l'absence de connectique disponible pour l'ensemble des détecteurs, deux des quatre puits de culture d'une plaque positionnée au-dessus des détecteurs, qui ne contenaient pas de cellules, ont été remplis avec 353 μL d'eau dans lesquels étaient dilués 9,3 kBq de ^{223}Ra . L'activité injectée a été évaluée à l'aide d'un activimètre, étalonné à l'aide d'un flacon de *Xofigo* d'activité connue. D'après le constructeur, l'incertitude totale sur l'activité mesurée est de l'ordre de 5 %.

Le volume total de liquide injecté dans chacun des puits correspond à une hauteur de 2 mm. L'acquisition des spectres en énergie par le système de dosimétrie a débuté à la fin de l'injection de l'activité, et pour une durée de 140 min, avant que les puits soient vidés de leur contenu.

A la suite de l'acquisition, les spectres en énergie associés à l'irradiation dans chacun des puits ont été construits en intégrant les spectres sur des intervalles de 5 min, et en corrigeant leur amplitude du taux d'empilement observé (**Équation 2.4, p46**). Pour les deux détecteurs, 28 spectres ont donc été générés. La calibration en énergie des spectres, qui dépend de l'amplitude de la tension alimentant les pré-amplificateurs, a été réalisée pour chacun des détecteurs utilisés en autorisant une légère variation des paramètres d'étalonnage de sorte à trouver les valeurs permettant de compenser les variations dues aux conditions expérimentales et de maximiser la vraisemblance de l'ajustement spectral à l'aide de la nouvelle méthode de déconvolution.

5.1.1.2 Choix de la base de déconvolution

Les spectres ont été analysés à l'aide de la méthodologie présentée au **Chapitre 3**, initialement conçue pour l'analyse de spectres au ^{212}Pb , dont la chaîne de décroissance ne contient qu'une seule désintégration α (*c.f* **Figure 2.22**). L'utilisation de ^{223}Ra , dont la chaîne de décroissance est constituée de quatre désintégrations α successives (*c.f* **Figure 2.23**), a nécessité d'adapter la méthodologie d'analyse pour distinguer plusieurs groupes d'émissions. En effet, comme le montre la **Figure 5.1a**, l'hypothèse selon laquelle l'ensemble des émetteurs α partagent la même distribution spatiale dans le puits de culture mène à une erreur systématique dans l'ajustement spectral beaucoup trop importante pour que l'hypothèse d'une distribution commune soit satisfaisante. En particulier, le pic associé aux émissions du ^{211}Bi est d'amplitude beaucoup plus élevé que pour les autres émetteurs, ce qui suggère la nécessité de distinguer sa distribution

spatiale de celle des autres radionucléides. Ceci est conforté par la demi-vie importante de l'émetteur β^- ^{211}Pb ($T_{1/2} = 36,1$ min) dont il est le noyau fils. L'ajustement obtenu avec cette hypothèse pour le même spectre est présenté en **Figure 5.1b**. L'ajustement apparaît de bien meilleure qualité, même si l'amplitude du pic associé au ^{223}Ra apparaît alors sous-évaluée. En distinguant également la distribution du ^{223}Ra , comme présenté en **Figure 2.23**, l'ajustement spectral obtenu, comme présentée en **Figure 5.1c**, apparaît désormais satisfaisant. Enfin, la distinction des distributions des groupes associés au ^{219}Rn et au ^{215}Po permet également d'obtenir un ajustement de qualité, comme illustré en **Figure 5.1d**, mais sans amélioration apparente.

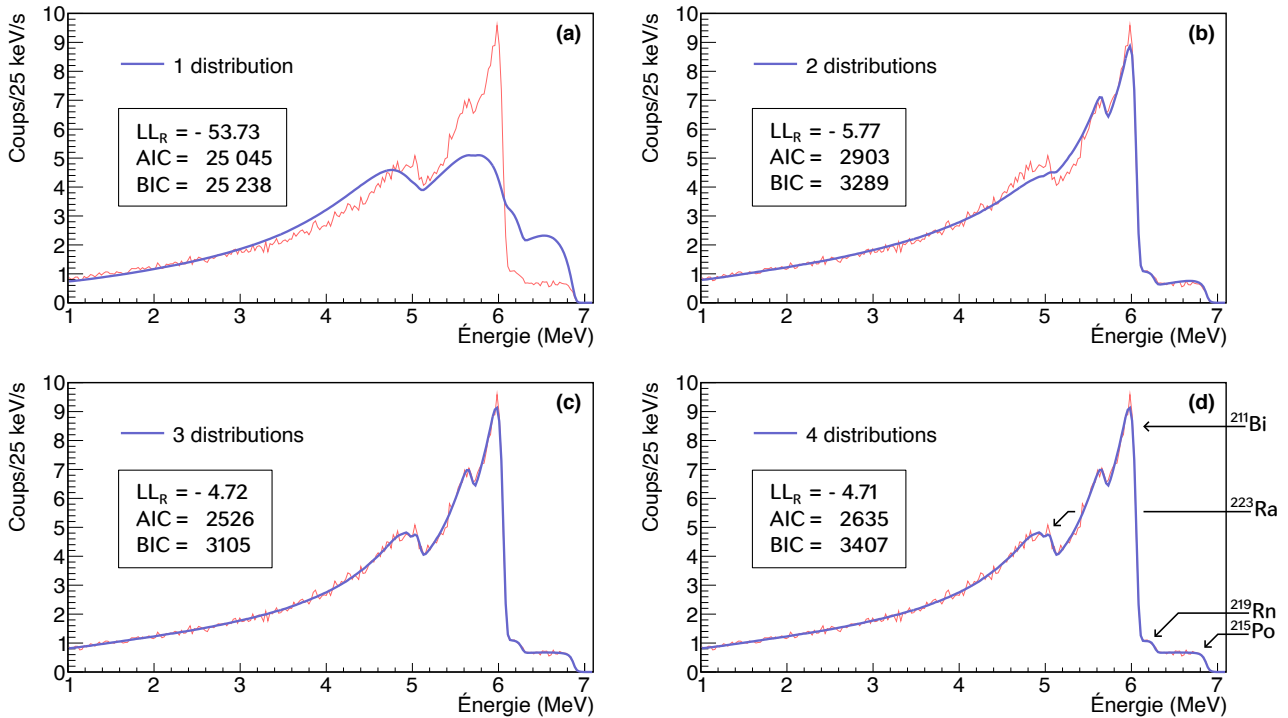


Figure 5.1 – Ajustements d'un spectre en énergie intégré sur 5 min, à partir de l'instant $t = 25$ min. L'ajustement a été obtenu soit sous l'hypothèse d'une distribution d'activité commune à l'ensemble des émetteurs α de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra (a), soit en distinguant deux groupes (^{211}Bi , et les autres émetteurs) (b), soit en distinguant trois groupes (^{211}Bi , ^{223}Ra , et les autres émetteurs) (c), soit en distinguant quatre groupes associés à une émission α (d). Les valeurs de log-vraisemblance réduite LL_R de chacun des ajustements sont indiquées.

La qualité de l'ajustement peut être évaluée quantitativement en étudiant la valeur de la log-vraisemblance, que l'algorithme de déconvolution C-NNML maximise. Les valeurs de log-vraisemblance réduite LL_R , définie ici comme la log-vraisemblance divisée par le nombre d'intervalles en énergie du spectre ajusté n_e , sont indiquées sur la **Figure 5.1** pour chacun des ajustements du même spectre. Bien que la log vraisemblance augmente significativement entre les ajustements à une, deux ou trois distributions, la séparation des distributions du ^{219}Rn et du ^{215}Po ne permet qu'une très faible augmentation de cette grandeur, alors que le nombre de degrés de liberté de la déconvolution augmente significativement du fait de l'ajout de 56 spectres supplémentaires dans la base de déconvolution. Pour les ajustements par maximisation de vraisemblance, les qualités d'ajustement de différents modèles peuvent être comparés à l'aide du critère d'information d'Akaike (AIC) [163] ou du critère d'information bayésien (BIC) [164], qui prennent en compte le nombre de paramètres utilisés. Ils sont ici définis à partir de la log-vraisemblance LL , du nombre de paramètres pour l'ajustement n_s , et du nombre de points

ajustés n_e :

$$AIC = 2 \cdot n_s - 2 \cdot LL \quad (5.1)$$

$$BIC = \ln(n_e) \cdot n_s - 2 \cdot LL \quad (5.2)$$

Pour les mesures présentées en **Figure 5.1**, ces deux critères sont minimisés pour la distinction de trois distributions d'activité. Cette observation a été confirmée dans l'ensemble des mesures d'irradiation au ^{223}Ra réalisées au cours de ce projet et présentées dans ce manuscrit. Ainsi, comme mentionné au **Chapitre 2**, la base de données utilisée pour l'analyse des spectres obtenus lors d'irradiations au ^{223}Ra considère une distribution unique pour les groupes d'émetteurs α associés au ^{219}Rn et au ^{215}Po .

5.1.1.3 Évaluation de la distribution spatiale de l'activité

Pour les deux détecteurs associés aux puits de culture contenant du ^{223}Ra , les 28 spectres ont été analysés avec l'algorithme de déconvolution C-NNML (voir **Chapitre 3**, [153]). Pour l'un des deux détecteurs, la **Figure 5.2** présente quelques résultats associés à l'analyse de la distribution spatiale des radionucléides et de son évolution au cours de l'irradiation.

En **Figure 5.2a**, deux spectres correspondant aux instants $t = 5$ min et $t = 25$ min après l'injection du ^{223}Ra ainsi que leur ajustement par l'algorithme C-NNML sont présentés. En premier lieu, il est possible d'observer que l'allure des spectres acquis évolue dans le temps, avec un signal d'amplitude globalement plus élevée à $t = 25$ min qu'à $t = 5$ min. En particulier, l'amplitude du pic associé au groupe d'émetteurs α du ^{211}Bi augmente significativement en comparaison des pics associés aux autres radio-isotopes. L'augmentation du signal mesuré dans le temps suggère un déplacement de l'activité vers le fond des puits de culture, qui confirme la non-homogénéité de la distribution de l'activité. De plus, l'augmentation beaucoup plus significative de l'intensité du pic associé au groupe d'émetteurs α du ^{211}Bi suggère que les distributions d'activité des différents radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra sont caractérisées par des cinétiques différentes, expliquant l'impossibilité d'ajuster les spectres obtenus avec l'hypothèse d'une distribution spatiale commune à l'ensemble des émetteurs α .

Les **Figures 5.2b** et **5.2c** présentent les distributions spatiales d'activité correspondant aux ajustements spectraux pour les deux instants considérés, pour chacun des trois groupes d'émetteurs α . Les distributions d'activité sont caractérisées par des gradients importants, bien que les amplitudes et allures associées diffèrent entre les différents groupes. En particulier, l'activité du groupe associé au ^{211}Bi est beaucoup plus importante dans les premiers micromètres au fond du puits que celle des autres émetteurs α . Néanmoins le gradient d'activité est significatif pour l'ensemble des groupes d'émetteurs dans les premiers 10 μm . De plus, les amplitudes relatives des gradients des différents groupes d'émetteurs apparaissent stables au cours du temps.

Enfin, l'activité linéique moyenne dans les cinq premiers μm au fond du puits, pour chacun des groupes d'émetteurs α , est présentée en **Figure 5.2d**. Cette figure confirme la plus grande propension du ^{211}Bi à s'accumuler au fond du puits de culture, mais également une évolution de la distribution de l'activité de cet émetteur au fond du puits beaucoup plus importante que pour les autres groupes. De plus, bien qu'une accumulation d'activité de ^{211}Bi au fond du puits se produise dans les 30 premières minutes après l'injection, une cinétique inverse semble prendre place pour ce radionucléide durant le reste de l'irradiation, avec une concentration d'activité au fond du puits qui diminue trop rapidement pour être expliquée par la demi-vie du ^{223}Ra (11,4 jours).

Cette première analyse met ainsi en évidence la capacité de l'algorithme de déconvolution C-NNML à obtenir une évaluation de la distribution spatiale de l'activité des émetteurs α au cours de l'irradiation, même dans le cas complexe de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra . En particulier, elle confirme la complexité des distributions spatiales et temporelles des émetteurs α , qui avait été mise

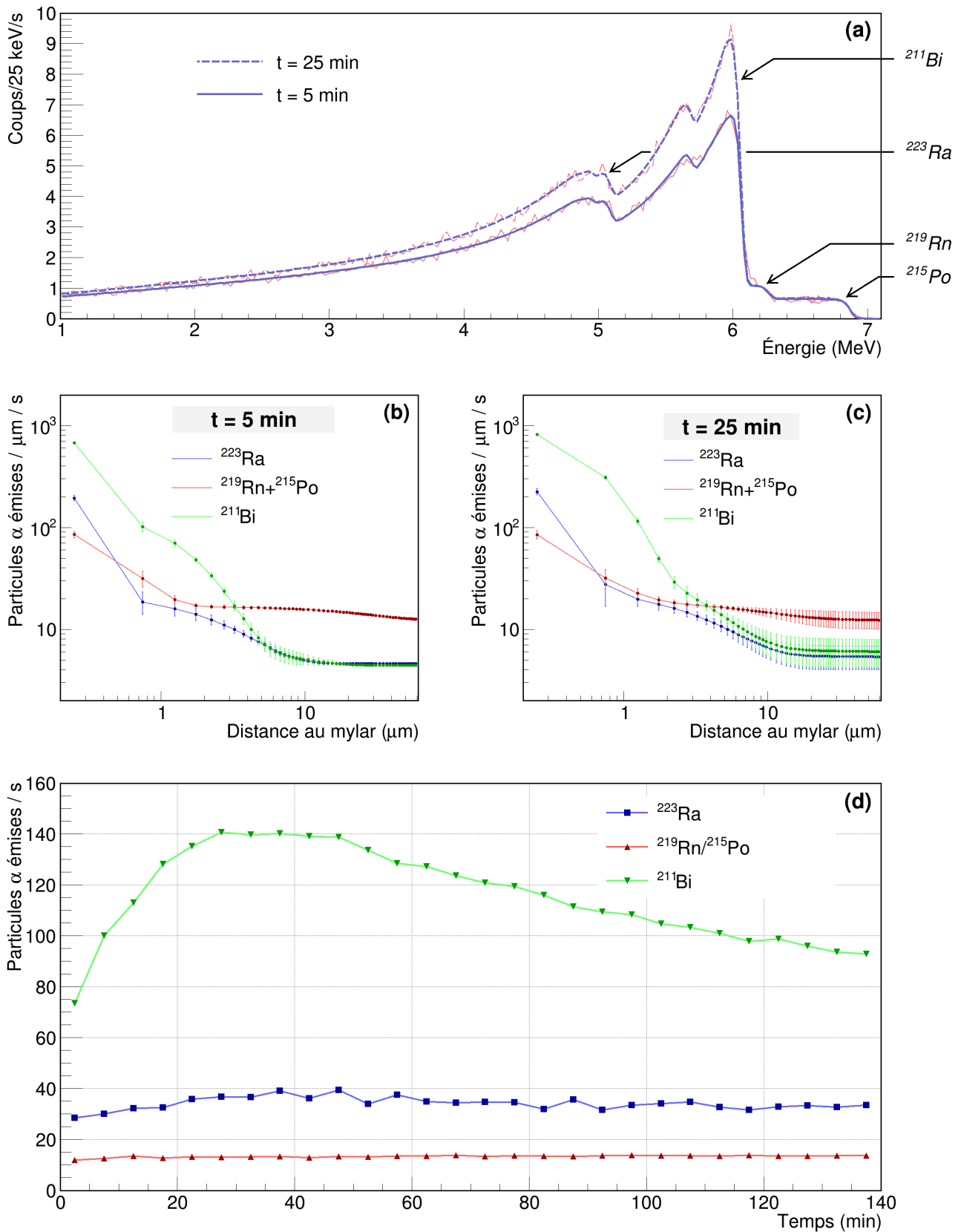


Figure 5.2 – (a) Superposition des spectres en énergie (rouge, lignes fines) mesurés par les détecteurs et de leur ajustement obtenu à l'aide de la nouvelle méthode de déconvolution (bleu, lignes épaisses), à 5 min (lignes continues) et 25 min après un dépôt de ^{223}Ra dans un puits de culture. (b,c) Distributions spatiales des activités évaluées pour les différents groupes de radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra . Les barres d'erreurs correspondent à l'incertitude évaluée à 1σ . (d) Évolution de l'activité linéique moyenne dans les 5 premiers μm en fonction du temps, pour chacun des groupes de radionucléides.

en évidence pour le ^{212}Pb en amont de cette thèse [78], avec l'apparition de gradients d'activité dont la forme et l'amplitude sont sujets à évolution au cours de l'irradiation. La complexité est ici d'autant plus importante que les différents émetteurs α de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra sont caractérisés par des distributions spatiales différentes. La différenciation du ^{211}Bi apparaît logique du fait de sa demi-vie importante (36 min) par rapport à celle des autres émetteurs de la chaîne. Pour autant, son accumulation au fond des puits de culture se produit sur une échelle de temps bien inférieure à cette demi-vie, ce qui laisse suggérer que des interactions avec le milieu de culture (ici, de l'eau) et le mylar sont à l'origine de cette migration rapide. Cette hypothèse est soutenue par la distribution du ^{219}Rn , dont la courte demi-vie (3,4 s) ne peut pas expliquer sa différenciation en terme de distribution spatiale et temporelle.

5.1.2 Impact du milieu de culture

Bien que ces essais préliminaires aient mis en évidence la forte complexité de la cinétique de la distribution de l'activité dans les puits de culture au cours de l'irradiation, l'absence d'un milieu de culture réaliste et de cellules limitent la portée des conclusions précédemment tirées. Dans ce paragraphe, l'analyse d'une série de mesures visant à évaluer l'impact du milieu de culture sur la distribution spatiale de l'activité au cours de l'irradiation est présentée.

5.1.2.1 Protocole expérimental

Pour cet essai, les quatre puits de culture ont été utilisés. Ces puits, qui ne contenaient pas de cellules, ont été remplis pour deux d'entre eux avec du milieu adapté aux cultures cellulaires, dont la composition est détaillée en **Annexe B**, et deux d'entre eux avec de l'eau. Pour les deux types de liquide, une activité de ^{223}Ra de 30 kBq ou de 150 kBq a été injectée dans chacun des puits, pour atteindre une hauteur de 2 mm. Une description de la composition des puits est proposée en **Table 5.1**. L'acquisition des spectres en énergie a démarré juste après l'injection de l'activité dans les puits, et a duré 65 min. Les spectres ont été intégrés sur des intervalles de 5 min, traités, et calibrés selon la même méthodologie qu'en **Section 5.1.1.1**.

Tableau 5.1 – Composition des puits de culture pour l'évaluation de l'impact du milieu de culture, en fonction de l'activité.

| Activité de ^{223}Ra | Proportion volumique de milieu | Proportion volumique de solution de ^{223}Ra |
|-------------------------------|--------------------------------|---|
| 30 kBq | 90 % | 10 % |
| 150 kBq | 50 % | 50 % |

5.1.2.2 Évaluation de la distribution spatiale de l'activité

Les 13 spectres associés à chacun des quatre détecteurs ont été analysés avec l'algorithme de déconvolution C-NNML. En **Figure 5.3**, des résultats associés à l'analyse de la distribution spatiale de l'activité et de son évolution au cours de l'irradiation dans les quatre puits de culture sont présentés.

Artéfacts de mesure – Les spectres acquis à partir de $t = 20$ min par chacun des détecteurs, ainsi que leur ajustement par l'algorithme C-NNML, sont représentés sur les **Figure 5.3a** et **5.3e**. Bien que l'ajustement spectral apparaisse satisfaisant pour la plupart des énergies des différents spectres, des sous réponses de la mesure par rapport à l'ajustement sont observées sur plusieurs intervalles en énergie. Ce phénomène est particulièrement visible sur le spectre en énergie acquis

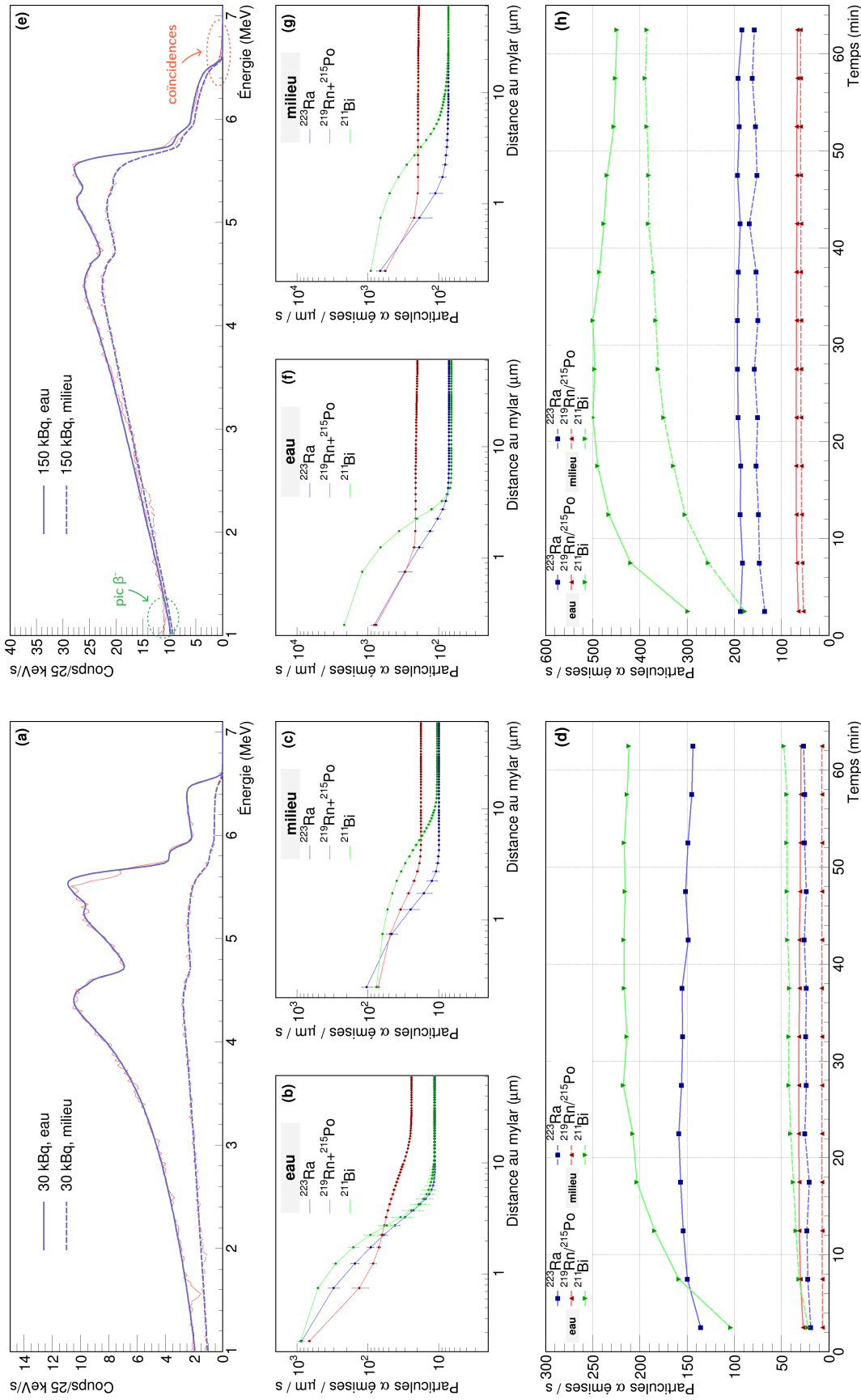


Figure 5.3 – (a,e) Superposition des spectres en énergie (rouge, lignes fines) mesurés par les détecteurs et de leur ajustement obtenus à l'aide de la nouvelle méthode de déconvolution (bleu, lignes épaisses), 20 min après l'injection de 30 kBq (a) ou de 150 kBq (b) de ^{223}Ra dans un puits de culture. (b,c,f,g) Distributions spatiales des activités évaluées pour différents groupes de radionucléides de la chaîne de décroissance du ^{223}Ra . Les barres d'erreurs correspondent à l'incertitude évaluée à 1σ . (d,h) Évolution de l'activité linéique moyenne dans les 5 premiers μm en fonction du temps, pour chacun des groupes de radionucléides.

pour le puits de culture contenant initialement 30 kBq de ^{223}Ra dans de l'eau, au niveau du pic associé au ^{211}Bi (entre 5,5 MeV et 5,7 MeV). Ces sous-réponses, dont la position en énergie peut varier dans le temps pour chacune des voies (visible ici pour tous puits sauf celui contenant initialement 150 kBq dans de l'eau), n'a pas pour origine la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture. Ces phénomènes ont en effet été également observés en irradiant les détecteurs à l'aide d'une source 3α , entre deux séries de mesures. Observables pour tous les détecteurs (mais pas nécessairement tous à la fois) quelle que soit la carte mère utilisée, et apparemment aléatoires, ces défauts ont probablement pour origine l'électronique d'acquisition.

Ces sous-réponses locales peuvent biaiser l'ajustement spectral, en particulier lorsqu'ils se produisent au niveau d'un front en énergie associé à l'un des groupes de radionucléides, comme en **Figure 5.3a**. Le code d'analyse spectrale a donc été modifié pour prendre en compte, lors de l'ajustement spectral, les intervalles de mesure biaisés afin de les exclure de la déconvolution.

Cette adaptation a également permis d'étendre l'exclusion d'autres intervalles en énergie des ajustements spectraux, à haute et basse énergie. En effet, en premier lieu, les émissions β^- produisent également des signaux dans les détecteurs. Du fait des dimensions des détecteurs et de l'énergie des émissions β^- , celles-ci déposent généralement moins de 1 MeV dans le détecteur, et produisent donc un pic intense à basse énergie. Cependant, les émetteurs β^- étant caractérisés par une portée de détection beaucoup plus importante, du fait de leurs faibles valeurs de TEL, ceux-ci sont principalement à l'origine des empilements et des coïncidences dans les détecteurs. Il est ainsi visible en **Figure 5.3e** qu'à plus haute activité, la largeur du pic de détection β^- dépasse 1 MeV du fait de coïncidences et n'est pas ajustable par le modèle de déconvolution, la base de déconvolution ayant été conçue en simulant uniquement les désintégrations α . La position et l'étalement du pic β^- doivent donc être contrôlés afin de l'exclure de l'ensemble des analyses spectrales.

De plus, le signal de déclenchement pour la détection d'un évènement étant caractérisé par une certaine durée (60 ns, voir **Chapitre 2**), deux particules créant un signal à un intervalle de temps inférieur à cette durée seront détectés comme un seul évènement dont les énergies sont sommées, et non pas comme deux évènements empilés. Les émissions β^- , dont la fréquence de détection est significativement plus élevée, sont donc à l'origine d'évènements à une énergie plus importante que l'énergie effectivement déposée par les particules α dans le détecteur. En particulier, au niveau des fronts du ^{211}Bi et du ^{215}Po , des queues de distribution non-ajustables par la base de déconvolution sont visibles en **Figure 5.3e**, mais pas en **Figure 5.3a** du fait d'une activité injectée plus faible. La queue de distribution de haute énergie au delà du pic associé au ^{215}Po a donc également été exclue pour ne pas biaiser l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité.

Impact du milieu de culture sur la distribution spatiale de l'activité – Les **Figures 5.3a** et **5.3e** montrent une différence de comportement importante de la distribution spatiale d'activité au cours de l'irradiation en fonction de la composition du milieu présent dans les puits. Pour les puits contenant une plus faible activité, le remplacement de l'eau par du milieu de culture change significativement l'allure des spectres en énergie mesurés, avec l'atténuation des fronts en énergie pour chacun des différents groupes de radionucléides. Le milieu de culture est caractérisé par une densité proche de celle de l'eau, mais sa viscosité est beaucoup plus importante, notamment du fait de la présence de macromolécules nécessaires à la culture cellulaire. Le changement de composition et/ou la viscosité peuvent donc expliquer ce changement important dans l'allure des spectres, qui se traduit en **Figure 5.3b** par une différence d'un facteur proche de 10 sur l'amplitude des gradients associés à l'ensemble des groupes de radionucléides par rapport à ceux observés dans l'eau, en **Figure 5.3c**.

Pour autant, le graphe décrivant l'évolution de l'activité moyenne dans les 5 μm au fond du puits des différents groupes de radionucléides dans les deux types de milieu (**Figures 5.3d**)

montre une mobilité importante du ^{211}Bi , l'activité associée à ce radionucléide au fond des puits augmentant d'un facteur 2 au cours de l'irradiation, quel que soit le milieu. Similairement, dans les deux milieux, la mobilité des autres émetteurs α est beaucoup moins importante. Pour un groupe d'émetteurs α donné, l'accumulation de l'activité au fond des puits est systématiquement plus importante dans l'eau que dans le milieu de culture.

Cette différenciation entre milieu de culture et eau semble néanmoins dépendre de l'activité injectée, comme en témoigne la **Figure 5.3e**. Pour une activité initiale de 150 kBq injectée dans du milieu de culture, les fronts en énergie des différents groupes de radionucléides apparaissent plus marqués qu'à faible activité. Les taux de comptage de ce puits se rapprochent de ceux associés à l'injection dans l'eau pour la même activité, bien que l'amplitude générale du spectre soit toujours inférieure. Les distributions spatiales associées, présentées aux **Figures 5.3f** et **5.3g**, ont également des allures similaires. Cette plus grande similarité entre les deux puits de culture peut s'expliquer par la proportion relative de milieu de culture qui est beaucoup plus faible à haute activité qu'à basse activité, comme indiqué en **Table 5.1**.

Enfin, comme pour les puits contenant une activité initiale de 30 kBq de ^{223}Ra , une mobilité importante du ^{211}Bi est observée par rapport aux autres émetteurs α ainsi qu'une mobilité plus importante dans l'eau que dans le milieu de culture. Les différences en terme d'accumulation au fond des puits entre les deux milieux, visibles en **Figure 5.3h**, sont également plus réduites que pour les puits contenant une plus faible activité.

La composition du milieu a donc un impact significatif sur la distribution spatiale de l'activité dans les puits de culture, et son évolution au cours de l'irradiation. En particulier, l'accumulation de l'activité au fond des puits de culture, qui est fortement corrélée à la dose déposée du fait de valeurs des facteurs S beaucoup plus importantes à proximité des cellules (voir **Chapitre 4**), varie avec la nature milieu. Ainsi, pour deux irradiations *in vitro* réalisées dans des conditions similaires, mais pour lesquelles les compositions du milieu changent (du fait de dilutions de l'activité, comme nous le verrons dans l'analyse des essais *in vitro* au ^{212}Pb en **Section 5.2.1**), la cinétique de la distribution spatiale de l'activité peut significativement varier, et doit donc être mesurée à l'aide d'un système tel que celui conçu au cours de ce projet.

5.1.3 Impact de l'activité injectée et de la présence de cellules

Pour les mesures réalisées avec les deux milieux testés, les amplitudes des spectres n'évoluent pas linéairement avec l'activité totale injectée dans les puits. En effet, les **Figures 5.3d** et **5.3h** montrent que l'accumulation du ^{211}Bi au fond des puits de culture augmente d'un facteur compris entre 2 et 3 dans l'eau et d'un facteur 8 dans le milieu de culture, alors que l'activité injectée a été multipliée par un facteur 5. L'accumulation de l'activité des puits étant corrélée à la dose délivrée aux cellules, ces observations semblent déjà suggérer qu'il n'est pas possible de construire un facteur de proportionnalité global entre dose et activité pour les essais *in vitro* de la RIV- α . Cet aspect a été évalué plus en détail dans un troisième essai préliminaire employant du ^{223}Ra , présenté dans ce paragraphe.

5.1.3.1 Protocole expérimental

Dans cet essai, les quatre puits de culture ont été utilisés. Dans ces puits, des cellules tumorales MDA-MB-231-Br ont étéensemencées en monocouche (voir **Chapitre 2**), dans du milieu de culture. Dans trois des quatre puits de culture, une activité différente de ^{223}Ra a été injectée : 100 kBq, 150 kBq ou 200 kBq. Le quatrième puits ne contenait pas d'activité afin d'évaluer la réponse due aux autres puits. L'acquisition des spectres en énergie a démarré juste après l'injection de l'activité dans les puits, et a duré 65 min. Les spectres ont été intégrés sur des intervalles de 5 min, traités, et calibrés selon la même méthodologie qu'en **Section 5.1.1.1**.

5.1.3.2 Évaluation de la diaphonie

L'utilisation d'un puits dans lequel aucune activité n'a été injectée avait pour but d'évaluer la contribution de l'activité présente dans les autres puits de culture sur le signal mesuré par un détecteur. Pour déterminer la contribution de la diaphonie sur le signal du détecteur, le nombre total de coups mesurés dans chacun des puits a été évalué, ainsi que le taux d'incidence des phénomènes d'empilement. Ces grandeurs sont présentées en **Tableau 5.2**.

Tableau 5.2 – Taux de comptage et d'empilement mesurés sur la totalité de l'irradiation, pour chacun des détecteurs associés à un puits dans lequel une activité de ^{223}Ra spécifiée a été injectée. Pour les paramètres d'acquisitions utilisés (voir **Chapitre 2**), le taux d'empilement théorique pour le taux de comptage mesuré dans chacun des puits est indiqué, dans un intervalle à $\pm 3\sigma$.

| Activité injectée | Évènements détectés par seconde (moyenne) | Taux d'empilement | |
|-------------------|--|-------------------|----------------|
| | | mesuré | théorique |
| 0 kBq | 0.32 | 12,83 % | [0,00, 0,01] % |
| 100 kBq | 3723 | 1,73 % | [1,68, 1,70] % |
| 150 kBq | 7346 | 3,13 % | [3,30, 3,32] % |
| 200 kBq | 8766 | 3,88 % | [3,93, 3,95] % |

Dans le puits ne contenant pas d'activité, le nombre de coups mesurés sur l'intégralité de l'irradiation est particulièrement faible en comparaison des nombres de coups mesurés dans les autres puits contenant une activité importante (facteur 10000 avec le puits contenant 100 kBq). La plupart des coups mesurés dans le puits de culture sans activité sont de faible amplitude, suggérant donc que la majorité des rares évènements mesurés sont provoqués par la traversée de particules β^- émises depuis les autres puits. La diaphonie liée aux émissions depuis les autres puits de culture n'est donc pas une source de préoccupation pour l'analyse spectrale, et similairement, elle n'est pas une source d'erreur dosimétrique significative.

Il est également intéressant d'observer un fort taux d'empilement sur ce détecteur par rapport à sa valeur théorique, en comparaison des autres puits où les taux d'empilement observés sont proches des taux théoriques. Cette surabondance d'empilements, au nombre de 159 sur 1240 coups mesurés (contre aucun en théorie), est localisée exclusivement sur des évènements d'amplitude très faible, voire négative. Elle correspond à des phénomènes d'auto-empilements liés à des défauts de masse générant du signal de haute fréquence, décrits au **Chapitre 2 (Section 2.3)**. Sporadiques, ces évènements sont suffisamment rares pour ne pas avoir influencé les mesures réalisées par les autres détecteurs.

5.1.3.3 Évaluation de la distribution spatiale de l'activité

Les 13 spectres associés à chacun des quatre détecteurs ont été analysés avec l'algorithme de déconvolution C-NNML. Dans le puits ne contenant aucune activité, le signal dans la gamme d'énergie associée aux émissions α était suffisamment faible pour que l'analyse spectrale considère une absence totale d'activité.

Pour les autres détecteurs, malgré la présence de cellules au fond du puits, aucune correction du volume disponible lié à la densité cellulaire n'a été nécessaire pour obtenir un ajustement spectral de qualité. Une telle correction n'augmentait en effet pas significativement la vraisemblance de l'ajustement, ce qui suggère que les cellules présentaient une confluence faible. Les distributions spatiales, dont les allures sont similaires à celles présentées dans les **Sections 5.1.1**

et **5.1.2**, ont ensuite été converties en doses délivrées aux cellules en utilisant le formalisme du MIRDO, en déterminant les facteurs S associés aux différents lieux d'émission à l'aide de simulations Monte-Carlo (**Chapitre 4**).

5.1.3.4 Relation entre activité injectée et dose délivrée

Chacun des spectres analysés a été converti en une dose délivrée aux cellules entières, par pas de 300 s d'irradiation. En normalisant ces doses à la durée d'intégration et à l'activité injectée dans le puits, des courbes représentant le débit de dose et la dose cumulée, par quantité d'activité injectée et en fonction du temps, ont été obtenues. Elles sont présentées respectivement en **Figure 5.4a** et **5.4b**

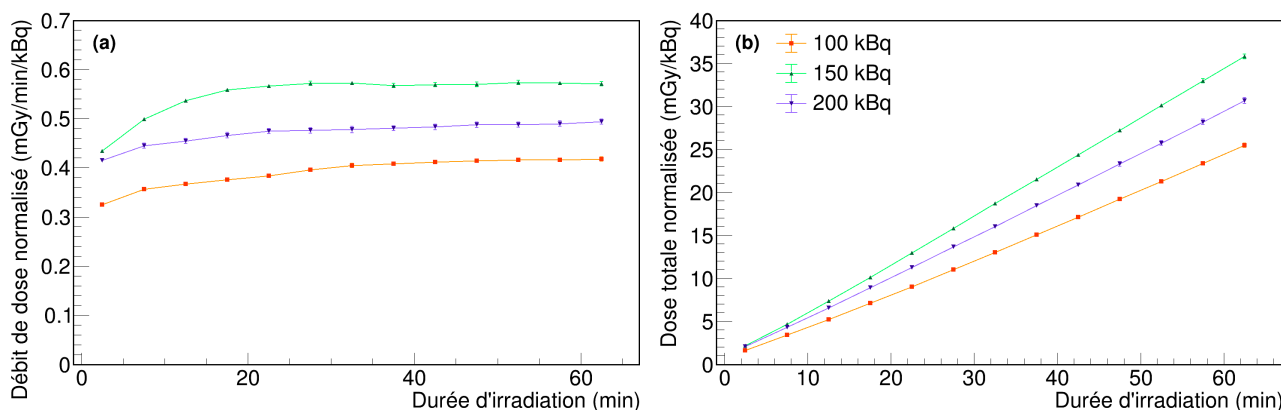


Figure 5.4 – Évolution du débit de dose (a) et de la dose cumulée (b) après l'injection de ^{223}Ra dans un puits de culture contenant des cellules MDA-MB-231-Br, normalisés à l'activité totale injectée (50 kBq, 100 kBq ou 150 kBq)

En premier lieu, les courbes de débit de dose normalisés sont toutes caractérisées par une croissance modérée durant les premières minutes après l'injection de l'activité, puis ralentie durant le reste de l'irradiation. Ces courbes sont en accord avec les observations précédentes d'une mobilité dans les premières minutes après l'injection de l'activité du ^{211}Bi vers les fonds des puits, qui a également été observée sur les spectres acquis lors de cette irradiation.

Pour autant, les trois courbes de débit de dose normalisées ne se superposent pas, avec une différence de débit de dose atteignant environ 50 % entre les puits contenant 100 kBq et 150 kBq de ^{223}Ra (environ $0,37 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kBq}^{-1}$ contre $0,55 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kBq}^{-1}$). De plus, les courbes de débit de dose normalisées ne sont pas hiérarchisées en fonction de l'activité totale. Plusieurs sources de variabilités entre les puits de culture peuvent être mises en cause : les différentes proportions injectées de milieu de culture dans les différents puits, l'activité injectée, ou encore l'occupation du fond du puits par le milieu cellulaire.

La hiérarchie observée sur les courbes de dose cumulée en fonction du temps est identique. Les doses totales normalisées pour les trois activités injectées, par ordre croissant, sont de $(25,5 \pm 0,3) \text{ mGy} \cdot \text{kBq}^{-1}$, $(35,8 \pm 0,3) \text{ mGy} \cdot \text{kBq}^{-1}$ et $(30,7 \pm 0,3) \text{ mGy} \cdot \text{kBq}^{-1}$ après 65 min d'irradiation. Un facteur 1.4 est ainsi observé entre les doses normalisées entre le puits contenant 150 kBq et celui contenant 100 kBq de ^{223}Ra , et correspond au facteur d'erreur si l'on considère un débit de dose moyen proportionnel à l'activité injectée.

5.1.4 Conclusions

L'ensemble des essais préliminaires d'irradiation au ^{223}Ra ont permis d'évaluer l'utilisation du nouveau système de dosimétrie en conditions expérimentales similaires aux essais *in vitro*, à l'exception de l'utilisation d'un incubateur, qui n'était pas disponible au Centre Français

Baclesse où ont eu lieu ces expériences. Ces essais ont contribué au développement du nouvel algorithme de déconvolution présenté au **Chapitre 3** et ont permis d'identifier quelques artefacts expérimentaux.

Premièrement, l'analyse de l'ensemble des spectres acquis lors de ces essais a montré que l'hypothèse d'un gradient vertical d'activité est valide et a été vérifiée pour l'ensemble des mesures, permettant des ajustements spectraux systématiquement de qualité, et une incompatibilité claire de l'allure des spectres avec une hypothèse de distribution homogène de l'activité dans les puits de culture. Ces essais ont motivé l'ajout dans la méthode de déconvolution d'une distinction entre les distributions spatiales des différents émetteurs α dans le cas de chaînes de décroissances longues, comme celles du ^{223}Ra .

La nécessité de cette distinction est une conséquence de la complexité de l'évolution de la distribution spatiale de l'activité au sein des puits de culture. L'analyse des spectres acquis pour différentes conditions d'irradiations a également montré que la distribution de l'activité dépend de la composition du milieu de culture, de la quantité d'activité injectée et possiblement de l'occupation du fond des puits par le milieu cellulaire. Une méthode dosimétrique telle que celle développée dans cette thèse apparaît donc nécessaire, la corrélation entre dose et activité injectée étant certes présente mais entachée de fluctuations importantes pouvant entraîner une dosimétrie significativement erronée.

L'ensemble de ces observations ont également été utiles à l'analyse et à l'interprétation des résultats obtenus lors des essais *in vitro* au ^{212}Pb , présentés dans la seconde partie de ce chapitre.

5.2 Irradiations *in vitro* au ^{212}Pb

Les premières mesures expérimentales hors incubateur au ^{223}Ra ainsi que les premiers tests de l'électronique d'acquisition en incubateur (voir **Chapitre 2, Section 2.6.3**) ont démontré la faisabilité d'une dosimétrie des essais *in vitro* à l'aide du nouveau système de mesure et d'analyse développé au cours de cette thèse. Initialement conçu dans le cadre de l'évaluation du radiopharmaceutique ^{212}Pb - α VCAM-1, le nouveau système dosimétrique a finalement été utilisé lors d'un essai *in vitro* présenté dans cette section. Cet essai avait pour objectif de caractériser la radiosensibilité de cellules métastasées au cerveau à une irradiation au ^{212}Pb , en fonction de l'oxygénation des cellules tumorales et de la dose délivrée aux cellules.

5.2.1 Protocole expérimental

Le protocole expérimental utilisé pour les essais *in vitro* comprend trois aspects principaux : la préparation et l'analyse des cultures cellulaires, la préparation de l'activité à injecter dans les puits de culture, et l'acquisition des spectres en énergie à l'aide du nouveau système de dosimétrie.

5.2.1.1 Culture cellulaires

Les cellules utilisées lors de ces essais sont des cellules tumorales humaines NCI-H2030, issues d'un cancer primaire du poumon et ayant métastasé au cerveau, représentatives des cellules qui seraient irradiées par le nouveau radiopharmaceutique développé.

Au total, six irradiations ont été réalisées, sur deux jours : trois en normoxie (atmosphère contenant 21 % de dioxygène) et trois en hypoxie (1 % de dioxygène), afin de constituer un triplicat pour chacune des conditions d'oxygénation des cellules. Pour chaque irradiation, les cultures cellulaires ont étéensemencées dans quatre puits d'une plaque de seize puits, servant de cultures témoins non-irradiées, et dans les quatre puits d'une plaque destinée à être positionnée sur le système de dosimétrie, dans lesquels une certaine activité de ^{212}Pb sera injectée (15, 50, 150 ou 300 kBq, voir **Section 5.2.1.2**). Pour les irradiations en hypoxie, l'ensemencement des

cellules a été réalisé dans une chambre à hypoxie (avec un taux de dioxygène d'environ 1 %) pendant plusieurs heures, avant d'être placées au dernier moment dans l'incubateur contenant le système de dosimétrie.

Après les irradiations, les cultures cellulaires ont été fixées à l'aide d'une solution de PFA, et le milieu de culture a été retiré des différents puits. Ultérieurement, une analyse du milieu cellulaire a été réalisée par immunocytochimie (voir **Chapitre 2, p59**).

Les irradiations ont été réparties sur deux jours. Les trois irradiations du premier jour ont été réalisées avec des cultures cellulaires en normoxie, et les trois irradiations du second jour avec des cultures développées en hypoxie. La chronologie du protocole expérimental est schématisée en **Figure 5.5**.

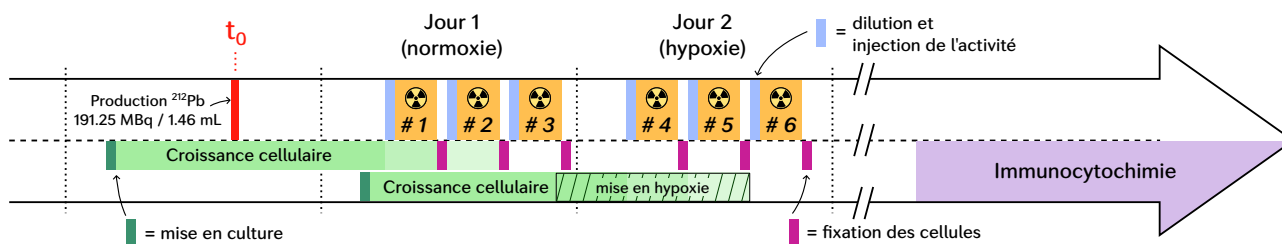


Figure 5.5 – Chronologie du protocole expérimental associé aux six irradiations *in vitro* au ^{212}Pb . Le temps de référence t_0 pour la décroissance de la solution de ^{212}Pb est celui de sa production (voir §5.2.1.2). La mise en culture correspond au dépôt des cultures cellulaires dans les puits de culture, qui sont placées en incubateur 8 h avant l'irradiation. La fixation des cellules est réalisée à l'aide d'une solution de PFA.

5.2.1.2 Activités injectées

Le ^{212}Pb a été fourni par *OranoMed* (France), sous la forme de sulfate de plomb ($^{212}\text{PbSO}_4$) dilué dans une solution d'acétate d'ammonium à $0,4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A l'instant de la production, la solution contenait $191,25 \text{ MBq}$ de ^{212}Pb dans un volume de $1,46 \text{ mL}$.

Pour chacune des plaques de puits de culture, chacun des puits a reçu une activité cible (notée A_c) différente de ^{212}Pb : 15 kBq , 50 kBq , 150 kBq ou 300 kBq . La **Table 5.3** résume les contenus des puits pour les différentes irradiations. Il y apparaît que les activités réellement injectées sont légèrement différentes des valeurs cibles. En effet, les solutions de ^{212}Pb doivent être préparées par dilution dans une solution saline du fait de la haute concentration de l'activité reçue de ^{212}Pb . Les instants auxquels les dilutions ont été réalisées (et donc la décroissance du ^{212}Pb), ainsi que les quantités utilisées lors des dilutions ont été prises en compte pour ré-évaluer les activités réellement injectées au début de chacune des irradiations. En l'absence d'activimètre calibré pour évaluer l'activité d'un échantillon de ^{212}Pb , l'activité de référence utilisée pour les dilutions est celle évaluée par le producteur à l'instant de production indiqué.

Quatre solutions de ^{212}Pb ont été préparées par dilution de la solution du producteur pour chacune des activités testées. Les facteurs de dilution sont de 20, 6, 2 et 1 pour les solutions destinées aux puits devant contenir respectivement 15 kBq , 50 kBq , 150 kBq et 300 kBq , de sorte que, pour une irradiation donnée, chaque puits contienne la même proportion de milieu de culture et le même volume total. Du fait de la demi-vie limitée du ^{212}Pb ($T_{1/2} = 10,64 \text{ h}$), le volume des solutions par dilution injecté dans les puits augmente avec le temps par rapport au début de l'expérience. En conséquence, la composition du liquide dans lequel l'activité est en dilution durant les irradiations évolue, et la proportion volumique du milieu de culture diminue au fur et à mesure des irradiations.

Tableau 5.3 – Heures d’injection, durées d’acquisition et quantité de milieu de culture présente dans chacun des puits de culture, pour chacune des irradiations (voir **Figure 5.5**). A_c désigne l’activité cible qui devait être injectée dans chacun des puits de culture, et diffère légèrement de l’activité réellement injectée.

| | Irradiation | Début d’irradiation (depuis production du ^{212}Pb) | Durée d’irradiation | Proportion volumique de milieu de culture | Activité injectée | | | |
|----------|-------------|---|------------------------|---|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | | | $A_c = 15 \text{ kBq}$ | $A_c = 50 \text{ kBq}$ | $A_c = 150 \text{ kBq}$ | $A_c = 300 \text{ kBq}$ |
| normoxie | #1 | 16 h 31 min | 4 h 07 min | 98,0 % | 15,6 kBq | 51,6 kBq | 155,7 kBq | 311,3 kBq |
| | #2 | 20 h 55 min | 3 h 58 min | 97,4 % | 15,1 kBq | 50,0 kBq | 150,9 kBq | 301,8 kBq |
| | #3 | 24 h 56 min | 3 h 56 min | 96,6 % | 15,5 kBq | 51,4 kBq | 154,9 kBq | 309,7 kBq |
| hypoxie | #4 | 38 h 52 min | 3 h 56 min | 91,6 % | 15,3 kBq | 50,8 kBq | 153,1 kBq | 306,2 kBq |
| | #5 | 42 h 48 min | 4 h 03 min | 89,1 % | 15,4 kBq | 50,9 kBq | 153,5 kBq | 307,1 kBq |
| | #6 | 46 h 48 min | 4 h 04 min | 85,9 % | 15,4 kBq | 51,1 kBq | 154,0 kBq | 308,1 kBq |

5.2.1.3 Irradiation et acquisitions

L’injection de l’activité dans les puits de culture a été réalisée en dehors de l’incubateur. La plaque contenant les cellules irradiées a ensuite été placée sur le support de l’enceinte étanche contenant les détecteurs, dans l’incubateur (voir **Figure 2.19**). La plaque contenant les cultures témoins a également été placée dans l’incubateur, à distance du système de dosimétrie. Les acquisitions ont débuté successivement à la fermeture de l’incubateur.

Les irradiations et donc les acquisitions ont duré environ 4 h (voir **Table 5.3**). Les spectres ont ensuite été intégrés sur des intervalles de 5 min, puis traités et calibrés toujours selon la même méthodologie que lors des essais au ^{223}Ra (voir **Section 5.1.1.1**).

5.2.2 Analyse des acquisitions

Afin de vérifier que le traitement préliminaire des spectres, notamment la correction de l’empilement, n’induit pas de biais sur l’analyse spectrale et la dosimétrie, une évaluation de la statistique de détection pour chacun des puits de culture a été réalisée. Elle est présentée en **Table 5.4**.

Les taux de comptage moyens mesurés pour chacune des différentes activités (616, 2082, 6388 et 13475 coups/s) évoluent proportionnellement à l’activité injectée dans les puits, mais avec une dispersion d’autant plus grande que l’activité augmente (avec un écart-type correspondant à 12 %, 18 %, 31 % et 58 % de la valeur moyenne pour 15, 50, 150 et 300 kBq, respectivement). Ces taux de comptages indiquent ainsi déjà une fluctuation importante des distributions de l’activité au sein des puits de culture, qui sera analysée plus en détail dans la section suivante.

Les taux d’empilement observés sont également systématiquement supérieurs à ceux prédits par les taux de comptages mesurés. L’origine de cet excès d’évènements a été étudié à l’aide du spectre en énergie des évènements empilés. Pour l’une des acquisitions (troisième irradiation, $A_c = 50 \text{ kBq}$), une comparaison entre la distribution en énergie de l’ensemble des évènements mesurés et des évènements empilés est présentée en **Figure 5.6**. Cette comparaison est représentative de l’ensemble des acquisitions réalisées.

A basse énergie, une distribution d’évènements dont l’énergie moyenne est proche de 0 MeV est mesurée. La comparaison entre les deux courbes montre que la totalité de ces évènements sont détectés comme empilés. Ces évènements sont principalement dûs à la présence de défauts de masse générant des signaux courts, de haute-fréquence, qui s’empilent généralement avec eux-mêmes. Ces phénomènes avaient été discutés au **Chapitre 2**.

Le pic d’évènements détectés associé aux émissions β^- situé entre 0,5 et 1,5 MeV, contient deux sources d’empilement. Premièrement, le pic d’empilements à plus basse énergie, très étroit,

Tableau 5.4 – Taux de comptage et d’empilement mesurés sur la totalité de l’irradiation, pour chaque irradiation et pour chacun des détecteurs associés à un puits dans lequel l’activité de ^{212}Pb spécifiée a été injectée. Pour les paramètres d’acquisitions utilisés (voir **Chapitre 2**), le taux d’empilement théorique pour le taux de comptage mesuré dans chacun des puits est indiqué, dans un intervalle à $\pm 3\sigma$.

| 15 kBq | Coups/seconde (moyenne) | Taux d’empilement | | 50 kBq | Coups/seconde (moyenne) | Taux d’empilement | |
|---|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | mesuré | théorique | | | mesuré | théorique |
| Irradiation 1 | 487 | 2,18 % | [0,22, 0,23] % | Irradiation 1 | 1870 | 3,03 % | [0,85, 0,86] % |
| Irradiation 2 | 576 | 2,54 % | [0,26, 0,27] % | Irradiation 2 | 2101 | 3,23 % | [0,95, 0,96] % |
| Irradiation 3 | 653 | 2,81 % | [0,29, 0,30] % | Irradiation 3 | 2548 | 3,69 % | [1,15, 1,17] % |
| Irradiation 4 | 722 | 2,84 % | [0,32, 0,34] % | Irradiation 4 | 1890 | 3,07 % | [0,86, 0,87] % |
| Irradiation 5 | 607 | 2,47 % | [0,27, 0,28] % | Irradiation 5 | 1503 | 2,63 % | [0,68, 0,69] % |
| Irradiation 6 | 649 | 2,60 % | [0,29, 0,30] % | Irradiation 6 | 2581 | 3,75 % | [1,17, 1,18] % |
| Moyenne ($\pm 1\sigma$) | 616 \pm 80 | (2,57 \pm 0,24) % | (0,28 \pm 0,04) % | Moyenne ($\pm 1\sigma$) | 2082 \pm 420 | (3,23 \pm 0,43) % | (0,95 \pm 0,19) % |
| 150 kBq | Coups/seconde (moyenne) | Taux d’empilement | | 300 kBq | Coups/seconde (moyenne) | Taux d’empilement | |
| | | mesuré | théorique | | | mesuré | théorique |
| Irradiation 1 | 4994 | 4,14 % | [2,26, 2,27] % | Irradiation 1 | 10162 | 6,27 % | [4,54, 4,55] % |
| Irradiation 2 | 6222 | 4,69 % | [2,80, 2,81] % | Irradiation 2 | 9773 | 6,08 % | [4,37, 4,38] % |
| Irradiation 3 | 5983 | 4,49 % | [2,70, 2,71] % | Irradiation 3 | 12978 | 7,45 % | [5,77, 5,78] % |
| Irradiation 4 | 5966 | 4,52 % | [2,69, 2,70] % | Irradiation 4 | 10151 | 6,29 % | [4,54, 4,55] % |
| Irradiation 5 | 4578 | 3,98 % | [2,07, 2,08] % | Irradiation 5 | 7103 | 4,70 % | [3,20, 3,21] % |
| Irradiation 6 | 10585 | 6,19 % | [4,73, 4,74] % | Irradiation 6 | 30684 | 13,66 % | [13,11, 13,12] % |
| Moyenne ($\pm 1\sigma$) | 6388 \pm 2154 | (4,67 \pm 0,79) % | (2,88 \pm 0,95) % | Moyenne ($\pm 1\sigma$) | 13 475 \pm 8634 | (7,41 \pm 3,19) % | (5,93 \pm 3,61) % |

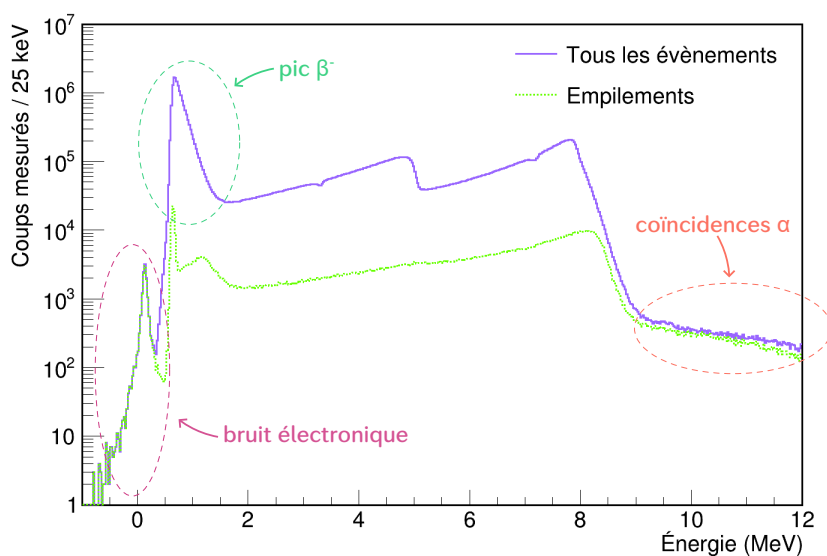


Figure 5.6 – Distribution en énergie de l’ensemble des événements mesurés (trait plein, violet) et des événements marqués comme empilés (pointillés, vert) pour un des puits de culture contenant initialement 50 kBq, lors de l’irradiation 3 (voir **Table 5.4**).

correspond à des empilements de signaux issus de particules dont l'énergie est proche du seuil de détection, avec des signaux issus du bruit de fond électronique. Le second pic, de plus haute énergie mais aussi également sur une plus large gamme d'énergies, correspond à la détection quasi-simultanée de plusieurs particules β^- .

De l'autre côté du spectre, au-delà de l'énergie maximale des particules α pouvant atteindre les détecteurs (environ 8,2 MeV), des événements sont mesurés à des énergies allant jusqu'à 16 MeV. Ces énergies correspondent à des particules α détectées quasi-simultanément. Toutes ces coïncidences ne sont pas détectées comme empilées, certaines paires de particules pouvant être détectées à un intervalle de temps inférieur à la largeur du signal de détection.

Entre 1,5 MeV et 8 MeV, le signal est principalement dû à la détection d'une seule particule α , éventuellement empilée avec un électron. Cependant, un taux d'empilements significativement supérieur à celui attendu est observé entre 5 MeV et 8 MeV, et se traduit par une absence de front aux environs de 5 MeV dans le spectre des événements empilés. Cette surabondance d'empilements correspond probablement à des coïncidences β^- - α liées à la chaîne de décroissance du ^{212}Pb . En effet, les particules α de 8,8 MeV sont émises par le ^{212}Po , de demi-vie 300 ns, qui fait suite à une désintégration β^- d'énergie maximale 2,3 MeV du ^{212}Bi . Cette faible demi-vie, proche de la durée caractéristique des signaux produits dans les détecteurs à semi-conducteurs (environ 20 ns), permet la détection simultanée des deux émissions successives : la probabilité pour qu'une désintégration α du ^{212}Po se produise en moins de 20 ns est de $1 - \exp(-20/300) = 6,4\%$. La formule décrivant la probabilité d'observer un empilement en fonction du taux d'événements mesurés présentée en **Équation 2.5 (p47)** suppose que les instants de détection des particules sont décorrélés entre eux, ce qui est mis en défaut pour ces émissions α faisant suite à une émission β^- . La faible demi-vie du ^{212}Po est donc à l'origine de la différence observée entre les taux d'empilements théoriques et observés.

Enfin, les empilements étant principalement distribués sur la partie du spectre correspondant aux événements d'intérêt (provoqués par l'interaction d'une seule particule, entre 0,5 keV et 8 keV), une correction de l'empilement sur les spectres en fonction du taux d'empilement mesuré (voir **Équation 2.4, p46**) plutôt qu'en fonction du taux théorique permet une meilleure reconstruction de l'amplitude réelle des spectres mesurés. Cette correction a donc été appliquée à l'ensemble des spectres en énergie acquis au cours de cet essai.

5.2.3 Analyse des spectres en énergie

Pour chacune des séries de mesures, entre 46 et 48 spectres par détecteurs ont été produits, en fonction de la durée totale d'acquisition, et ont été analysés à l'aide de l'algorithme C-NNML. Les distributions d'activité évaluées ont été contraintes à satisfaire les activités totales mentionnées en **Table 5.3**. Les **Figures 5.7 à 5.10** illustrent la diversité des allures des spectres correspondant à la même activité, dans les premières minutes après l'injection de l'activité dans les puits de culture, et après 3 h d'irradiation.

Dès les premières minutes après l'injection de l'activité dans les puits de culture, comme le montrent les **Figures 5.7a à 5.7d**, les spectres en énergie correspondant aux puits ayant reçu la même activité de ^{212}Pb ne se superposent pas. Ils sont caractérisés par des amplitudes ainsi que des allures significativement différentes, suggérant à eux seuls une forte disparité des distributions spatiales du ^{212}Pb pour des puits contenant une même activité. Cette variété des distributions observées est confirmée par les distributions spatiales d'activité obtenues à l'aide de l'algorithme C-NNML, présentées dans les **Figures 5.8a à 5.8d**.

Les distributions d'activité ont été obtenues en supposant une confluence de cellules au fond des puits de culture de 100 %, en modélisant les cellules selon la géométrie présentée au **Chapitre 4**, et en supposant une hauteur des cellules de 20 μm . Cette valeur de confluence a été choisie à l'aide de l'évaluation de la log-vraisemblance réduite (voir **Section 5.1.1.2**) pour différentes valeurs de confluence. Pour l'ensemble des spectres, utiliser une valeur de confluence inférieure à

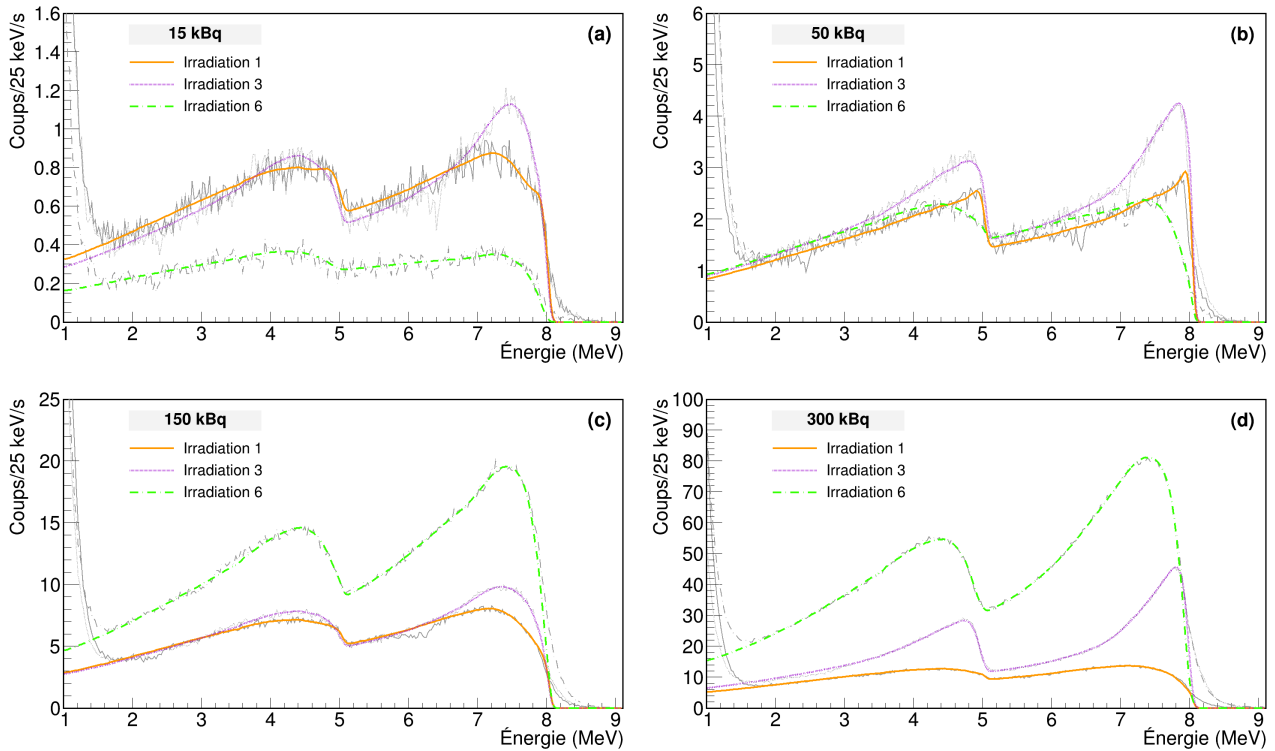


Figure 5.7 – Superposition des spectres en énergie mesurés par les détecteurs (en gris) 5 min après le début de l’acquisition, pour trois des six irradiations, pour les quatre activités testées ((a) 15 kBq, (b) 50 kBq, (c) 150 kBq, (d) 300 kBq), et de leur ajustement par l’algorithme C-NNML (en couleur).

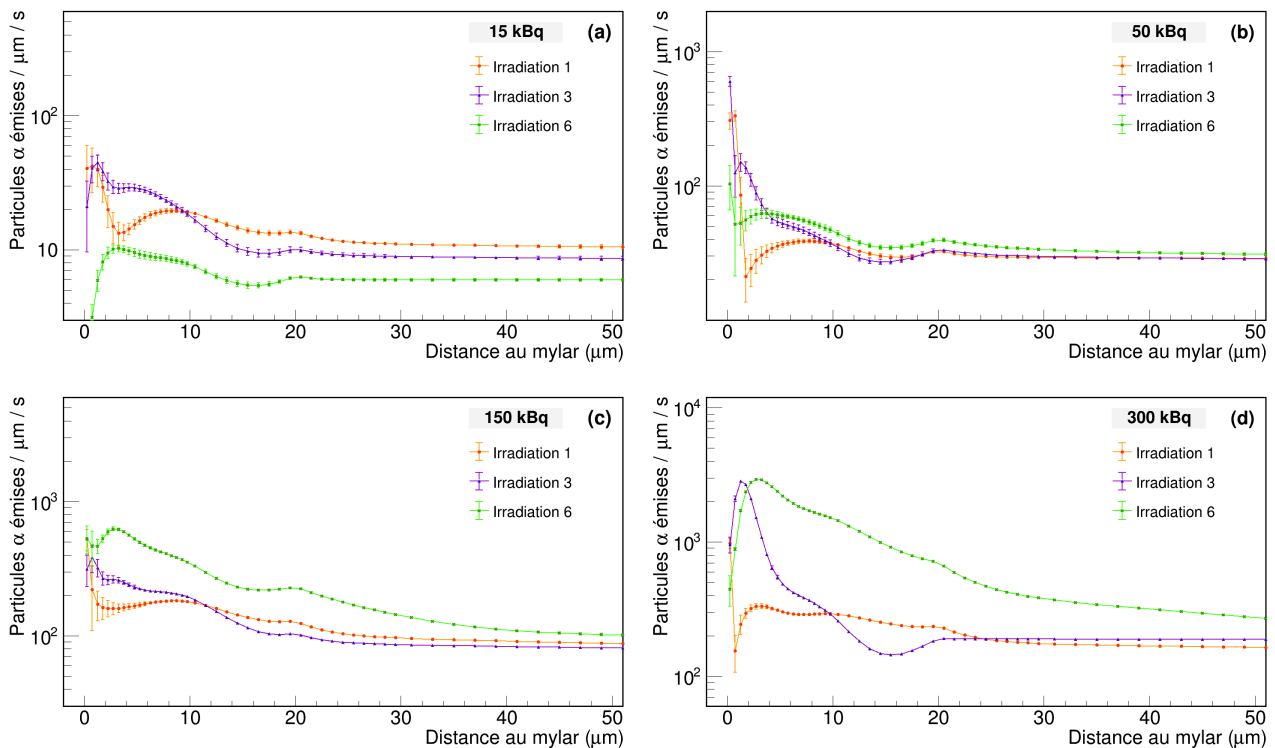


Figure 5.8 – Distributions spatiales évaluées des activités de ^{212}Pb , 5 min après le début de l’acquisition, pour trois des six irradiations, pour les quatre activités testées ((a) 15 kBq, (b) 50 kBq, (c) 150 kBq, (d) 300 kBq). Les barres d’erreurs correspondent à l’incertitude évaluée à 1σ .

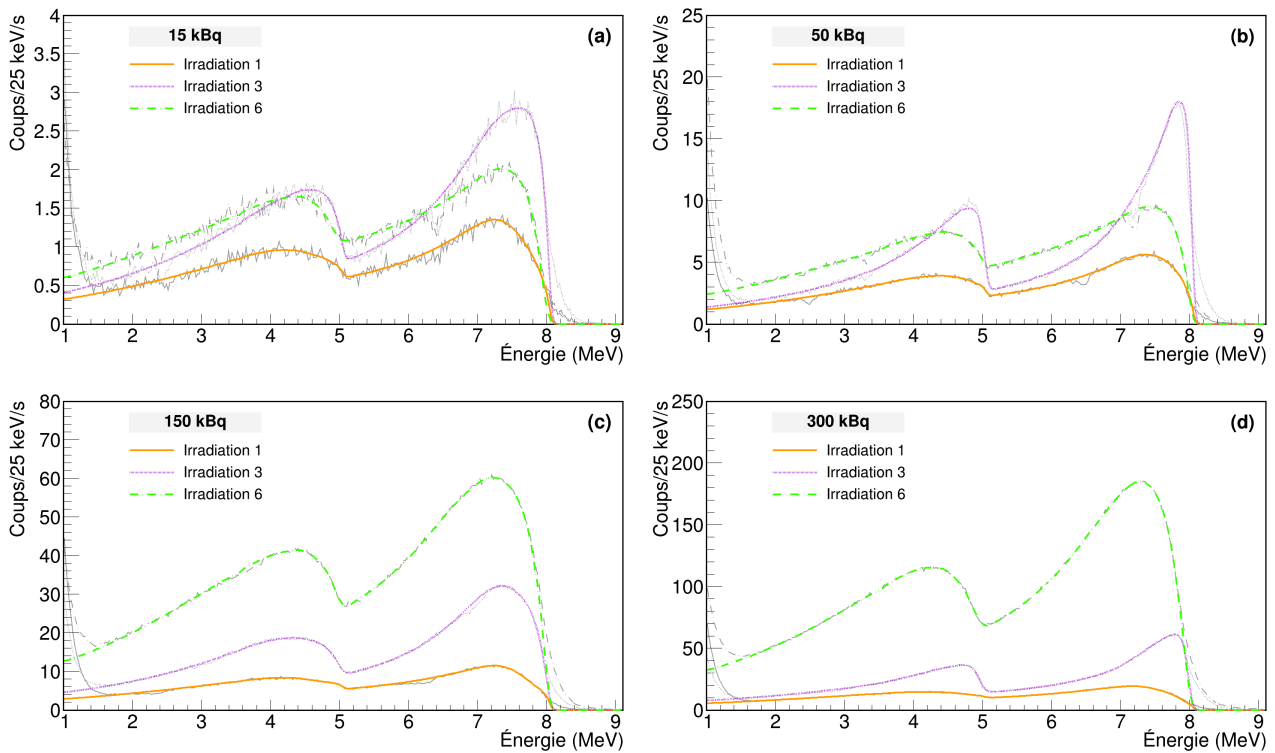


Figure 5.9 – Superposition des spectres en énergie mesurés par les détecteurs (en gris) 3 h après le début de l'acquisition, pour trois des six irradiations, pour les quatre activités testées ((a) 15 kBq, (b) 50 kBq, (c) 150 kBq, (d) 300 kBq), et de leur ajustement par l'algorithme C-NNML (en couleur).

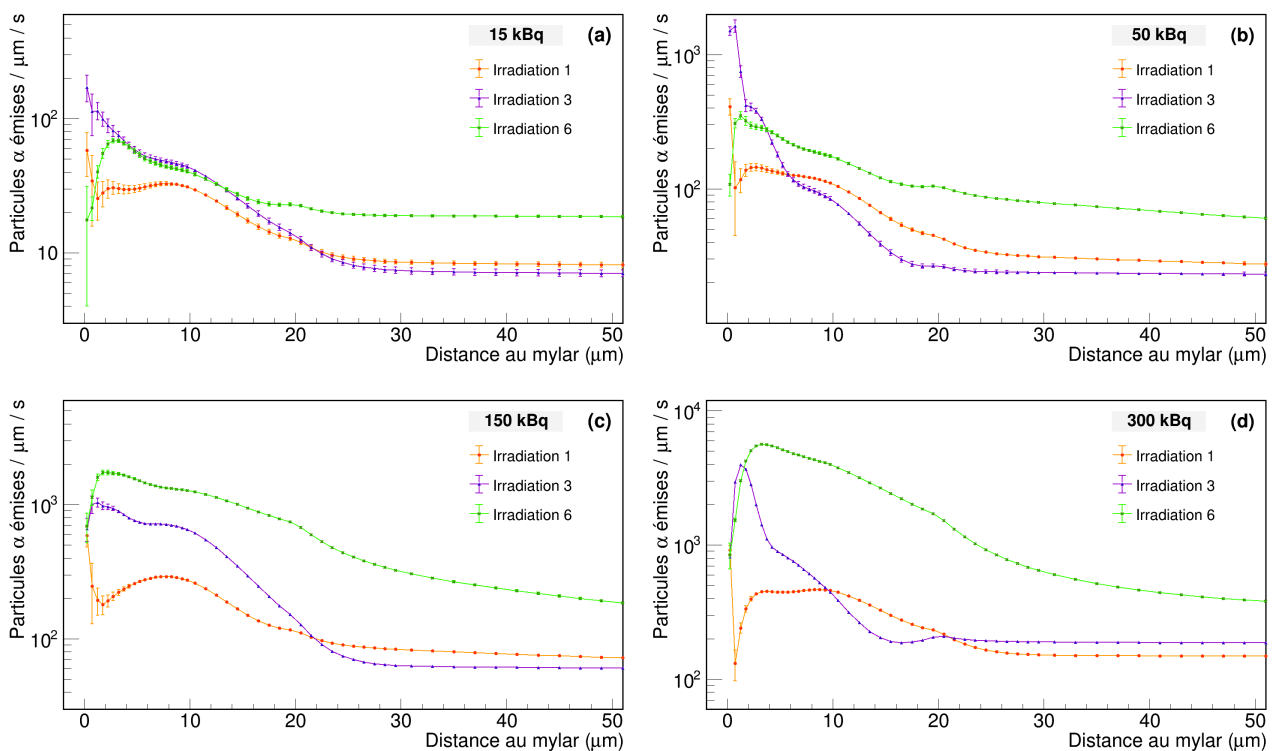


Figure 5.10 – Distributions spatiales évaluées des activités de ^{212}Pb , 3 h après le début de l'acquisition, pour trois des six irradiations, pour les quatre activités testées ((a) 15 kBq, (b) 50 kBq, (c) 150 kBq, (d) 300 kBq). Les barres d'erreurs correspondent à l'incertitude évaluée à 1σ .

95 % dégradait significativement la qualité de l'ajustement, et les valeurs de vraisemblance ont été maximisées pour une confluence proche de 100 %.

Les spectres ont également été analysés en excluant le pic associé à la contribution des émissions β^- , ainsi que les queues de haute énergie présentes sur le front associé à la détection des particules α de 8,785 MeV. Ces contributions de haute énergie sont beaucoup plus importantes que celles observées lors des irradiations au ^{223}Ra (cf. **Figure 5.3**, et **Section 5.1.2.2**), du fait de la corrélation temporelle entre les émissions α de 8,8 MeV du ^{212}Po et les émissions β^- du ^{211}Bi .

À 3 h d'irradiation, les allures des spectres mesurés (**Figures 5.9a à 5.9d**) n'évoluent pas de la même façon pour toutes les irradiations, ou toutes les activités testées. Similairement, les distributions linéiques d'activité (**Figures 5.10a à 5.10d**) évoluent différemment dans le temps pour les différentes mesures. Par exemple, les amplitudes relatives des spectres mesurés pour les puits contenant initialement 15 kBq de ^{212}Pb changent significativement entre 5 min et 3 h après le début de l'acquisition.

L'amplitude des spectres et des gradients d'activité n'est pas la seule caractéristique sujette à fluctuation, pour une activité donnée. En effet, l'allure des fronts observés sur les spectres (provoqués par l'activité s'accumulant dans les premiers μm), mais également des queues de basse énergie (dépendantes de la distribution de l'activité au delà de 10 μm), ne semblent pas reproductibles d'une irradiation à l'autre.

Une autre observation intéressante concerne l'évolution temporelle des distributions d'activités pour tous les puits de culture de la dernière irradiation. Si pour les autres irradiations, la majorité de l'évolution de la distribution d'activité consiste principalement en une accumulation de l'activité dans les 20 premiers μm , cette accumulation se produit sur une hauteur beaucoup plus importante pour la dernière irradiation, avec un gradient d'activité devant beaucoup plus étalé spatialement (voir **Figure 5.10d**). Cette accumulation importante de l'activité en ^{212}Pb , qui peut être corrélée à la composition de la solution présente dans les puits contenant du milieu de culture en proportion la plus faible, est à l'origine de taux de comptage significativement plus élevés pour les plus hautes activités testées (voir **Table 5.4**), mais a également des conséquences importantes sur la dosimétrie cellulaire, qui sont discutées dans le paragraphe suivant.

5.2.4 Évaluation des grandeurs dosimétriques

Après l'évaluation, pour chacun des puits de culture, de la distribution spatiale et temporelle de l'activité en ^{212}Pb , les doses délivrées aux cellules et aux noyaux ont été évaluées à partir du formalisme du MIRD. La méthode de simulation des grandeurs dosimétriques et microdosimétriques présentée au **Chapitre 4** ne permettant pas de simuler une confluence cellulaire supérieures à 60 %, du fait de la nécessité de modéliser des contacts et donc des déformations cellulaires, la dosimétrie a été réalisée à l'aide de la base de données de facteurs S et ζ_1 correspondant à une confluence cellulaire de 60 %, pour des cellules ellipsoïdales de hauteur 20 μm . Pour l'ensemble des irradiations et des activités testées, les **Figures 5.11** et **5.12** présentent respectivement les courbes de débit de dose et de dose cumulées aux cellules, évaluées en fonction du temps à partir du dépôt de l'activité dans les puits de culture.

La variabilité apparente sur les allures des spectres et donc des distributions linéiques d'activité calculées se traduit en une forte variabilité des courbes de débit de dose présentées en **Figure 5.11**, pour une activité donnée et en fonction de l'irradiation considérée.

En effet, bien que pour l'ensemble des acquisitions réalisées, le débit de dose augmente significativement au cours des premières minutes, cette augmentation ne se produit pas selon la même cinétique pour les différents puits de culture. De plus, même si cette augmentation est de plus en plus faible au cours du temps, elle peut se produire pour la totalité de l'irradiation, comme dans le cas de l'ensemble des puits pour la dernière irradiation, ou faire place à une diminution progressive du débit de dose, comme observé pour l'ensemble des puits lors de la

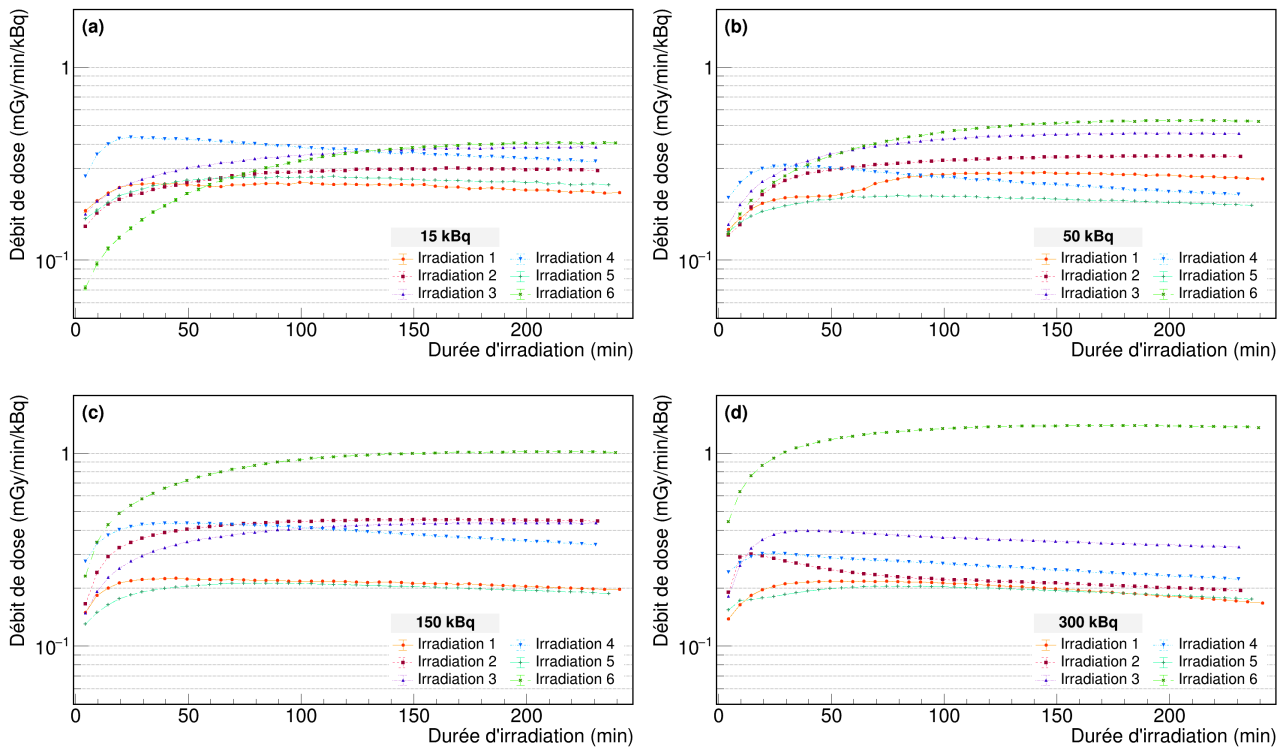


Figure 5.11 – Courbes de débit de dose aux cellules en fonction du temps après injection de l’activité dans les puits de culture pour les six irradiations, pour les quatre activités testées ((a) 15 kBq, (b) 50 kBq, (c) 150 kBq, (d) 300 kBq). Les barres d’erreurs, généralement moins larges que les points, sont données à 3σ .

quatrième irradiation. Cette différence sur les évolutions des débits de dose résulte à la fois de l’accumulation systématiquement observée de l’activité au fond des puits de culture, qui tend à faire augmenter le débit de dose, et de la diminution de l’activité totale présente dans les puits de culture, qui contribue au contraire à réduire le débit de dose. L’importance relative de ces deux phénomènes apparaît variable entre les différentes irradiations, et peut être liée à la distribution des cellules au fond des puits de culture qui peut varier entre les différents puits.

L’accumulation beaucoup plus importante de l’activité dans le volume pour lequel les émissions sont à portée des cellules, observée pour la dernière irradiation pour les activités de 150 kBq et 300 kBq aux **Figures 5.10c** et **5.10d**, se traduit également en des courbes de débit de dose significativement plus élevées pour cette irradiation sur les **Figures 5.11c** et **5.11d**. A l’inverse, pour la première irradiation, associée à des faibles amplitudes de gradient d’activité dans les **Figures 5.8** et **5.10**, les débits de dose observés sont généralement plus faibles que la moyenne.

Cette forte variabilité des allures des courbes de débit de dose se traduit assez logiquement en une variabilité des courbes de dose cumulée aux cellules en fonction du temps, présentées en **Figure 5.12**. Les amplitudes de ces courbes, et en particulier la dose totale à la fin de l’irradiation, ne sont pas ordonnées selon le numéro de l’irradiation, chacune d’entre elle étant caractérisée par des proportions de milieu de culture de plus en plus faible. De plus, cette hiérarchie n’est pas identique pour les différentes activités testées. La proportion de milieu de culture pour les différentes irradiations ne peut donc pas expliquer à elle seule la variabilité importante des doses délivrées au milieu cellulaire. D’autres facteurs, notamment l’occupation du milieu cellulaire au fond des puits de culture, ou le protocole de dilution de l’activité dans les puits, peuvent être à l’origine de cette disparité.

A la fin de l’acquisition, les doses totales délivrées et le nombre de traces de particules α

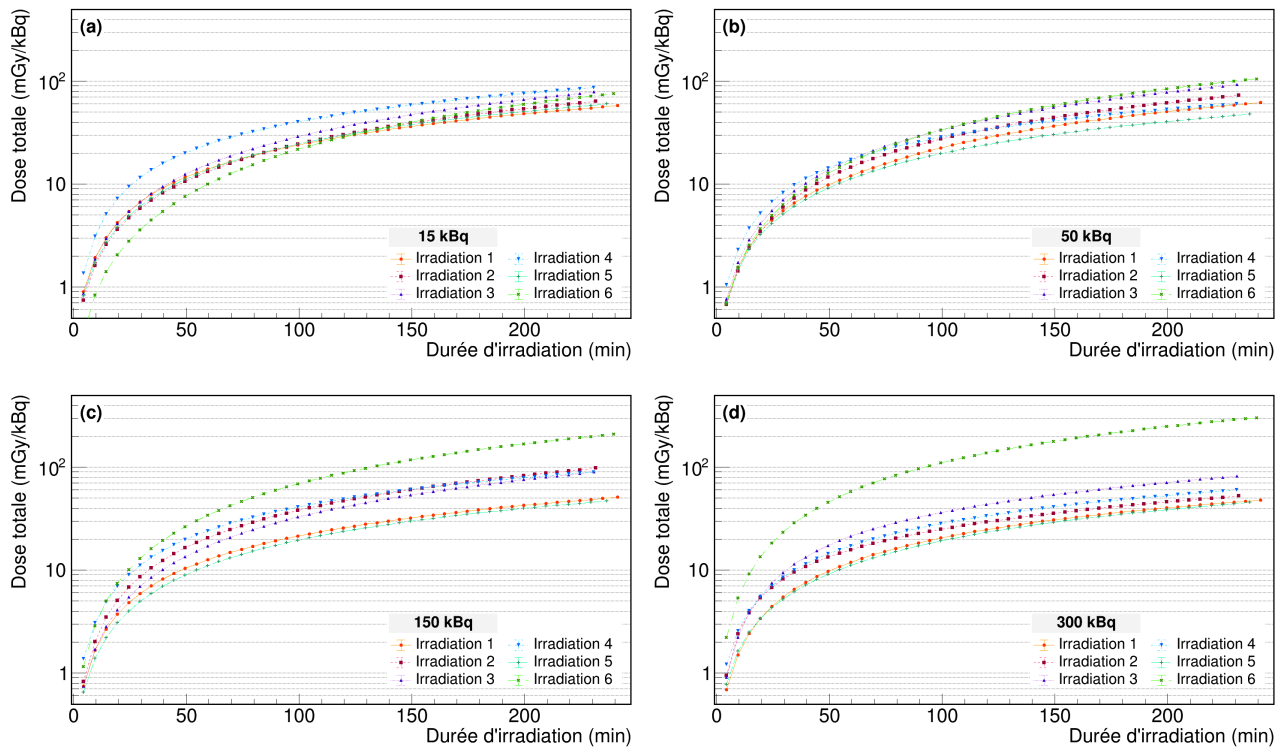


Figure 5.12 – Courbes de dose cumulée aux cellules en fonction du temps après injection de l’activité dans les puits de culture pour les six irradiations, pour les quatre activités testées ((a) 15 kBq, (b) 50 kBq, (c) 150 kBq, (d) 300 kBq). Les barres d’erreurs, généralement moins larges que les points, sont données à 3σ .

moyen généré pendant l’irradiation aux cellules et aux noyaux, ainsi que la fluctuation de ces grandeurs entre les différentes cibles, ont été calculés. Ces valeurs, pour les différentes activités testées, sont synthétisées dans la **Table 5.5**.

La dose moyenne délivrée aux cellules et aux noyaux pour les six irradiations évolue assez linéairement avec l’activité injectée dans les puits de culture. Cependant, la fluctuation entre irradiations de même activité augmente fortement avec celle-ci, représentant moins de 20 % de la dose moyenne à 15 kBq contre plus de 100 % pour les puits ayant reçu 300 kBq de ^{212}Pb . De la même façon, les rapports entre la dose la plus élevée et la dose la plus faible sont de 1,46, 1,95, 4,45 et 6,70 à 15, 50, 150 et 300 kBq, respectivement. Ces valeurs confirment donc la difficulté d’établir une relation déterministe entre activité injectée et dose délivrée qui avait été mise en évidence lors des essais préliminaires au ^{223}Ra en **Section 5.1.3**, et confirment la nécessité d’une méthode dosimétrique basée sur la détermination expérimentale de la distribution de l’activité au cours des essais *in vitro*.

Pour les irradiations avec injection d’une activité de ^{212}Pb au moins supérieure à 50 kBq, la dose moyenne délivrée aux cellules et aux noyaux est généralement suffisamment importante pour que la stochasticité sur la dose reçue entre cellules ou entre noyaux soit inférieure ou égale à 20 %. Pour les puits ayant reçus 15 kBq de ^{212}Pb , la stochasticité est aux environs du seuil du critère microdosimétrique (de 20 %) pour les cellules, mais est significativement plus élevée pour la dose déposée aux noyaux cellulaires selon la modélisation considérée, et pourrait atteindre 40 % de la dose totale pour la première irradiation. Si les cibles d’intérêts pour la quantification radiobiologique sont les noyaux, comme dans le cas de l’évaluation de l’occurrence de cassures double brin de l’ADN (*cf.* **Chapitre 1**), l’utilisation de la dose moyenne pour quantifier la relation dose-effet pourrait donc biaiser significativement l’interprétation réalisée. Pour autant, le nombre de traces α moyen dans chaque noyau indique qu’une proportion de $1 - \exp(-5) = 99,3\%$

Tableau 5.5 – Caractérisations dosimétriques des différentes irradiations réalisées à l'aide du système de dosimétrie des essais *in vitro*, regroupées selon l'activité de ^{212}Pb injectée. Les incertitudes sur la dose totale sont données à 3σ .

| 15 kBq | A la cellule | | | Au noyau | | |
|---|-------------------------|--|---------------------------|-------------------------|--|---------------------------|
| | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre cellules (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre noyaux (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) |
| Irradiation 1 | (0,90 ± 0,02) Gy | 0,21 Gy (23 %) | 19 | (1,05 ± 0,02) Gy | 0,40 Gy (40 %) | 5 |
| Irradiation 2 | (0,96 ± 0,01) Gy | 0,21 Gy (22 %) | 21 | (1,10 ± 0,02) Gy | 0,41 Gy (37 %) | 5 |
| Irradiation 3 | (1,22 ± 0,02) Gy | 0,24 Gy (19 %) | 27 | (1,38 ± 0,02) Gy | 0,46 Gy (33 %) | 6 |
| Irradiation 4 | (1,32 ± 0,02) Gy | 0,25 Gy (19 %) | 28 | (1,51 ± 0,03) Gy | 0,49 Gy (32 %) | 7 |
| Irradiation 5 | (0,93 ± 0,02) Gy | 0,21 Gy (22 %) | 20 | (1,06 ± 0,02) Gy | 0,41 Gy (38 %) | 5 |
| Irradiation 6 | (1,17 ± 0,02) Gy | 0,24 Gy (20 %) | 25 | (1,36 ± 0,02) Gy | 0,46 Gy (34 %) | 6 |
| Moyenne ($\pm 1\sigma$) | (1,08 ± 0,18) Gy | | 23 ± 4 | (1,24 ± 0,20) Gy | | 6 ± 1 |

| 50 kBq | A la cellule | | | Au noyau | | |
|---|-------------------------|--|---------------------------|-------------------------|--|---------------------------|
| | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre cellules (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre noyaux (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) |
| Irradiation 1 | (3,21 ± 0,03) Gy | 0,39 Gy (12 %) | 68 | (3,69 ± 0,05) Gy | 0,75 Gy (20 %) | 17 |
| Irradiation 2 | (3,66 ± 0,03) Gy | 0,41 Gy (11 %) | 80 | (4,15 ± 0,04) Gy | 0,79 Gy (19 %) | 20 |
| Irradiation 3 | (4,78 ± 0,04) Gy | 0,47 Gy (10 %) | 103 | (5,27 ± 0,05) Gy | 0,90 Gy (17 %) | 24 |
| Irradiation 4 | (3,05 ± 0,03) Gy | 0,38 Gy (13 %) | 64 | (3,52 ± 0,05) Gy | 0,75 Gy (21 %) | 16 |
| Irradiation 5 | (2,45 ± 0,02) Gy | 0,34 Gy (14 %) | 52 | (2,81 ± 0,04) Gy | 0,66 Gy (23 %) | 13 |
| Irradiation 6 | (5,40 ± 0,05) Gy | 0,51 Gy (9 %) | 116 | (6,22 ± 0,07) Gy | 0,99 Gy (16 %) | 29 |
| Moyenne ($\pm 1\sigma$) | (3,76 ± 1,12) Gy | | 81 ± 25 | (4,28 ± 1,25) Gy | | 20 ± 6 |

| 150 kBq | A la cellule | | | Au noyau | | |
|---|--------------------------|--|---------------------------|---------------------------|--|---------------------------|
| | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre cellules (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre noyaux (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) |
| Irradiation 1 | (7,97 ± 0,06) Gy | 0,61 Gy (8 %) | 169 | (9,22 ± 0,08) Gy | 1,19 Gy (13 %) | 43 |
| Irradiation 2 | (14,80 ± 0,07) Gy | 0,82 Gy (6 %) | 329 | (16,75 ± 0,10) Gy | 1,57 Gy (10 %) | 81 |
| Irradiation 3 | (13,91 ± 0,06) Gy | 0,79 Gy (6 %) | 309 | (15,72 ± 0,09) Gy | 1,53 Gy (10 %) | 75 |
| Irradiation 4 | (13,74 ± 0,07) Gy | 0,81 Gy (6 %) | 291 | (15,48 ± 0,11) Gy | 1,56 Gy (10 %) | 70 |
| Irradiation 5 | (7,24 ± 0,05) Gy | 0,58 Gy (8 %) | 154 | (8,31 ± 0,07) Gy | 1,13 Gy (14 %) | 39 |
| Irradiation 6 | (32,21 ± 0,15) Gy | 1,22 Gy (4 %) | 707 | (36,88 ± 0,21) Gy | 2,36 Gy (6 %) | 176 |
| Moyenne ($\pm 1\sigma$) | (14,98 ± 9,04) Gy | | 327 ± 200 | (17,06 ± 10,35) Gy | | 76 ± 56 |

| 300 kBq | A la cellule | | | Au noyau | | |
|---|---------------------------|--|---------------------------|---------------------------|--|---------------------------|
| | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre cellules (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) | Dose totale (moyenne) | Fluctuations entre noyaux (écart-type sur la dose) | Traces α (moyenne) |
| Irradiation 1 | (14,86 ± 0,07) Gy | 0,83 Gy (6 %) | 315 | (17,26 ± 0,11) Gy | 1,63 Gy (9 %) | 81 |
| Irradiation 2 | (15,89 ± 0,08) Gy | 0,86 Gy (5 %) | 339 | (18,11 ± 0,12) Gy | 1,68 Gy (9 %) | 83 |
| Irradiation 3 | (25,39 ± 0,10) Gy | 1,09 Gy (4 %) | 550 | (28,34 ± 0,15) Gy | 2,10 Gy (8 %) | 129 |
| Irradiation 4 | (18,43 ± 0,12) Gy | 0,93 Gy (5 %) | 388 | (21,19 ± 0,16) Gy | 1,82 Gy (9 %) | 97 |
| Irradiation 5 | (13,97 ± 0,06) Gy | 0,80 Gy (6 %) | 298 | (16,18 ± 0,09) Gy | 1,57 Gy (10 %) | 76 |
| Irradiation 6 | (93,53 ± 0,24) Gy | 2,06 Gy (2 %) | 2090 | (106,43 ± 0,36) Gy | 3,97 Gy (4 %) | 515 |
| Moyenne ($\pm 1\sigma$) | (30,35 ± 31,23) Gy | | 663 ± 705 | (34,59 ± 35,47) Gy | | 164 ± 173 |

des noyaux auront reçu au moins une trace de particule α ce qui signifie que la plupart des cibles considérées auront été irradiées, et donc peut justifier l'absence d'une considération microdosimétrique de ces essais.

5.2.5 Évaluation des effets biologiques

A la suite de l'irradiation, après le retrait du milieu de culture contenant l'activité et la fixation des cellules par une solution de PFA, une immunocytochimie du milieu cellulaire a été réalisée par l'ISTCT. Une série d'images issues d'un essai d'immunocytochimie est présentée en **Figure 5.13**, pour la première irradiation, et pour deux milieux cellulaires différents : un issu de la plaque de contrôle, non-irradiée, et un issu du puits ayant reçu une activité de 150 kBq de ^{212}Pb .

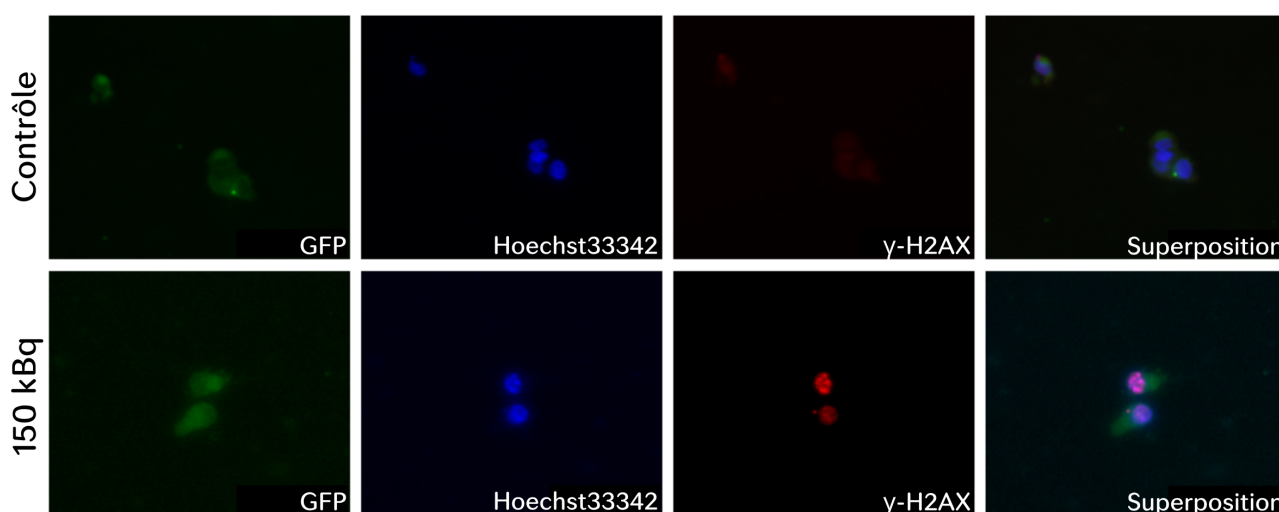


Figure 5.13 – Immunocytochimie cellulaire pour la première irradiation. Des images associées à une culture cellulaire non-irradiée (contrôle) ou ayant reçu une injection de 150 kBq sont présentées. Les cellules sont identifiées à l'aide d'une protéine de fluorescence verte (GFP), les noyaux à l'aide du marqueur Hoechst33342, et les cassures double-brin de l'ADN à l'aide du marqueur anti- γ -H2AX, ce qui permet d'observer un effet différencié en termes de cassures à l'ADN entre les cellules non-irradiées et irradiées.

Les images présentées en **Figure 5.13** mettent en évidence l'absence de cassures double-brin sur la culture n'ayant pas reçu d'irradiation, en l'absence d'une fluorescence du marqueur anti- γ -H2AX, alors que les cellules identifiables présentes dans le puits ayant reçu 150 kBq de ^{212}Pb montrent une réponse importante à ce marqueur, qui se superpose à la position des noyaux cellulaires identifiés par le marqueur Hoechst33342.

Néanmoins, ces premières images ont malheureusement révélé une mauvaise fixation du milieu cellulaire à la suite de l'irradiation. En effet, sur l'ensemble des cultures cellulaires imagées, de rares cellules ont pu être identifiées. D'autres images réalisées sur des cultures cellulaires entre la fixation après l'irradiation et le marquage fluorescent ont également montré une très faible implantation cellulaire sur le mylar. Pour autant, lors des analyses spectrales, une confluence d'environ 100 % était nécessaire à une bonne reproduction des mesures expérimentales, signifiant qu'une population cellulaire significative (ou de débris) étaient présente lors des mesures.

Les premiers essais d'immunocytochimie réalisés au **Chapitre 2** avaient pourtant montré une fixation satisfaisante du milieu cellulaire sur les fonds en mylar. Les irradiations qui avaient été réalisées étaient cependant hors incubateur, et avec des cellules différentes (MDA-MB-231-Br contre NCI-H2030 ici), et avaient tout de même montré des résultats non-optimaux. Ces essais de fixation pourraient ne pas être représentatifs des essais présentés dans ce chapitre. Pour

pallier à ces limites, qui réduisent fortement la possibilité de quantifier les effets biologiques associés à l'irradiation (l'analyse étant toujours en cours), des études sur un pré-traitement du fond des puits pour assurer une meilleure fixation cellulaire sont prévues.

5.3 Conclusions

Ce chapitre a présenté des applications du nouveau système de dosimétrie pour des irradiations *in vitro* au ^{223}Ra et au ^{212}Pb . Les premiers essais réalisés, pour des irradiations au ^{223}Ra , ont permis de valider l'utilisation du nouveau système de dosimétrie. Ils ont confirmé, pour un autre radionucléide que le ^{212}Pb , que la distribution de l'activité dans le milieu de culture peut être décrite par un gradient vertical, du fait de l'accumulation de l'activité au fond des puits de culture, mais également que l'évolution temporelle de ce gradient (en particulier son amplitude et son étalement) est complexe. De plus, le ^{223}Ra étant caractérisé par une chaîne de décroissance longue contenant quatre émissions α , l'analyse spectrale a mis en évidence la présence de gradients d'activité distincts pour les différents émetteurs de cette chaîne, et donc une complexité supplémentaire à prendre en compte pour l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité, nécessaire à l'obtention d'un ajustement spectral de qualité par l'algorithme C-NNML, comme mentionné au **Chapitre 3**.

D'autres essais au ^{223}Ra ont également été menés afin d'étudier l'impact de deux conditions expérimentales sur les gradients d'activités mesurés dans les puits de culture : la composition de la solution présente dans les puits de culture, et l'activité initialement injectée. Une accumulation beaucoup plus importante de l'activité a été observée lorsque celle-ci est diluée dans de l'eau par rapport à une dilution dans du milieu de culture. Lors des irradiations *in vitro*, l'activité est injectée à partir d'une solution dont la composition diffère de celle du milieu de culture. La composition finale du mélange contenu dans les puits de culture peut donc être une source de fluctuations sur la cinétique d'accumulation de l'activité au fond des puits de culture.

Cette fluctuation a été observée lors d'essais pour lesquels différentes activités ont été injectées dans les puits de culture. Bien que la dose délivrée aux cellules semble évoluer linéairement, le facteur de proportionnalité entre activité et dose est entaché d'une incertitude de 40 %. Cette incertitude élevée met donc en évidence la nécessité de réaliser une évaluation de la distribution spatiale de l'activité avec un système de dosimétrie tel que celui développé au cours de cette thèse. Enfin, cette série d'essais a également montré une diaphonie non-significative entre les différents puits d'une même plaque, qui n'est donc pas une source d'erreur pour le système de dosimétrie.

Ces observations et la validation de la méthodologie expérimentale ont permis l'utilisation du nouveau système de dosimétrie lors d'essais *in vitro* de la radiosensibilité de cellules tumorales, qui pourraient être traitées par le nouveau radiopharmaceutique ^{212}Pb - $\alpha\text{VCAM-1}$, à une irradiation au ^{212}Pb . Ces essais ont montré la faisabilité de la réalisation d'une dosimétrie en plaçant les détecteurs en incubateur, à l'aide de la chambre étanche dont la conception a été discutée au **Chapitre 2**. Ils ont de plus confirmé la complexité de la cinétique de la distribution spatiale d'activité dans les puits de culture dans le cas de la chaîne de décroissance simple du ^{212}Pb .

En effet, bien que la dose délivrée aux cellules ou aux noyaux apparaisse en moyenne linéaire avec l'activité injectée, des fluctuations importantes de la dose délivrée pour une activité donnée sont observées. Ces fluctuations sont d'autant plus importantes que l'activité injectée augmente, les facteurs séparant la dose la plus élevée de la plus faible allant de 1.46 pour 15 kBq de ^{212}Pb à 6.70 pour 300 kBq. Aucune origine claire ne peut être exclusivement attribuée à ces fluctuations, qui peuvent être dues simultanément à la composition des solutions présentes dans les puits de culture, à l'activité totale et à l'occupation du milieu cellulaire au fond des puits lorsque les cellules sont à confluence.

Des sources de biais ont été identifiées dans l'analyse spectrale pour le ^{212}Pb . La méthodologie

de suppression des événements empilés suivie d'une remise à l'échelle d'un facteur dépendant au taux d'empilement se base sur l'hypothèse selon laquelle les instants d'émission des particules atteignant le détecteur sont indépendants entre eux, ce qui n'est plus vérifié pour les émissions α du ^{211}Po dont la demi-vie est proche de la largeur temporelle du signal de déclenchement de l'acquisition. L'amplitude relative des fronts associés aux deux énergies possibles des particules α subie donc une légère distorsion lors de la correction, ce qui peut réduire la qualité de l'ajustement spectral. Cependant, pour les mesures réalisées ici, les distorsions observées sont généralement trop faibles pour biaiser significativement l'analyse spectrale. A haute activité, des coïncidences entre particules α sont également mesurées, mais sont présente en trop faible proportion pour significativement impacter la déconvolution spectrale.

L'utilisation du nouveau système de dosimétrie lors d'essais *in vitro* au ^{212}Pb a donc, similairement aux observations réalisées lors des irradiations préliminaires au ^{223}Ra , validé son utilisation en conditions expérimentales et souligné la nécessité d'une analyse de la distribution spatiale de l'activité non-fixée ou internalisée, en dilution dans le milieu de culture. Néanmoins, il convient de noter que les résultats issus de l'analyse des effets biologiques des essais *in vitro* ne permettent actuellement pas d'établir de relation dose-effet associée aux irradiations réalisées. Ces observations mettent en évidence une nécessité de faire évoluer le protocole pour la manipulation des cultures cellulaires, en modifiant le substrat réalisant le fond des puits.

6 | *Conclusions et perspectives*

Sommaire du chapitre

| | |
|----------------------------|-----|
| 6.1 Conclusions | 141 |
| 6.2 Perspectives | 143 |

6.1 Conclusions

Alors que la physique des rayonnements ionisants et de leur interaction avec la matière bénéficie aujourd'hui d'une description fine, son application en radiothérapie demeure encore sujette à de nombreux questionnements. En particulier, la radiobiologie est un domaine de recherche toujours en plein essor, et a pour but d'établir les relations existant entre les interactions des rayonnements sur la matière, physiques, et les conséquences pour les tissus ayant reçu l'irradiation, biologiques. L'objectif de cette thèse était donc, en premier lieu, de proposer une nouvelle méthode dosimétrique assurant une quantification fiable et précise de l'irradiation délivrée lors des essais *in vitro* de la RIV- α .

Basé sur une spectroscopie en énergie des particules α émises depuis les puits de culture, un nouveau système de dosimétrie utilisant des détecteurs à semi-conducteurs en silicium a été développé. Pour assurer la transmission des particules α depuis les puits de culture vers des détecteurs positionnés à proximité des cultures cellulaires, donc sous les puits, des plaques de cultures utilisant un fond en mylar de très faible épaisseur (2,5 μm) ont été conçues. La possibilité de développer des cultures cellulaires sur ces nouvelles plaques et de les analyser en immunocytochimie a également été démontrée, bien que la fixation cellulaire n'ait pas été optimale. Les détecteurs utilisés, dont les dimensions sont adaptées à celles des puits de culture mais aussi à la détection de l'énergie des particules α tout en limitant l'énergie déposée par les émissions β^- (le volume sensible ayant une épaisseur de 305 μm), atteignent une résolution en énergie inférieure à 35 keV à 5,5 MeV, correspondant à la perte d'énergie d'une particule α dans l'eau sur moins d'un micromètre. Cette résolution permet donc de caractériser avec précision la distribution spatiale des émetteurs α dans les puits de culture.

Afin de protéger les détecteurs et de leurs pré-amplificateurs de l'humidité, les essais *in vitro* devant être réalisés en incubateur pour maintenir l'intégrité du milieu cellulaire, une enceinte étanche a été conçue et son utilisation a été validée expérimentalement. Celle-ci permet, à l'aide de passages de câbles étanches, d'accueillir les détecteurs et leurs pré-amplificateurs tout en les reliant à l'extérieur de l'incubateur, où se trouvent le système d'acquisition FASTER et les alimentations nécessaires. De plus, en utilisant une feuille fine de mylar aluminisé (6 μm)

comme fenêtre d'entrée de l'enceinte étanche, les détecteurs peuvent être positionnés à proximité immédiate des puits de culture, limitant donc la perte d'énergie des particules α détectées : pour le ^{212}Pb et le ^{223}Ra , les détecteurs peuvent détecter les particules α émises jusqu'à une hauteur d'environ 78 μm et 56 μm dans le puits de culture, respectivement. Enfin, les dimensions réduites de l'enceinte étanche et du système d'acquisition FASTER rendent le nouveau système de dosimétrie facile à transporter et à installer en incubateur.

Les spectres en énergie acquis lors des essais *in vitro* sont représentatifs de la localisation de l'activité dans les puits de culture au cours de l'irradiation. La méthode d'analyse spectrale initialement proposée et qui a été améliorée au cours de cette thèse se base sur une base spectrale de référence, obtenue par simulations Monte-Carlo. A cet effet, le volume du système de dosimétrie proche du fond des puits de culture, à savoir la plaque de culture, le milieu de culture, les feuilles de mylar servant de substrat et de fenêtre d'entrée de l'enceinte étanche, et les détecteurs, a été modélisé sous Geant4. Des simulations de la réponse des détecteurs selon la hauteur d'émission dans le puits de culture ont été réalisées, avec une résolution spatiale de seulement 0,5 μm à proximité du fond des puits, où se trouvent les cellules lors des irradiations. Tout spectre en énergie expérimental peut ainsi être reconstruit comme une somme pondérée des spectres simulés.

L'attribution des différents poids affectés aux spectres simulés, qui correspondent à l'activité présente à chacune des différentes hauteurs d'émissions, doit être estimée à l'aide d'un algorithme de minimisation. Un tel algorithme, conçu autour de considérations physiques, a été développé. Baptisé C-NNML, l'algorithme assure que les activités évaluées à chacune des hauteurs d'émissions sont positives, distribuées selon un gradient vertical, et dont la somme est proche de l'activité réellement présente dans les puits de culture. L'algorithme de déconvolution considère également une description poissonnienne du nombre de coups mesurés aux différents endroits du spectre via un algorithme de maximisation de la vraisemblance.

Pour vérifier les performances de l'algorithme, des irradiations *in vitro* au ^{212}Pb et au ^{223}Ra ont été simulées, en générant des spectres mesurés par les détecteurs et des doses délivrées aux cellules. Les spectres produits ont ensuite été ajustés par le nouvel algorithme de déconvolution C-NNML. Sur 210 irradiations simulées, l'écart entre la dose simulée et la dose évaluée par l'algorithme a systématiquement été inférieur à 3%. Dans le cas des irradiations au ^{223}Ra , caractérisé par une chaîne de décroissance beaucoup plus complexe, différentes distributions d'activité ont dû être attribuées aux différents émetteurs α . Malgré la présence de phénomènes de sur-ajustement pouvant se produire lors de l'évaluation simultanée de plusieurs distributions spatiales, la dosimétrie demeure fiable pour les irradiations au ^{223}Ra . Ces résultats sont donc prometteurs pour une utilisation de l'algorithme avec d'autres émetteurs α aujourd'hui considérés pour une application en RIV.

La conversion de la distribution spatiale évaluée par l'algorithme C-NNML en dose repose sur le formalisme du MIRD, et nécessite d'évaluer les facteurs S associés aux différentes hauteurs d'émission pour un radionucléide donné. Dans le cas du ^{212}Pb , l'impact de paramètres fondamentaux pour la modélisation du milieu cellulaire (la confluence et la hauteur des cellules) a montré que l'incertitude sur les facteurs S pouvait atteindre 13% selon les valeurs de ces paramètres. En plus du formalisme du MIRD, les énergies spécifiques associées aux événements individuels ζ_1 , des grandeurs microdosimétriques, ont été évaluées. Ces grandeurs permettent d'évaluer grossièrement la stochasticité de la délivrance de dose et le nombre de traces traversant chacune des cibles en moyenne. Les émetteurs α peuvent en effet délivrer une dose importante en très peu de traces en comparaison des émetteurs β^- plus couramment utilisés en RIV. Une trop grande stochasticité de la dose déposée ($> 20\%$) peut entraîner un biais dans la mise en relation entre dose délivrée et effets biologiques observés dans les modèles radiobiologiques.

Enfin, le nouveau système de dosimétrie a été testé en conditions expérimentales. Utilisées pour valider l'utilisation du montage expérimental et de la méthode C-NNML, les irradiations

au ^{223}Ra ont mis en évidence la complexité de la cinétique associée à la distribution spatiale de l'activité dans les puits de cultures, liée à la chaîne de décroissance complexe. En plus de la mise en évidence de gradients significatifs de l'activité évoluant au cours de l'irradiation, la nécessité de distinguer les distributions spatiales des différents émetteurs α a clairement été établie à l'aide des critères d'information bayésien et d'Akaike. Une première mise en évidence de l'impact de la composition de la solution présente dans les puits de culture et de l'activité injectée a été réalisée. En particulier, bien qu'une relation linéaire semble exister entre dose délivrée et activité injectée, les doses maximales et minimales aux cellules normalisées par l'activité injectée sont séparées d'un facteur 1.4 après 65 min d'irradiation.

L'étude *in vitro* de la radiosensibilité de cellules tumorales HV-2030 à une irradiation au ^{212}Pb a confirmé certaines des observations réalisées au ^{223}Ra . En particulier, bien qu'une corrélation existe entre activité injectée et dose délivrée aux cellules, l'écart-type sur la dose délivrée pour une activité donnée varie entre 17 % (pour 15 kBq de ^{212}Pb) et 103 % (pour 300 kBq de ^{212}Pb) de la dose totale. L'occupation du milieu cellulaire au fond des différents puits de culture, qui conditionne la distribution spatiale de l'activité diluée dans le milieu de culture, mais également l'activité injectée ainsi que la composition de la solution contenue dans les puits de culture pourraient jouer un rôle sur la dosimétrie des essais *in vitro*. Ces fluctuations significatives démontrent donc la nécessité d'une méthode de dosimétrie basée sur l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité.

À notre connaissance, il n'existe aujourd'hui pas d'autre étude de la cinétique de la distribution spatiale des radio-isotopes en conditions d'irradiation *in vitro*. Une telle étude a en effet un intérêt plus limité pour les émetteurs β^- , qui étaient majoritairement étudiés jusqu'à récemment, du fait de leur plus long parcours et de leur TEL constant dans la matière biologique qui rendent la dosimétrie moins dépendante de la distribution de l'activité. Cependant, comme les résultats obtenus l'illustrent, cette étude devient indispensable dans le cas d'irradiations utilisant des émetteurs α du fait de leurs très faibles parcours et de leur variation de valeur de TEL significative.

En plus de proposer une étude de la cinétique de distribution spatiale de l'activité au cours des irradiations *in vitro*, un nouveau système de dosimétrie sans équivalent expérimental, à notre connaissance, a donc été développé au cours de cette thèse, et permet de répondre à ce besoin propre aux émetteurs α .

6.2 Perspectives

Bien que le nouveau système de dosimétrie présenté dans ce manuscrit réponde à la problématique de la localisation de l'activité dans le milieu de culture lors des essais *in vitro* de la RIV- α , des axes d'amélioration de ce système sont envisageables. Le premier d'entre eux regroupe des problématiques liées à la facilité d'utilisation du système de dosimétrie. En particulier, des distorsions ont été observées dans les spectres en énergie acquis présentés au **Chapitre 5**. Celles-ci rendent nécessaire le pré-traitement des spectres par l'utilisateur, afin d'identifier pour chacun d'eux les zones à exclure de l'analyse.

Parmi ces distorsions, des sous-réponses ont été observées à des positions aléatoires dans les différents spectres acquis. Leur identification peut être particulièrement complexe lorsque celles-ci se produisent au niveau d'un front dans les spectres en énergie, et peut donc constituer une source d'incertitude supplémentaire dans l'analyse. De plus, l'exclusion de ces zones réduit la taille du vecteur de mesure, et donc augmente les risques de sur-ajustement spectral. Une identification de l'origine de ces sous-réponses, qui peuvent significativement biaiser la déconvolution spectrale, est donc nécessaire pour éliminer leur occurrence.

L'autre source de distorsions est d'origine physique, et provient des coïncidences entre particules atteignant le détecteur. Par exemple, la largeur du pic associé aux émissions β^- dépend

de l'activité présente dans le puits de culture et de son accumulation au fond des puits de culture, du fait de coïncidences de détection entre particules β^- . Ces variations sont cependant faibles et peuvent être ignorées en augmentant légèrement l'énergie minimale considérée dans l'analyse spectrale, par exemple à 1,5 MeV au lieu de 1 MeV. Plus problématiques, des queues de distribution de haute énergie sont également observées aux énergies maximales du spectre, et peuvent être source de biais pour la calibration automatique des spectres ainsi que pour la déconvolution spectrale. Une solution pourrait consister à modéliser analytiquement l'allure de ces queues de distribution directement dans l'algorithme de déconvolution, en fonction de la durée caractéristique du signal de déclenchement de l'acquisition et des activités associées à chacun des spectres de la base de déconvolution. Une majorité de ces coïncidences à haute énergie se produisent entre une particule α et une particule β^- , et nécessiterait donc de simuler le signal produit par les particules β^- dans les détecteurs pour construire la base de déconvolution.

Les irradiations au ^{212}Pb ont également montré que la présence d'une corrélation temporelle forte entre deux désintégrations successives est une source de distorsion du spectre, la correction des empilements reposant sur une hypothèse d'indépendance temporelle des particules interagissant dans le détecteur. Les distorsions observées sont cependant généralement suffisamment faibles pour pouvoir ajuster correctement les spectres acquis, et n'impactent donc pas la dosimétrie. Cette distorsion est cependant liée à l'amplitude du gradient d'amplitude (et donc au nombre de particules α détectées), et doit tout de même être contrôlée visuellement.

L'élimination de cette phase d'analyse préliminaire, en plus de limiter l'inclusion d'une subjectivité de l'utilisateur, permettrait d'automatiser entièrement la phase d'analyse spectrale du système de dosimétrie. L'algorithme C-NNML étant également caractérisé par sa rapidité (moins d'une seconde étant nécessaire à l'analyse d'un spectre en l'absence d'évaluation des incertitudes), l'automatisation de l'analyse permettrait de réaliser une dosimétrie en ligne des essais *in vitro*. La dose délivrée à la cible d'intérêt pourrait ainsi constituer un critère d'arrêt de l'irradiation, similairement à la philosophie associée aux plans de traitement utilisés en radiothérapie externe.

Cette dosimétrie, qui repose sur une évaluation de facteurs S par simulations Monte-Carlo, nécessite une modélisation précise du milieu cellulaire. Plusieurs études ont déjà montré l'importance de la modélisation de la géométrie cellulaire dans le cas d'une internalisation ou d'une fixation des radiopharmaceutiques [76, 77], et l'étude réalisée dans cette thèse montre que cet impact est également présent dans le cas de l'activité non-internalisée.

Le dernier axe principal d'amélioration de notre système de dosimétrie concerne le substrat utilisé pour réaliser le fond des puits de culture. Bien que des tests ont montré la fixation des cellules et la possibilité de réaliser des immunocytochimie avec un fond en mylar, ces tests ont été réalisés pour un protocole d'irradiation externe, qui diffère des protocoles associés aux irradiations *in vitro* en RIV. Les essais *in vitro* au ^{212}Pb , qui ont nécessité davantage de manipulations des puits de culture et de changement d'environnement, se sont traduits par une mauvaise fixation des cellules sur le substrat en mylar, ce qui rend difficile l'analyse des effets biologiques correspondant aux différentes irradiations réalisées. Une modification du substrat, que ce soit en traitant le revêtement de mylar ou en changeant le matériau utilisé, est prévue et sera testée dans les mois à venir.

Des évolutions de ce nouveau système de dosimétrie peuvent également être envisagées pour l'adapter à d'autres types d'échantillons cellulaires. Le système dosimétrique proposé dans cette thèse a été développé pour des irradiations de cultures bi-dimensionnelles. Les modèles tri-dimensionnels, reproduisant plus fidèlement le métabolisme cellulaire *in-vivo*, sont cependant de plus en plus plébiscités [64, 65]. Une adaptation de notre système de mesure pour ce type de cultures nécessiterait de concevoir une géométrie de détection permettant de positionner un détecteur d'irradiations α à proximité des modèles cellulaires, qui ne seraient plus systématiquement présentes au fond des puits de culture. La simulation des facteurs S

pour la dosimétrie serait également plus complexe et dépendante de la taille et de la forme du modèle tri-dimensionnel, chacune des cellules et des noyaux recevant une dose différente selon leur localisation dans le milieu cellulaire.

Outre le contrôle dosimétrique des études *in vitro* en radiobiologie, ce système présente un intérêt pour l'étude des modèles simulant des interactions entre rayonnement et matière à l'échelle cellulaire, comme le propose la plateforme de simulation Geant4-DNA [165], ou le code de simulation CPOP pour la simulation d'irradiations de sphéroïdes [162]. En effet, ce système permettrait d'établir expérimentalement des corrélations entre dose et effet, permettant d'évaluer ou de contraindre les modèles existants. Pour aller au-delà du système de dosimétrie actuel, qui permet de réaliser une dosimétrie globale du milieu de culture, une évaluation à plus petite échelle des traces des particules dans les cibles d'intérêt serait extrêmement pertinente. Elle nécessiterait d'utiliser d'autres techniques de détection, permettant d'identifier et de localiser individuellement les traces de particules α traversant les cibles d'intérêts à une échelle proche de celle de la cellule (soit quelques dizaines de μm). Une telle résolution spatiale pourrait être atteinte à l'aide de détecteurs semi-conducteurs segmentés ou de détecteurs scintillants.

Ainsi, un nouveau système de dosimétrie a été développé au cours de cette thèse, permettant l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité dans le milieu de culture pour évaluer la dose liée aux radionucléides non-intériorisés. Ce système pourrait également être utilisé avec des radiopharmaceutiques à ciblage spécifique des cellules irradiées, en permettant une mesure de la cinétique du ciblage et une évaluation de l'intériorisation. Son automatisation en ferait donc un outil performant et polyvalent pour réaliser une dosimétrie en ligne des essais *in vitro* de la RIV- α . En plus de sa fonction dosimétrique, le système pourrait également contribuer au développement de modèles radiobiologiques en permettant la comparaison des modèles utilisés dans les simulations à des données expérimentales, et une évolution de la technique de détection pour réaliser une quantification bi-dimensionnelle pourrait étendre ce potentiel à l'échelle sub-cellulaire.

Bibliographie

- [1] INSEE. *Causes de Décès Selon Le Sexe, Données Annuelles de 1990 à 2017*. URL : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2385258>.
- [2] Gautier DEFOSSEZ et al. *Estimations Nationales de l'incidence et de La Mortalité Par Cancer En France Métropolitaine Entre 1990 et 2018. Synthèse*. Santé Publique France, juill. 2019.
- [3] Francisco D.C. GUERRA LIBERAL et al. « Targeted Alpha Therapy : Current Clinical Applications ». In : *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 35.6 (1^{er} août 2020), p. 404-417. ISSN : 1084-9785, 1557-8852. DOI : 10.1089/cbr.2020.3576.
- [4] Bryce J. B. NELSON, Jan D. ANDERSSON et Frank WUEST. « Targeted Alpha Therapy : Progress in Radionuclide Production, Radiochemistry, and Applications ». In : *Pharmaceutics* 13.1 (31 déc. 2020), p. 49. ISSN : 1999-4923. DOI : 10.3390/pharmaceutics13010049.
- [5] Stephen Joseph MCMAHON. « The Linear Quadratic Model : Usage, Interpretation and Challenges ». In : *Physics in Medicine & Biology* 64.1 (19 déc. 2018), 01TR01. ISSN : 1361-6560. DOI : 10.1088/1361-6560/aaf26a.
- [6] M. QUINTILIANI. « The Oxygen Effect in Radiation Inactivation of DNA and Enzymes ». In : *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 50.4 (jan. 1986), p. 573-594. ISSN : 0020-7616. DOI : 10.1080/09553008614550981.
- [7] Tatiana WENZL et Jan J WILKENS. « Modelling of the Oxygen Enhancement Ratio for Ion Beam Radiation Therapy ». In : *Physics in Medicine and Biology* 56.11 (7 juin 2011), p. 3251-3268. ISSN : 0031-9155, 1361-6560. DOI : 10.1088/0031-9155/56/11/006.
- [8] Jean-Pierre POUGET et al. « Introduction to Radiobiology of Targeted Radionuclide Therapy ». In : *Frontiers in Medicine* 2 (17 mars 2015). ISSN : 2296-858X. DOI : 10.3389/fmed.2015.00012.
- [9] Jean-Pierre POUGET et Julie CONSTANZO. « Revisiting the Radiobiology of Targeted Alpha Therapy ». In : *Frontiers in Medicine* 8 (27 juill. 2021), p. 692436. ISSN : 2296-858X. DOI : 10.3389/fmed.2021.692436.
- [10] Aurélien CORROYER-DULMONT et al. « VCAM-1 Targeted Alpha-Particle Therapy for Early Brain Metastases ». In : *Neuro-Oncology* 22.3 (5 mars 2020), p. 357-368. ISSN : 1522-8517, 1523-5866. DOI : 10.1093/neuonc/noz169.
- [11] *Panorama Des Cancers En France - Edition 2022*. Institut national du cancer, fév. 2022.
- [12] Richard SULLIVAN et al. « Global Cancer Surgery : Delivering Safe, Affordable, and Timely Cancer Surgery ». In : *The lancet oncology* 16.11 (2015), p. 1193-1224. ISSN : 1470-2045.
- [13] Edward CHU et AC SARTORELLI. « Cancer Chemotherapy ». In : *Lange's Basic and Clinical Pharmacology*, (2018), p. 948-976.

- [14] Philip MAYLES, Alan E. NAHUM et Jean-Claude ROSENWALD, éd. *Handbook of Radiotherapy Physics : Theory and Practice*. Second edition. Boca Raton : CRC Press/Taylor and Francis Group, 2022. ISBN : 978-0-367-19207-5.
- [15] S. HERTZ, A. ROBERTS et R. D. EVANS. « Radioactive Iodine as an Indicator in the Study of Thyroid Physiology. » In : *Experimental Biology and Medicine* 38.4 (1^{er} mai 1938), p. 510-513. ISSN : 1535-3702, 1535-3699. DOI : 10.3181/00379727-38-9915P.
- [16] Frederic H. FAHEY, Frederick D. GRANT et James H. THRALL. « Saul Hertz, MD, and the Birth of Radionuclide Therapy ». In : *EJNMMI Physics* 4.1 (déc. 2017), 15, s40658-017-0182-7. ISSN : 2197-7364. DOI : 10.1186/s40658-017-0182-7.
- [17] Valentina AMBROSINI et al. « Radiopeptide Imaging and Therapy in Europe ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 52 (Supplement 2 déc. 2011), 42S-55S. ISSN : 0161-5505, 2159-662X. DOI : 10.2967/jnumed.110.085753.
- [18] Devrim ERSAHIN, Indukala DODDAMANE et David CHENG. « Targeted Radionuclide Therapy ». In : *Cancers* 3.4 (11 oct. 2011), p. 3838-3855. ISSN : 2072-6694. DOI : 10.3390/cancers3043838.
- [19] Caroline STOKKE, Monika KVASSHEIM et Johan BLAKKISRUD. « Radionuclides for Targeted Therapy : Physical Properties ». In : *Molecules* 27.17 (25 août 2022), p. 5429. ISSN : 1420-3049. DOI : 10.3390/molecules27175429.
- [20] Eric W. PRICE et Chris ORVIG. « Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals ». In : *Chem. Soc. Rev.* 43.1 (2014), p. 260-290. ISSN : 0306-0012, 1460-4744. DOI : 10.1039/C3CS60304K.
- [21] Ute HENNRICH et Klaus KOPKA. « Lutathera® : The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy ». In : *Pharmaceuticals* 12.3 (29 juill. 2019), p. 114. ISSN : 1424-8247. DOI : 10.3390/ph12030114.
- [22] Lara L CHAPPELL et al. « Synthesis, Characterization, and Evaluation of a Novel Bifunctional Chelating Agent for the Lead Isotopes 203Pb and 212Pb ». In : *Nuclear Medicine and Biology* 27.1 (jan. 2000), p. 93-100. ISSN : 09698051. DOI : 10.1016/S0969-8051(99)00086-4.
- [23] D. Scott WILBUR et al. « Reagents for Astatination of Biomolecules. 2. Conjugation of Anionic Boron Cage Pendant Groups to a Protein Provides a Method for Direct Labeling That Is Stable to in Vivo Deastatination ». In : *Bioconjugate Chemistry* 18.4 (1^{er} juill. 2007), p. 1226-1240. ISSN : 1043-1802, 1520-4812. DOI : 10.1021/bc060345s.
- [24] Emmanuel DESHAYES et al. « Radium 223 Dichloride for Prostate Cancer Treatment ». In : *Drug Design, Development and Therapy* Volume 11 (sept. 2017), p. 2643-2651. ISSN : 1177-8881. DOI : 10.2147/DDDT.S122417.
- [25] Hans A BETHE et Julius ASHKIN. *Experimental Nuclear Physics*. Sous la dir. d'Emilio SEGRÈ. T. I, part. II : Passage of Radiations through Matter. London, New York : John Wiley & Sons, 1953.
- [26] R. M. STERNHEIMER, S. M. SELTZER et M. J. BERGER. « Density Effect for the Ionization Loss of Charged Particles in Various Substances ». In : *Physical Review B* 26.11 (1^{er} déc. 1982), p. 6067-6076. ISSN : 0163-1829. DOI : 10.1103/PhysRevB.26.6067.
- [27] Stephen SELTZER. *Stopping-Powers and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions, NIST Standard Reference Database 124*. National Institute of Standards and Technology, 1993. DOI : 10.18434/T4NC7P.

- [28] J. A. NELDER et R. W. M. WEDDERBURN. « Generalized Linear Models ». In : *Breakthroughs in Statistics*. Sous la dir. de Samuel KOTZ et Norman L. JOHNSON. New York, NY : Springer New York, 1992, p. 547-563. ISBN : 978-0-387-94039-7. DOI : 10.1007/978-1-4612-4380-9_39.
- [29] Anthony KU et al. « Auger Electrons for Cancer Therapy – a Review ». In : *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* 4.1 (déc. 2019), p. 27. ISSN : 2365-421X. DOI : 10.1186/s41181-019-0075-2.
- [30] B. Q. LEE et al. « Atomic Radiations in the Decay of Medical Radioisotopes : A Physics Perspective ». In : *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2012 (2012), p. 1-14. ISSN : 1748-670X, 1748-6718. DOI : 10.1155/2012/651475.
- [31] Dmitry FILOSOFOV, Elena KURAKINA et Valery RADCHENKO. « Potent Candidates for Targeted Auger Therapy : Production and Radiochemical Considerations ». In : *Nuclear Medicine and Biology* 94–95 (mars 2021), p. 1-19. ISSN : 09698051. DOI : 10.1016/j.nucmedbio.2020.12.001.
- [32] F GUERARD et al. « Which Radionuclide, Carrier Molecule and Clinical Indication for Alpha-Immunotherapy ? » In : *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 59.2 (2015), p. 161-167. ISSN : 1824-4785.
- [33] Marie-Martine BÉ. *Table of Radionuclides. Vol. 2 : A=151 to 242*. Sous la dir. de Bureau international des poids et MESURES. T. 2. Monographie BIPM 5. Sèvres : BIPM, 2004. 282 p. ISBN : 978-92-822-2207-2.
- [34] Marie-Martine BÉ. *Table of Radionuclides. Vol. 4 : A=133 to 252*. Sous la dir. de Bureau international des poids et MESURES. T. 4. Monographie BIPM 5. Sèvres : BIPM, 2008. 282 p. ISBN : 978-92-822-2230-0.
- [35] Marie-Martine BÉ. *Table of Radionuclides. Vol. 5 : A=22 to 244*. Sous la dir. de Bureau international des poids et MESURES. T. 5. Monographie BIPM 5. Sèvres : BIPM, 2010. 228 p. ISBN : 978-92-822-2234-8.
- [36] Marie-Martine BÉ. *Table of Radionuclides. Vol. 6 : A=22 to 242*. Sous la dir. de Bureau international des poids et MESURES. T. 6. Monographie BIPM 5. Sèvres : BIPM, 2011. 278 p. ISBN : 978-92-822-2242-3.
- [37] Marie-Martine BÉ. *Table of Radionuclides. Vol. 7 : A=14 to 245*. Sous la dir. de Bureau international des poids et MESURES. T. 7. Monographie BIPM 5. Sèvres : BIPM, 2013. 216 p. ISBN : 978-92-822-2248-5.
- [38] Viviana FRANTELLIZZI et al. « Targeted Alpha Therapy with Thorium-227 ». In : *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 35.6 (1^{er} août 2020), p. 437-445. ISSN : 1084-9785, 1557-8852. DOI : 10.1089/cbr.2019.3105.
- [39] Andrew Kyle Henderson ROBERTSON et al. « Development of ²²⁵Ac Radiopharmaceuticals : TRIUMF Perspectives and Experiences ». In : *Current Radiopharmaceuticals* 11.3 (22 oct. 2018), p. 156-172. ISSN : 18744710. DOI : 10.2174/1874471011666180416161908.
- [40] Konstantin V. KOKOV et al. « ²¹²Pb : Production Approaches and Targeted Therapy Applications ». In : *Pharmaceutics* 14.1 (13 jan. 2022), p. 189. ISSN : 1999-4923. DOI : 10.3390/pharmaceutics14010189.
- [41] Per ALBERTSSON et al. « Astatine-211 Based Radionuclide Therapy : Current Clinical Trial Landscape ». In : *Frontiers in Medicine* 9 (6 jan. 2023), p. 1076210. ISSN : 2296-858X. DOI : 10.3389/fmed.2022.1076210.

- [42] Cristina MÜLLER et al. « Alpha-PET with Terbium-149 : Evidence and Perspectives for Radiotheragnostics ». In : *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* 1.1 (jan. 2017), p. 5. ISSN : 2365-421X. DOI : 10.1186/s41181-016-0008-2.
- [43] K. A. HAMACHER et G. SGOUROS. « A Schema for Estimating Absorbed Dose to Organs Following the Administration of Radionuclides with Multiple Unstable Daughters : A Matrix Approach ». In : *Medical Physics* 26.12 (déc. 1999), p. 2526-2528. ISSN : 00942405. DOI : 10.1118/1.598788.
- [44] EMA. *Xofigo*. European Medicines Agency. 17 sept. 2018. URL : <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xofigo> (visité le 16/06/2023).
- [45] Cristina MÜLLER et al. « A Unique Matched Quadruplet of Terbium Radioisotopes for PET and SPECT and for α - and β^- -Radionuclide Therapy : An In Vivo Proof-of-Concept Study with a New Receptor-Targeted Folate Derivative ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 53.12 (déc. 2012), p. 1951-1959. ISSN : 0161-5505, 2159-662X. DOI : 10.2967/jnumed.112.107540.
- [46] Yutian FENG et Michael R. ZALUTSKY. « Production, Purification and Availability of ^{211}At : Near Term Steps towards Global Access ». In : *Nuclear Medicine and Biology* 100-101 (sept. 2021), p. 12-23. ISSN : 09698051. DOI : 10.1016/j.nucmedbio.2021.05.007.
- [47] Brooke L. MCNEIL et al. « Production, Purification, and Radiolabeling of the $^{203}\text{Pb}/^{212}\text{Pb}$ Theranostic Pair ». In : *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* 6.1 (déc. 2021), p. 6. ISSN : 2365-421X. DOI : 10.1186/s41181-021-00121-4.
- [48] Achal Singh ACHROL et al. « Brain Metastases ». In : *Nature Reviews Disease Primers* 5.1 (17 jan. 2019), p. 5. ISSN : 2056-676X. DOI : 10.1038/s41572-018-0055-y.
- [49] Manuel Sarmiento SOTO et al. « Functional Role of Endothelial Adhesion Molecules in the Early Stages of Brain Metastasis ». In : *Neuro-Oncology* 16.4 (avr. 2014), p. 540-551. ISSN : 1523-5866, 1522-8517. DOI : 10.1093/neuonc/not222.
- [50] Aurélien CORROYER-DULMONT et al. « Radioimmunotherapy for Brain Metastases : The Potential for Inflammation as a Target of Choice ». In : *Frontiers in Oncology* 11 (24 août 2021), p. 714514. ISSN : 2234-943X. DOI : 10.3389/fonc.2021.714514.
- [51] Nadia FALZONE et al. « Dosimetric Evaluation of Radionuclides for VCAM-1-targeted Radionuclide Therapy of Early Brain Metastases ». In : *Theranostics* 8.1 (2018), p. 292-303. ISSN : 1838-7640. DOI : 10.7150/thno.22217.
- [52] José Carlos dos SANTOS et al. « Development and Dosimetry of $^{203}\text{Pb}/^{212}\text{Pb}$ -labelled PSMA Ligands : Bringing "the Lead" into PSMA-targeted Alpha Therapy ? ». In : *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 46.5 (mai 2019), p. 1081-1091. ISSN : 1619-7070, 1619-7089. DOI : 10.1007/s00259-018-4220-z.
- [53] Vincent BOUDOUSQ et al. « Comparison between Internalizing Anti-HER2 mAbs and Non-Internalizing Anti-CEA mAbs in Alpha-Radioimmunotherapy of Small Volume Peritoneal Carcinomatosis Using ^{212}Pb ». In : *PLoS ONE* 8.7 (29 juill. 2013). Sous la dir. de Bart O. WILLIAMS, e69613. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0069613.
- [54] Kwon YONG et Martin BRECHBIEL. « Application of ^{212}Pb for Targeted α -Particle Therapy (TAT) : Pre-clinical and Mechanistic Understanding through to Clinical Translation ». In : *AIMS Medical Science* 2.3 (18 août 2015), p. 228-245. ISSN : 2375-1576. DOI : 10.3934/medsci.2015.3.228.
- [55] Marie CURIE. « Sur l'étude Des Courbes de Probabilité Relatives à l'action Des Rayons X Sur Les Bacilles ». In : *Comptes rendus l'Académie des Sci* 188 (1929), p. 202-204.

- [56] Michael C JOINER et al. « Low-Dose Hypersensitivity : Current Status and Possible Mechanisms ». In : *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 49.2 (fév. 2001), p. 379-389. ISSN : 03603016. DOI : 10.1016/S0360-3016(00)01471-1.
- [57] Melvin ASTRAHAN. « Some Implications of Linear-Quadratic-Linear Radiation Dose-Response with Regard to Hypofractionation : LQ-L Implications ». In : *Medical Physics* 35.9 (20 août 2008), p. 4161-4172. ISSN : 00942405. DOI : 10.1118/1.2969065.
- [58] Michael N. CORNFORTH, Susan M. BAILEY et Edwin H. GOODWIN. « Dose Responses for Chromosome Aberrations Produced in Noncycling Primary Human Fibroblasts by Alpha Particles, and by Gamma Rays Delivered at Sublimiting Low Dose Rates ». In : *Radiation Research* 158.1 (juill. 2002), p. 43-53. ISSN : 0033-7587, 1938-5404. DOI : 10.1667/0033-7587(2002)158[0043:DRFCAP]2.0.CO;2.
- [59] Catherine R. MITCHELL, Melvyn FOLKARD et Michael C. JOINER. « Effects of Exposure to Low-Dose-Rate ⁶⁰Co Gamma Rays on Human Tumor Cells *In Vitro* ». In : *Radiation Research* 158.3 (sept. 2002), p. 311-318. ISSN : 0033-7587, 1938-5404. DOI : 10.1667/0033-7587(2002)158[0311:EOETLD]2.0.CO;2.
- [60] G. SGOUROS et al. « MIRDO Continuing Education : Bystander and Low Dose-Rate Effects : Are These Relevant to Radionuclide Therapy ? » In : *Journal of Nuclear Medicine* 48.10 (1^{er} oct. 2007), p. 1683-1691. ISSN : 0161-5505. DOI : 10.2967/jnumed.105.028183.
- [61] John F. FOWLER. « Radiobiological Aspects of Low Dose Rates in Radioimmunotherapy ». In : *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 18.5 (mai 1990), p. 1261-1269. ISSN : 03603016. DOI : 10.1016/0360-3016(90)90467-X.
- [62] Andrzej NIEMIERKO. « Reporting and Analyzing Dose Distributions : A Concept of Equivalent Uniform Dose ». In : *Medical Physics* 24.1 (jan. 1997), p. 103-110. ISSN : 00942405. DOI : 10.1118/1.598063.
- [63] Frank A. BARILE. *Introduction to in Vitro Cytotoxicology : Mechanisms and Methods*. Reissued 2019. Boca Raton, FL : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2020. ISBN : 978-0-367-22540-7.
- [64] Caleb JENSEN et Yong TENG. « Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture ? » In : *Frontiers in Molecular Biosciences* 7 (6 mars 2020), p. 33. ISSN : 2296-889X. DOI : 10.3389/fmolb.2020.00033.
- [65] Sritama NATH et Gayathri R. DEVI. « Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research : Focus on Tumor Spheroid Model ». In : *Pharmacology & Therapeutics* 163 (juill. 2016), p. 94-108. ISSN : 01637258. DOI : 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
- [66] Nadia FALZONE et al. « Targeting Micrometastases : The Effect of Heterogeneous Radionuclide Distribution on Tumor Control Probability ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 60.2 (fév. 2019), p. 250-258. ISSN : 0161-5505, 2159-662X. DOI : 10.2967/jnumed.117.207308.
- [67] Ines M. COSTA et al. « Methods and Techniques for in Vitro Subcellular Localization of Radiopharmaceuticals and Radionuclides ». In : *Nuclear Medicine and Biology* 98-99 (juill. 2021), p. 18-29. ISSN : 09698051. DOI : 10.1016/j.nucmedbio.2021.03.010.
- [68] Andreas PAULUS et al. « Development of a Clickable Bimodal Fluorescent/PET Probe for in Vivo Imaging ». In : *EJNMMI Research* 5.1 (déc. 2015), p. 43. ISSN : 2191-219X. DOI : 10.1186/s13550-015-0120-4.
- [69] Bas M. BAVELAAR et al. « Subcellular Targeting of Theranostic Radionuclides ». In : *Frontiers in Pharmacology* 9 (4 sept. 2018), p. 996. ISSN : 1663-9812. DOI : 10.3389/fphar.2018.00996.

- [70] Jamie NUÑEZ et al. « NanoSIMS for Biological Applications : Current Practices and Analyses ». In : *Biointerphases* 13.3 (juin 2018), 03B301. ISSN : 1934-8630, 1559-4106. DOI : 10.1116/1.4993628.
- [71] Hideyuki SAKURAI et al. « Direct Visualization and Quantification of the Anticancer Agent, Cis-Diamminedichloro-Platinum(II), in Human Lung Cancer Cells Using in-Air Microparticle-Induced X-ray Emission Analysis ». In : *Cancer Science* 99.5 (mai 2008), p. 901-904. ISSN : 1347-9032, 1349-7006. DOI : 10.1111/j.1349-7006.2008.00755.x.
- [72] Mattias SANDSTRÖM et al. « Kidney Dosimetry in 777 Patients during 177Lu-DOTATATE Therapy : Aspects on Extrapolations and Measurement Time Points ». In : *EJNMMI Physics* 7.1 (déc. 2020), p. 73. ISSN : 2197-7364. DOI : 10.1186/s40658-020-00339-2.
- [73] Rachele DANIELI et al. « Personalized Dosimetry in Targeted Radiation Therapy : A Look to Methods, Tools and Critical Aspects ». In : *Journal of Personalized Medicine* 12.2 (2 fév. 2022), p. 205. ISSN : 2075-4426. DOI : 10.3390/jpm12020205.
- [74] Wesley E. BOLCH et al. « MIRD Pamphlet No. 21 : A Generalized Schema for Radiopharmaceutical Dosimetry—Standardization of Nomenclature ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 50.3 (mars 2009), p. 477-484. ISSN : 0161-5505, 2159-662X. DOI : 10.2967/jnumed.108.056036.
- [75] Domenico FINOCCHIARO et al. « Uncertainty Analysis of Tumour Absorbed Dose Calculations in Molecular Radiotherapy ». In : *EJNMMI Physics* 7.1 (déc. 2020), p. 63. ISSN : 2197-7364. DOI : 10.1186/s40658-020-00328-5.
- [76] Giulia TAMBORINO et al. « Cellular Dosimetry of [177Lu]Lu-DOTA-[Tyr3]Octreotate Radionuclide Therapy : The Impact of Modeling Assumptions on the Correlation with in Vitro Cytotoxicity ». In : *EJNMMI Physics* 7.1 (déc. 2020), p. 8. ISSN : 2197-7364. DOI : 10.1186/s40658-020-0276-5.
- [77] Ramak SALIM et Payvand TAHERPARVAR. « Cellular S Values in Spindle-Shaped Cells : A Dosimetry Study on More Realistic Cell Geometries Using Geant4-DNA Monte Carlo Simulation Toolkit ». In : *Annals of Nuclear Medicine* 34.10 (oct. 2020), p. 742-756. ISSN : 0914-7187, 1864-6433. DOI : 10.1007/s12149-020-01498-z.
- [78] Anne-Marie FRELIN-LABALME et al. « Radionuclide Spatial Distribution and Dose Deposition for *in Vitro* Assessments of ^{212}Pb - α VCAM-1 Targeted Alpha Therapy ». In : *Medical Physics* 47.3 (mars 2020), p. 1317-1326. ISSN : 0094-2405, 2473-4209. DOI : 10.1002/mp.13969.
- [79] Harold H. ROSSI. « MICROSCOPIC ENERGY DISTRIBUTION IN IRRADIATED MATTER ». In : *Fundamentals*. Elsevier, 1968, p. 43-92. ISBN : 978-0-12-066401-6. DOI : 10.1016/B978-0-12-066401-6.50009-9.
- [80] Harald H. ROSSI et Marco ZAIDER. « Elements of Microdosimetry : Review Article : Elements of Microdosimetry ». In : *Medical Physics* 18.6 (nov. 1991), p. 1085-1092. ISSN : 00942405. DOI : 10.1118/1.596616.
- [81] D MAZZUCCONI et al. « MICRODOSIMETRY AT NANOMETRIC SCALE WITH AN AVALANCHE-CONFINEMENT TEPC : RESPONSE AGAINST A HELIUM ION BEAM ». In : *Radiation Protection Dosimetry* 183.1-2 (1^{er} mai 2019), p. 177-181. ISSN : 0144-8420, 1742-3406. DOI : 10.1093/rpd/ncy230.
- [82] D. MAZZUCCONI et al. « Nano-Microdosimetric Investigation at the Therapeutic Proton Irradiation Line of CATANA ». In : *Radiation Measurements* 123 (avr. 2019), p. 26-33. ISSN : 13504487. DOI : 10.1016/j.radmeas.2019.02.012.

- [83] Werner HOFMANN et al. « Internal Microdosimetry of Alpha-Emitting Radionuclides ». In : *Radiation and Environmental Biophysics* 59.1 (mars 2020), p. 29-62. ISSN : 0301-634X, 1432-2099. DOI : 10.1007/s00411-019-00826-w.
- [84] John C. ROESKE et al. « Small-Scale Dosimetry : Challenges and Future Directions ». In : *Seminars in Nuclear Medicine* 38.5 (sept. 2008), p. 367-383. ISSN : 00012998. DOI : 10.1053/j.semnuclmed.2008.05.003.
- [85] Chen-Yu HUANG et al. « Microdosimetry for Targeted Alpha Therapy of Cancer ». In : *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2012 (2012), p. 1-6. ISSN : 1748-670X, 1748-6718. DOI : 10.1155/2012/153212.
- [86] N. CHOQUIN et al. « Evidence of Extranuclear Cell Sensitivity to Alpha-Particle Radiation Using a Microdosimetric Model. I. Presentation and Validation of a Microdosimetric Model ». In : *Radiation Research* 171.6 (juin 2009), p. 657-663. ISSN : 0033-7587, 1938-5404. DOI : 10.1667/RR1371.1.
- [87] N. CHOQUIN et al. « Evidence of Extranuclear Cell Sensitivity to Alpha-Particle Radiation Using a Microdosimetric Model. II. Application of the Microdosimetric Model to Experimental Results ». In : *Radiation Research* 171.6 (juin 2009), p. 664-673. ISSN : 0033-7587, 1938-5404. DOI : 10.1667/RR1536.1.
- [88] John C ROESKE et Thomas G STINHCAMB. « Dosimetric Framework for Therapeutic Alpha-Particle Emitters ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 38.12 (1997), p. 1923-1929. ISSN : 0161-5505.
- [89] Brian W. MILLER. « Radiation Imagers for Quantitative, Single-particle Digital Autoradiography of Alpha- and Beta-particle Emitters ». In : *Seminars in Nuclear Medicine* 48.4 (juill. 2018), p. 367-376. ISSN : 00012998. DOI : 10.1053/j.semnuclmed.2018.02.008.
- [90] Azam NIROOMAND-RAD et al. « Radiochromic Film Dosimetry : Recommendations of AAPM Radiation Therapy Committee Task Group 55 ». In : *Medical Physics* 25.11 (nov. 1998), p. 2093-2115. ISSN : 00942405. DOI : 10.1118/1.598407.
- [91] Azam NIROOMAND-RAD et al. « Report of AAPM Task Group 235 Radiochromic Film Dosimetry : An Update to TG-55 ». In : *Medical Physics* 47.12 (déc. 2020), p. 5986-6025. ISSN : 0094-2405, 2473-4209. DOI : 10.1002/mp.14497.
- [92] J.R. ERSKINE. « Nuclear Track Emulsions ». In : *Nuclear Instruments and Methods* 162.1-3 (juin 1979), p. 371-378. ISSN : 0029554X. DOI : 10.1016/0029-554X(79)90722-5.
- [93] Linas KUDREVICIUS et al. « Application of 3D Gel Dosimetry as a Quality Assurance Tool in Functional Leksell Gamma Knife Radiosurgery ». In : *Gels* 8.2 (20 jan. 2022), p. 69. ISSN : 2310-2861. DOI : 10.3390/gels8020069.
- [94] Tania SANTOS, Tiago VENTURA et Maria do Carmo LOPES. « A Review on Radiochromic Film Dosimetry for Dose Verification in High Energy Photon Beams ». In : *Radiation Physics and Chemistry* 179 (fév. 2021), p. 109217. ISSN : 0969806X. DOI : 10.1016/j.radphyschem.2020.109217.
- [95] Bhaskar MUKHERJEE et al. « A Unique Alpha Dosimetry Technique Using Gafchromic EBT3[®] Film and Feasibility Study for an Activity Calibrator for Alpha-Emitting Radiopharmaceuticals ». In : *The British Journal of Radiology* 88.1056 (déc. 2015), p. 20150035. ISSN : 0007-1285, 1748-880X. DOI : 10.1259/bjr.20150035.
- [96] Hala I. EL-NAGGAR et al. « On the Registration of Low Energy Alpha Particle with Modified GafChromic EBT2 Radiochromic Film ». In : *Radiation Physics and Chemistry* 191 (fév. 2022), p. 109852. ISSN : 0969806X. DOI : 10.1016/j.radphyschem.2021.109852.

- [97] Christopher A.G. KALNINS et al. « Alpha Particle Autoradiography for High Spatial Resolution Mapping of Radionuclides ». In : *Journal of Environmental Radioactivity* 197 (fév. 2019), p. 9-15. ISSN : 0265931X. DOI : 10.1016/j.jenvrad.2018.11.008.
- [98] Eline A. M. RUIGROK et al. « Extensive Preclinical Evaluation of Lutetium-177-Labeled PSMA-specific Tracers for Prostate Cancer Radionuclide Therapy ». In : *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 48.5 (mai 2021), p. 1339-1350. ISSN : 1619-7070, 1619-7089. DOI : 10.1007/s00259-020-05057-6.
- [99] Alexandra RINK et al. « Temperature and Hydration Effects on Absorbance Spectra and Radiation Sensitivity of a Radiochromic Medium ». In : *Medical Physics* 35.10 (oct. 2008), p. 4545-4555. ISSN : 0094-2405, 2473-4209. DOI : 10.1118/1.2975483.
- [100] Yu.M. GAVRILYUK et al. « High-Resolution Ion Pulse Ionization Chamber with Air Filling for the ^{222}Rn Decays Detection ». In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 801 (nov. 2015), p. 27-33. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/j.nima.2015.08.034.
- [101] Sophie BILLON et al. « Quantitative Imaging of ^{226}Ra Ultratrace Distribution Using Digital Autoradiography : Case of Doped Celestines ». In : *Journal of Environmental Radioactivity* 217 (juin 2020), p. 106211. ISSN : 0265931X. DOI : 10.1016/j.jenvrad.2020.106211.
- [102] F. JAMBON et al. « Medica-Plus : A Micromegas-based Proof-of-Concept Detector for Sub-Becquerel Tritium Activity Assessment at the Service of Oncological Research ». In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 1027 (mars 2022), p. 166332. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/j.nima.2022.166332.
- [103] *BeaQuant – AI4R*. URL : <https://www.ai4r.com/real-time-autoradiography/beaquant/>.
- [104] Leonard LEVY et Donald W. WEST. « The Luminescent Properties of Zinc Sulphide in Relation to X Rays ». In : *The British Journal of Radiology* 8.87 (mars 1935), p. 184-195. ISSN : 0007-1285, 1748-880X. DOI : 10.1259/0007-1285-8-87-184.
- [105] Robert K. SWANK et Warren L. BUCK. « The Scintillation Process in Plastic Solid Solutions ». In : *Physical Review* 91.4 (15 août 1953), p. 927-933. ISSN : 0031-899X. DOI : 10.1103/PhysRev.91.927.
- [106] Robert HOFSTADTER. « Alkali Halide Scintillation Counters ». In : *Physical Review* 74.1 (1^{er} juill. 1948), p. 100-101. ISSN : 0031-899X. DOI : 10.1103/PhysRev.74.100.
- [107] Fiammetta PAGANO et al. « Advances in Heterostructured Scintillators : Toward a New Generation of Detectors for TOF-PET ». In : *Physics in Medicine & Biology* 67.13 (7 juill. 2022), p. 135010. ISSN : 0031-9155, 1361-6560. DOI : 10.1088/1361-6560/ac72ee.
- [108] J. B. BIRKS. *The Theory and Practice of Scintillation Counting*. Oxford [England] : Pergamon Press, 1967. ISBN : 978-1-4831-5606-4.
- [109] Takayuki YANAGIDA. « Inorganic Scintillating Materials and Scintillation Detectors ». In : *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 94.2 (2018), p. 75-97. ISSN : 0386-2208, 1349-2896. DOI : 10.2183/pjab.94.007.
- [110] Tom BÄCK et Lars JACOBSSON. « The α -Camera : A Quantitative Digital Autoradiography Technique Using a Charge-Coupled Device for Ex Vivo High-Resolution Bioimaging of α -Particles ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 51.10 (oct. 2010), p. 1616-1623. ISSN : 0161-5505, 2159-662X. DOI : 10.2967/jnumed.110.077578.

- [111] E. STEINBAUER et al. « Energy Resolution of Silicon Detectors : Approaching the Physical Limit ». In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms* 85.1-4 (mars 1994), p. 642-649. ISSN : 0168583X. DOI : 10.1016/0168-583X(94)95898-X.
- [112] CERN. *Medipix*. URL : <https://medipix.web.cern.ch/home>.
- [113] Ruqaya AL DARWISH et al. « Autoradiography Imaging in Targeted Alpha Therapy with Timepix Detector ». In : *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2015 (2015), p. 1-7. ISSN : 1748-670X, 1748-6718. DOI : 10.1155/2015/612580.
- [114] R. AL DARWISH et al. « Development of a Transmission Alpha Particle Dosimetry Technique Using A549 Cells and a Ra-223 Source for Targeted Alpha Therapy : Development of a Transmission Alpha Particle Dosimetry Technique ». In : *Medical Physics* 43.11 (27 oct. 2016), p. 6145-6153. ISSN : 00942405. DOI : 10.1118/1.4965805.
- [115] Yuki MORISHITA et al. « Performance Comparison of Scintillators for Alpha Particle Detectors ». In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 764 (nov. 2014), p. 383-386. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/j.nima.2014.07.046.
- [116] MIRION TECHNOLOGIES. *Passivated Implanted Planar Silicon (PIPS) Detectors*. 2017.
- [117] MIRION TECHNOLOGIES. *Considerations for Choosing an Alpha Spectroscopy PIPS Detector*. 2018.
- [118] G. BERTOLINI et A. COCHE. *Semiconductor Detectors*. North-Holland Publishing Company. 1968.
- [119] Frederick A. HANSER et Bach SELLERS. « Radiation Damage Effects in a Surface Barrier Detector after Irradiation by 4.5 MeV α Particles ». In : *Review of Scientific Instruments* 41.5 (mai 1970), p. 780-781. ISSN : 0034-6748, 1089-7623. DOI : 10.1063/1.1684647.
- [120] Glenn F KNOLL. *Radiation Detection and Measurement*. John Wiley & Sons, 2010. ISBN : 0-470-13148-9.
- [121] *FASTER*. URL : <http://faster.in2p3.fr/>.
- [122] Cathy FONTBONNE. « Acquisition Multiparamétrique de Signaux de Décroissance Radioactive Pour La Correction Des Défauts Instrumentaux : Application à La Mesure de La Durée de Vie Du ^{19}Ne ». Normandie Université, 2017.
- [123] P. W. NICHOLSON. *Nuclear Electronics*. London, New York : Wiley, 1974. 388 p. ISBN : 978-0-471-63697-7.
- [124] Cathy FONTBONNE. *FASTER Trapezoidal-Spectro MnM USER MANUAL*. 2019.
- [125] EPPENDORF. *Technical Data Sheet Eppendorf Cell Culture Plate, 24-Well*.
- [126] BIOSWISSTEC. *Tissue Culture Plates Technical Datasheet*.
- [127] *Microplates For High Content Analysis and High Content Screening Assays / Application Support Knowledgebase / Lab Products & Services*. PerkinElmer. URL : <https://www.perkinelmer.com/fr/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/microplates/high-content-screening-plates.html>.
- [128] Toshiyuki YONEDA et al. « A Bone-Seeking Clone Exhibits Different Biological Properties from the MDA-MB-231 Parental Human Breast Cancer Cells and a Brain-Seeking Clone In Vivo and In Vitro ». In : *Journal of Bone and Mineral Research* 16.8 (1^{er} août 2001), p. 1486-1495. ISSN : 08840431. DOI : 10.1359/jbmr.2001.16.8.1486.

- [129] Aurélien CORROYER-DULMONT et al. « Multimodal Evaluation of Hypoxia in Brain Metastases of Lung Cancer and Interest of Hypoxia Image-Guided Radiotherapy ». In : *Scientific Reports* 11.1 (27 mai 2021), p. 11239. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-021-90662-0.
- [130] S. AGOSTINELLI et al. « Geant4—a Simulation Toolkit ». In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 506.3 (juill. 2003), p. 250-303. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/S0168-9002(03)01368-8.
- [131] Hyeonmin LEE et al. « Dead Layer Estimation of an HPGe Detector Using MCNP6 and Geant4 ». In : *Applied Radiation and Isotopes* 192 (fév. 2023), p. 110597. ISSN : 09698043. DOI : 10.1016/j.apradiso.2022.110597.
- [132] Wei-Kun CHEN et al. « Optimization Study and Design of Scintillating Fiber Detector for D-T Neutron Measurements on EAST with Geant4 ». In : *Nuclear Science and Techniques* 33.11 (nov. 2022), p. 139. ISSN : 1001-8042, 2210-3147. DOI : 10.1007/s41365-022-01123-w.
- [133] A. NAYAK et al. « Investigation of Thermal Neutron Detection Efficiency of Boron Carbide Converter Material Using GEANT4 Simulation for Different Types of Detector Configurations ». In : *Journal of Instrumentation* 17.07 (1^{er} juill. 2022), P07012. ISSN : 1748-0221. DOI : 10.1088/1748-0221/17/07/P07012.
- [134] Aqsa SHAIKH et al. « GEANT4 Based Simulation Study of Converter and Direct Target Design and Optimization of Target for 99Mo Production Using 30 MeV Electron Linear Accelerator ». In : *Applied Radiation and Isotopes* 185 (juill. 2022), p. 110239. ISSN : 09698043. DOI : 10.1016/j.apradiso.2022.110239.
- [135] Ahtesham Ullah KHAN et al. « Development and Evaluation of a GEANT4-based Monte Carlo Model of a 0.35 T MR-guided Radiation Therapy (MRgRT) Linear Accelerator ». In : *Medical Physics* 48.4 (avr. 2021), p. 1967-1982. ISSN : 0094-2405, 2473-4209. DOI : 10.1002/mp.14761.
- [136] Praneeth KANDLAKUNTA et al. « Characterizing a Geant4 Monte Carlo Model of a Multileaf Collimator for a TrueBeam™ Linear Accelerator ». In : *Physica Medica* 59 (mars 2019), p. 1-12. ISSN : 11201797. DOI : 10.1016/j.ejmp.2019.02.008.
- [137] Nicolas ARBOR et al. « A GATE/Geant4 Monte Carlo Toolkit for Surface Dose Calculation in VMAT Breast Cancer Radiotherapy ». In : *Physica Medica* 61 (mai 2019), p. 112-117. ISSN : 11201797. DOI : 10.1016/j.ejmp.2019.04.012.
- [138] Sally MCKINNON et al. « Local Dose Enhancement of Proton Therapy by Ceramic Oxide Nanoparticles Investigated with Geant4 Simulations ». In : *Physica Medica* 32.12 (déc. 2016), p. 1584-1593. ISSN : 11201797. DOI : 10.1016/j.ejmp.2016.11.112.
- [139] Julien BORDES et al. « Monte Carlo Dosimetry of a Realistic Multicellular Model of Follicular Lymphoma in a Context of Radioimmunotherapy ». In : *Medical Physics* 47.10 (oct. 2020), p. 5222-5234. ISSN : 0094-2405, 2473-4209. DOI : 10.1002/mp.14370.
- [140] DOMINIK CZERNIA et BOGNA SZYK. *Air Density Calculator*.
- [141] Helmut VOGEL. « A Better Way to Construct the Sunflower Head ». In : *Mathematical Biosciences* 44.3-4 (juin 1979), p. 179-189. ISSN : 00255564. DOI : 10.1016/0025-5564(79)90080-4.
- [142] J. ALLISON et al. « Recent Developments in Geant4 ». In : *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 835 (nov. 2016), p. 186-225. ISSN : 01689002. DOI : 10.1016/j.nima.2016.06.125.

- [143] *Physics Reference Manual — Physics Reference Manual 10.6 Documentation*. URL : <https://geant4-userdoc.web.cern.ch/UsersGuides/PhysicsReferenceManual/BackupVersions/V10.6/html/index.html>.
- [144] Charles L. LAWSON et Richard J. HANSON. *Solving Least Squares Problems*. Society for Industrial and Applied Mathematics, jan. 1995. ISBN : 978-0-89871-356-5. DOI : 10.1137/1.9781611971217.
- [145] Donghui CHEN et Robert J. PLEMMONS. « Nonnegativity Constraints in Numerical Analysis ». In : Adhemar BULTHEEL et Ronald COOLS. *The Birth of Numerical Analysis*. WORLD SCIENTIFIC, nov. 2009, p. 109-139. ISBN : 978-981-283-625-0. DOI : 10.1142/9789812836267_0008.
- [146] Rasmus BRO et Sijmen DE JONG. « A Fast Non-Negativity-Constrained Least Squares Algorithm ». In : *Journal of Chemometrics* 11.5 (sept. 1997), p. 393-401. ISSN : 0886-9383, 1099-128X. DOI : 10.1002/(SICI)1099-128X(199709/10)11:5<393::AID-CEM483>3.0.CO;2-L.
- [147] Nicholas J. HIGHAM. *Accuracy and Stability of Numerical Algorithms*. Second. Society for Industrial and Applied Mathematics, jan. 2002. ISBN : 978-0-89871-521-7. DOI : 10.1137/1.9780898718027.
- [148] Alan J. IZENMAN. *Modern Multivariate Statistical Techniques*. Réd. par G. CASELLA, S. FIENBERG et I. OLKIN. Springer Texts in Statistics. New York, NY : Springer New York, 2008. ISBN : 978-0-387-78189-1. DOI : 10.1007/978-0-387-78189-1.
- [149] Ronald A. FISHER. « On the Mathematical Foundations of Theoretical Statistics ». In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character* 222.594-604 (jan. 1922), p. 309-368. ISSN : 0264-3952, 2053-9258. DOI : 10.1098/rsta.1922.0009.
- [150] Frederick JAMES. *Statistical Methods in Experimental Physics*. 2^e éd. WORLD SCIENTIFIC, nov. 2006. ISBN : 978-981-256-795-6. DOI : 10.1142/6096.
- [151] Aris PERPEROGLOU. « Fitting Survival Data with Penalized Poisson Regression ». In : *Statistical Methods & Applications* 20.4 (nov. 2011), p. 451-462. ISSN : 1618-2510, 1613-981X. DOI : 10.1007/s10260-011-0172-1.
- [152] Paul H. C. EILERS et Brian D. MARX. « Flexible Smoothing with B-splines and Penalties ». In : *Statistical Science* 11.2 (1^{er} mai 1996). ISSN : 0883-4237. DOI : 10.1214/ss/1038425655.
- [153] Alexis DOUDARD et al. « Application of a New Spectral Deconvolution Method for in Vitro Dosimetry in Assessment of Targeted Alpha Therapy ». In : *Medical Physics* (3 fév. 2023), mp.16279. ISSN : 0094-2405, 2473-4209. DOI : 10.1002/mp.16279.
- [154] Martin SLAWSKI et Matthias HEIN. « Non-Negative Least Squares for High-Dimensional Linear Models : Consistency and Sparse Recovery without Regularization ». In : *Electronic Journal of Statistics* 7 (1^{er} jan. 2013). ISSN : 1935-7524. DOI : 10.1214/13-EJS868.
- [155] Philip R. BEVINGTON et D. Keith ROBINSON. *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*. 3rd ed. Boston : McGraw-Hill, 2003. 320 p. ISBN : 978-0-07-247227-1.
- [156] G.M ANDERSON. « Error Propagation by the Monte Carlo Method in Geochemical Calculations ». In : *Geochimica et Cosmochimica Acta* 40.12 (déc. 1976), p. 1533-1538. ISSN : 00167037. DOI : 10.1016/0016-7037(76)90092-2.
- [157] BIPM et al. *Evaluation of measurement data — Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” — Propagation of distributions using a Monte Carlo method*. Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 101 :2008.

- [158] BIPM et al. *Evaluation of measurement data — Supplement 2 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” — Extension to any number of output quantities*. Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 102 :2011.
- [159] BIPM et al. *Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement*. Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 100 :2008.
- [160] International Commission on RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS, éd. *Microdosimetry*. ICRU Report 36. Bethesda, Md., U.S.A : International Commission on Radiation Units and Measurements, 1983. 118 p. ISBN : 978-0-913394-30-4.
- [161] George SGOUROS et al. « MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged) : Radiobiology and Dosimetry of α -Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 51.2 (fév. 2010), p. 311-328. ISSN : 0161-5505, 2159-662X. DOI : 10.2967/jnumed.108.058651.
- [162] L. MAIGNE et al. « CPOP : An Open Source C++ Cell POPulation Modeler for Radiation Biology Applications ». In : *Physica Medica* 89 (sept. 2021), p. 41-50. ISSN : 11201797. DOI : 10.1016/j.ejmp.2021.07.016.
- [163] H. AKAIKE. « A New Look at the Statistical Model Identification ». In : *IEEE Transactions on Automatic Control* 19.6 (déc. 1974), p. 716-723. ISSN : 0018-9286. DOI : 10.1109/TAC.1974.1100705.
- [164] Gideon SCHWARZ. « Estimating the Dimension of a Model ». In : *The Annals of Statistics* 6.2 (1^{er} mars 1978). ISSN : 0090-5364. DOI : 10.1214/aos/1176344136.
- [165] S. INCERTI et al. « Geant4-DNA Example Applications for Track Structure Simulations in Liquid Water : A Report from the Geant4-DNA Project ». In : *Medical Physics* 45.8 (août 2018). ISSN : 0094-2405, 2473-4209. DOI : 10.1002/mp.13048.
- [166] Harry EAGLE. « Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures ». In : *Science* 130.3373 (21 août 1959), p. 432-437. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.130.3373.432.
- [167] R. DULBECCO et G. FREEMAN. « Plaque Production by the Polyoma Virus ». In : *Virology* 8.3 (juill. 1959), p. 396-397. ISSN : 00426822. DOI : 10.1016/0042-6822(59)90043-1.
- [168] SIGMA-ALDRICH CORP. *Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DME) - Formulation*. Oct. 2016.
- [169] Paul M HINDERLITER et al. « ISDD : A Computational Model of Particle Sedimentation, Diffusion and Target Cell Dosimetry for in Vitro Toxicity Studies ». In : *Particle and Fibre Toxicology* 7.1 (déc. 2010), p. 36. ISSN : 1743-8977. DOI : 10.1186/1743-8977-7-36.
- [170] Christine POON. « Measuring the Density and Viscosity of Culture Media for Optimized Computational Fluid Dynamics Analysis of in Vitro Devices ». In : *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 126 (fév. 2022), p. 105024. ISSN : 17516161. DOI : 10.1016/j.jmbbm.2021.105024.
- [171] Tanja WONEROW et al. « Rheologic Behavior of Bovine Calf Serum ». In : *Materials* 14.10 (13 mai 2021), p. 2538. ISSN : 1996-1944. DOI : 10.3390/ma14102538.
- [172] I. V. BRANZOI et al. « Influence of Diamond-like Carbon Coating on the Corrosion Resistance of the NITINOL Shape Memory Alloy ». In : *Surface and Interface Analysis* 42.6-7 (30 avr. 2010), p. 502-509. ISSN : 01422421, 10969918. DOI : 10.1002/sia.3473.
- [173] Homa TORABIZADEH. « All Proteins Have A Basic Molecular Formula ». In : *World Academy of Science, Engineering and Technology* 78 (22 juin 2011), p. 961-965. DOI : 10.5281/ZENODO.1074495.

-
- [174] Ysabella Kassandra ONG. *Detector Geometry Studies for Beta Detection in Targeted Alpha Therapy*. Rapport de stage. GANIL : Université de Caen-Normandie, jan. 2023.

Annexes

A | *Détecteurs à semi-conducteurs à implantation ionique*

Plusieurs techniques de conceptions existent pour la création de détecteurs à semi-conducteurs. Les détecteurs à implantation ioniques présentent un avantage clair pour la détection des particules α , du fait de leur faible épaisseur d'entrée. Le principe de détection associé à cette conception est présenté dans cette annexe.

A.1 Dopage

En pratique, la forte résistivité des matériaux semi-conducteurs ne permet pas de récolter les charges générées par création de paires électrons-trous efficacement, et la plupart des paires électrons-trous générées finissent par se recombiner. Un procédé, le dopage, permet de créer artificiellement dans le cristal une sur-abondance de sites accepteurs d'électrons (dopage de type p) ou de sites donneurs d'électrons (dopage de type n) en remplaçant certains des atomes de la structure cristalline par des atomes réalisant un nombre de liaisons covalentes différent de celui du cristal de base. Ces sites accepteurs ou donneurs ne sont pas strictement des électrons ou des trous, mais correspondent plutôt à des sites caractérisés par un niveau d'énergie très proche de la bande de valence dans le cas des sites accepteurs ou de la bande de conduction dans le cas des sites donneurs, comme représenté en **Figure A.1**. La distance séparant chacun des niveaux d'énergies créés par ces impuretés de la bande voisine étant largement inférieure à la largeur de la bande interdite, ces impuretés agissent comme des sources artificielles d'électrons ou de trous.

Dans le cas du silicium, qui possède 4 électrons de valence, un dopage de type p peut se réaliser par implémentation d'atomes de bore, trivalent, dans la structure cristalline, alors qu'un dopage de type n correspond à l'insertion d'atomes pentavalents comme le phosphore. Ces deux exemples sont représentés respectivement en **Figure A.1a** et **A.1b**. Par ailleurs, les détecteurs semi-conducteurs à base de silicium sont généralement conçus à partir de volumes de matériau légèrement dopés n du fait de la présence d'impuretés résiduelles dans leur structure cristalline.

A.2 Spécificités des détecteurs à implantation ionique

Les détecteurs à semi-conducteurs peuvent se décliner sous plusieurs formes, caractérisées par des méthodes de conception, des dimensions et des résolutions atteignables différentes. Les détecteurs utilisés dans le montage spectroscopique proposé sont des détecteurs à base de silicium à implantation ionique. Ce type de détecteur est caractérisé par un dopage intense en surface, que nous considérerons ici de type p pour correspondre aux détecteurs utilisés et introduits au **Chapitre 2, Section 2.2.1**. Leur principe de fonctionnement est ici décrit, et est illustré par les différents schémas de la **Figure A.2**.

Le bloc de silicium, initialement légèrement de type n du fait de la présence d'impuretés, subit à sa surface un très fort dopage p sur une très légère profondeur, de quelques dizaines de nm. Ce dopage intense, désigné comme de type p^+ , est réalisé par irradiation du bloc de

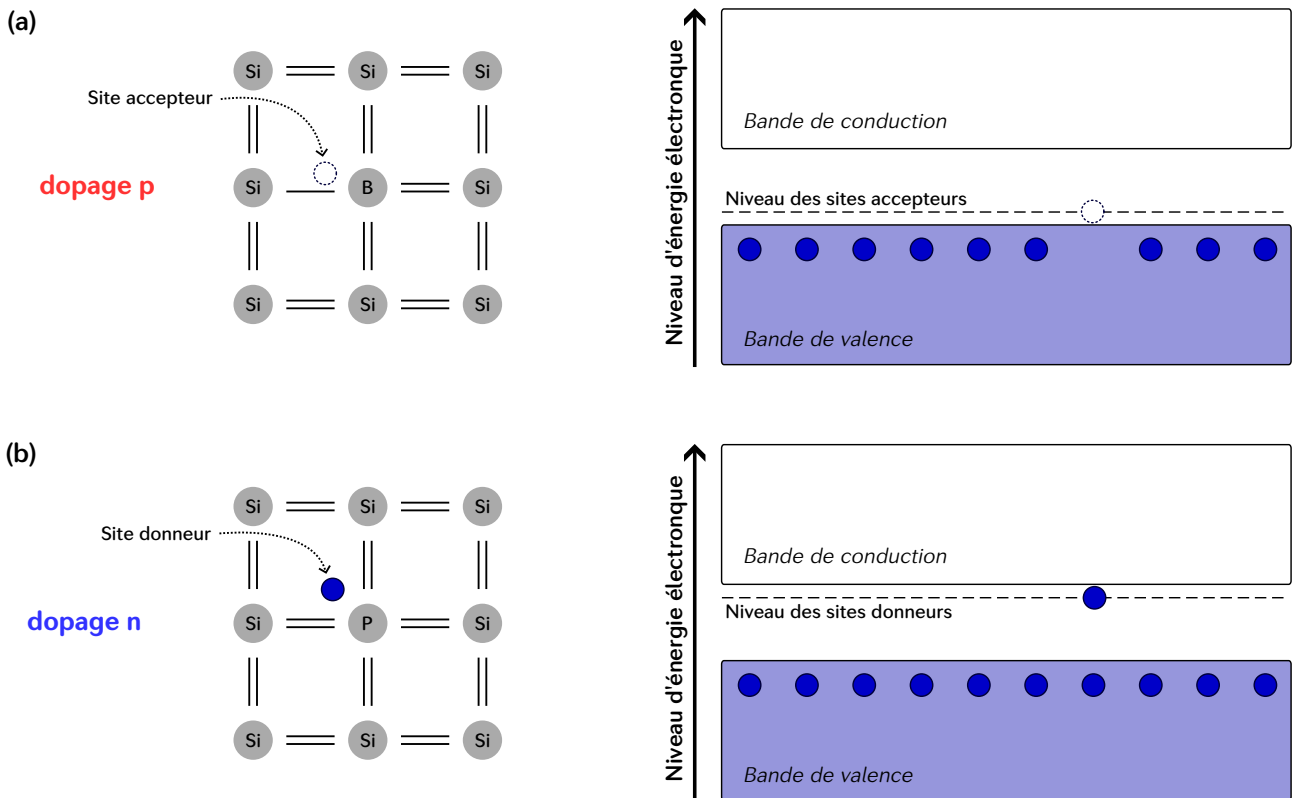


Figure A.1 – Schéma de principe du dopage de type p (a) ou de type n (b). Les schémas énergétiques correspondant à l'ajout des impuretés sont représentés sur les diagrammes d'énergie pour chacun des types de dopage. Figures reprises de [120].

silicium, qui permet à la fois d'insérer une très forte densité d'atomes donneurs mais aussi de contrôler avec précision l'épaisseur de la zone dopée. Le dopage est ici suffisamment intense pour que les nombreux sites accepteurs intégrés à la structure cristalline fournissent à la zone concernée une conductivité proche de celle des métaux.

Le bloc détecteur est ainsi constitué de deux sous-volumes, la surface dopée p^+ et le volume principal légèrement dopé n (**Figure A.2a**). Les sites accepteurs de la zone de type p^+ et les sites donneurs de la zone n à proximité de la jonction entre les deux sous-volumes, appelée *jonction $p-n$* , se recombinent et forment ainsi une nouvelle zone, appelée zone de déplétion, dans laquelle aucune charge libre n'est disponible (**Figure A.2b**). Du fait de la forte différence entre les concentrations en impureté entre les deux types de matériau, la zone de déplétion s'étend très majoritairement dans la zone de type n . Les impuretés atomiques initialement sources de trous et d'électrons deviennent donc électriquement chargées (négativement dans la zone de type p^+ et positivement dans la zone de type n), et induisent un champ électrique dans la zone de déplétion dont les lignes de champ vont du milieu n vers le milieu de type p^+ (**Figure A.2c**).

Si une interaction d'une particule ionisante se produit dans ce volume de déplétion, les composantes des paires électrons-trous créées sont accélérées vers chacune des zones dopées. Les électrons sont accélérés vers les impuretés ionisées positivement, donc vers la zone dopée n , alors que les trous sont accélérés vers la zone dopée p^+ . En ajoutant une électrode à chacune des zones dopées, il est possible de récolter un courant dû aux paires créées et de générer un signal dont l'intensité est proportionnelle à l'énergie déposée dans la zone de déplétion. Cependant, toute interaction se produisant dans la zone en dehors du volume de déplétion, non-électriquement chargée, créera des paires électron-trou ayant une grande probabilité de se recombiner, n'entraînant pas la génération de courant dans le cristal. De plus, si l'intensité du champ électrique dans la zone de déplétion est insuffisante, la probabilité de collection des paires électron-trou générées dans la zone de déplétion s'en voit également affectée, celles-ci

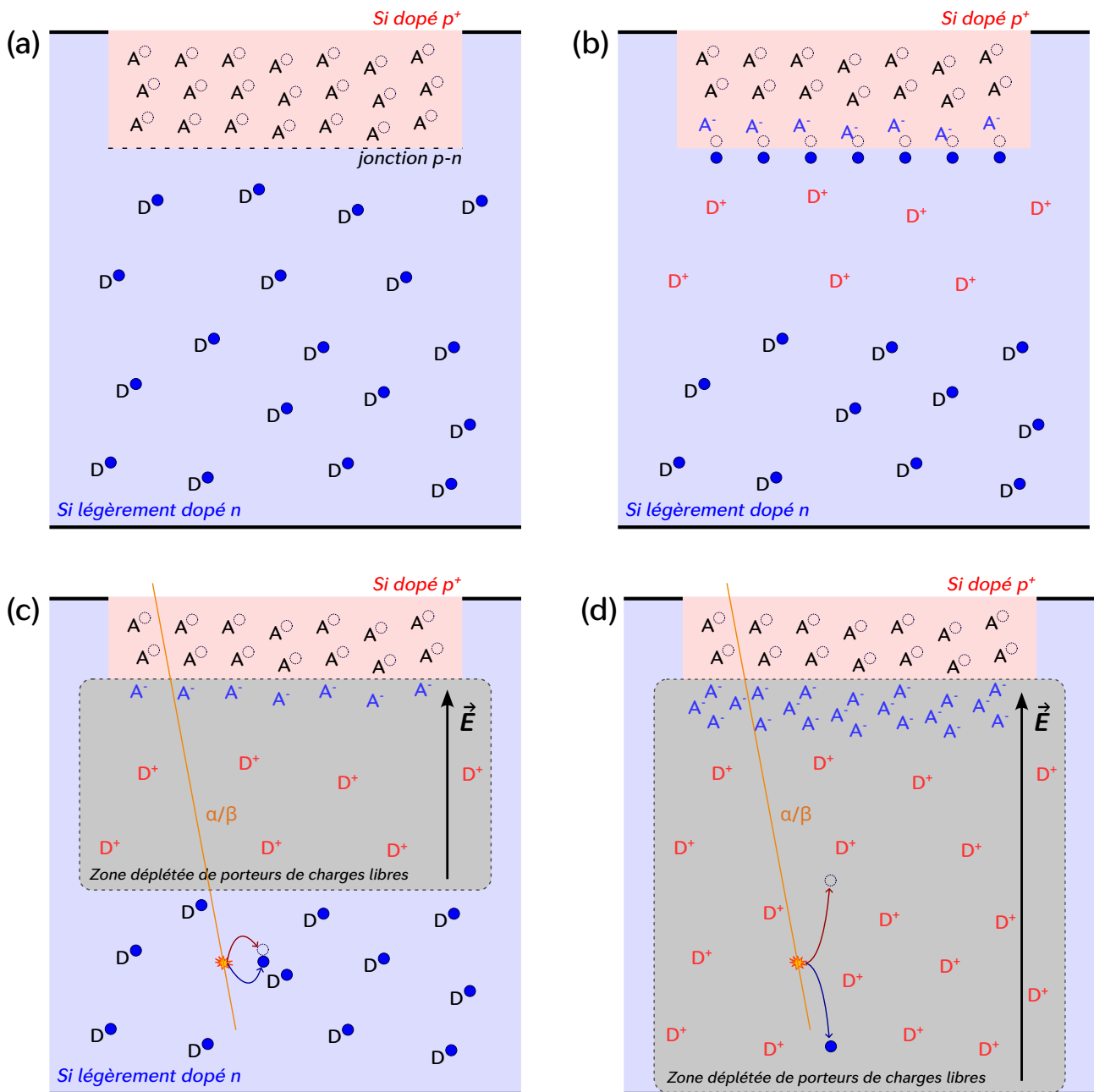


Figure A.2 – Schéma de principe du dopage p^+ pour les détecteurs à semi-conducteurs à implantation ionique. (a) Le cristal de silicium, à l'aide d'un faisceau d'atomes réalisant une liaison covalente de moins que le silicium tel que le bore, est fortement dopé p^+ en atomes accepteurs d'électrons, notés A. Le cristal de silicium, du fait d'impuretés résiduelles, est légèrement dopé n par des atomes donneurs D possédant un électron peu lié. (b) Lorsque les deux types de matériaux sont en contacts, les trous et les électrons à plus grande proximité de la jonction p-n s'attirent et se recombinent, déplaçant localement le milieu de charges libres. (c) Les impuretés résiduelles se retrouvent ionisées dans la zone de déplétion, générant un champ électrique dans cette zone et une résistivité forte du fait de l'absence de porteurs de charges libres. (d) En appliquant une tension de polarisation, la zone de déplétion peut couvrir l'ensemble du volume jusqu'à l'électrode de collecte de charges, située à l'opposé de la surface d'entrée fortement dopée. Si une interaction se produit dans la zone de déplétion, l'électron et le trou seront attirés vers les extrémités opposés de la diode et généreront un courant dans les électrodes aux bornes du détecteur.

devant traverser une zone de porteurs de charge avant d'atteindre les électrodes.

La tension présente aux extrémités de la zone de déplétion pour un détecteur à implantation ionique est de l'ordre de 1 V. En appliquant une tension au détecteur amplifiant le champ électrique dans la zone de déplétion, les recombinaisons des sites donneurs et accepteurs se produisent sur un plus grand volume autour de la jonction p-n et le volume de la zone de déplétion croît (**Figure A.2d**). En pratique, la tension appliquée est au moins suffisante pour couvrir l'ensemble du volume de détection jusqu'à la surface opposée à celle du dopage surfacique, ce qui permet d'assurer une détection plus complète des paires électrons-trous générées; on parle alors de déplétion totale. Le détecteur est généralement opéré à une tension supérieure à la tension de déplétion totale afin d'uniformiser autant que possible le champ électrique dans la zone de déplétion. Ceci a pour effet d'homogénéiser la vitesse de mobilité des charges dans le détecteur et donc de réduire la dépendance de la durée nécessaire à la création des charges au lieu de l'interaction dans le détecteur. Cette tension ne doit cependant pas être trop élevée, au risque de causer un phénomène de claquage par phénomène d'avalanche.

B | Composition et simulation du milieu de culture

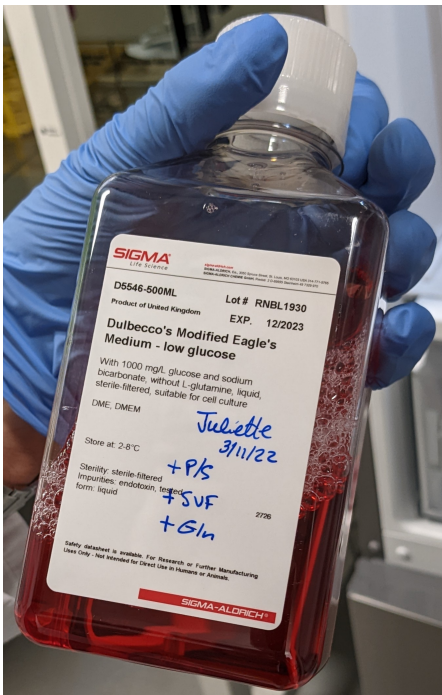


Figure B.1 – Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) utilisé pour la culture cellulaire, dont la composition a été modélisée sous Geant4.

La composition du milieu de culture utilisée pour les simulations Geant4 se base sur la définition de deux matériaux : le SVF, et le milieu de culture qui contient du SVF. La composition des matériaux simulés sous Geant4 est donnée en **Table B.1**.

Le milieu de culture contenant du SVF est majoritairement composé d'eau (à près de 98%), et sa densité à 37°C est donc très proche de celle de l'eau ($1,008 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ et $0,993 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, respectivement) [169, 170]. Les calculs des grandeurs dosimétriques et des signaux produits dans les détecteurs n'évoluent pas significativement selon que le matériau simulé dans les puits de culture est de l'eau ou un milieu réaliste. Cependant, les deux matériaux sont caractérisés par des viscosités dynamiques différentes (à 37°C, environ $0,93 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ pour le milieu contre $0,66 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ pour l'eau [170]), ce qui peut se traduire par des évolutions de la distribution spatiale d'activité également différentes, comme discuté au **Chapitre 5**.

Le milieu de culture utilisé pour la culture cellulaire est du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) [166, 167], un milieu de synthèse dont la composition est adaptée à la culture cellulaire de la plupart des cellules de mammifères. De multiples variations dans la composition de ce milieu sont commercialisées aujourd'hui. Pour les essais *in vitro* présentés dans ce manuscrit, le milieu utilisé est du D5546, de Sigma-Aldrich [168] (*cf.* **Figure B.1**). Ce milieu est composé principalement de sels inorganiques, d'acides aminés, et de vitamines nécessaires au métabolisme cellulaire. Pour assurer la croissance cellulaire, du sérum de veau fœtal (SVF) est ajouté, dilué d'un facteur 10 dans le DMEM, ainsi que de la glutamine (à une concentration de $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Le SVF contient un grand nombre de facteurs de croissance encourageant la réplication cellulaire, et la glutamine est un acide aminé jouant un rôle prépondérant dans la construction des protéines et donc dans l'apport d'énergie aux cellules. Enfin, pour empêcher une contamination biologique du milieu cellulaire, les antibiotiques pénicilline et streptomycine sont ajoutés en très faible quantité (environ $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Afin de mieux évaluer la réponse des détecteurs à l'irradiation, mais également la dose délivrée aux noyaux ou aux cellules, le milieu de culture a été reproduit sous Geant4. La définition d'un nouveau matériau nécessite de spécifier sa masse volumique et sa composition chimique. La construc-

Tableau B.1 – Composition en fraction massique du SVF simulée sous Geant4. La densité du matériau et sa composition sont extraites des références [171, 172] pour le SVF et de [168-170] pour le milieu de culture. Pour les protéines, une composition relative moyenne des différents éléments a été utilisée, à partir de la référence [173].

| SVF $\rho = 0,998 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ | Matériau ou formule brute | Fraction massique (%) | Milieu de culture $\rho = 1,008 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ | Matériau ou formule brute | Fraction massique (%) |
|---|--|--------------------------|---|--|--------------------------|
| Bilirubine | $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$ | 0.00024 | Chlorure de calcium | CaCl_2 | 0.01984 |
| Cholestérol | $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ | 0.03407 | Nitrate de fer | $\text{FeH}_{18}\text{N}_3\text{O}_{18}$ | 0.00001 |
| Creatinine | $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_1$ | 0.00274 | Sulfate de Magnésium | MgSO_4 | 0.00969 |
| Urée | $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ | 0.02605 | Chlorure de potassium | KCl | 0.03968 |
| Sodium | Na | 0.32711 | Bicarbonate de soude | NaHCO_3 | 0.36706 |
| Potassium | K | 0.03134 | Chlorure de sodium | NaCl | 0.63492 |
| Magnesium | Mg | 0.00263 | Phosphate de sodium | NaH_2PO_4 | 0.01081 |
| Phosphate | PO_4 | 0.00208 | Arginine | $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_2$ | 0.00833 |
| Fer | Fe | 0.00016 | Cystine | $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ | 0.00621 |
| Glucose | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | 0.05511 | Glycine | $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ | 0.00298 |
| Protéines | $\text{C}_{100}\text{H}_{158}\text{N}_{28}\text{O}_{30}\text{S}$ | 7.31462 | Histidine | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_3$ | 0.00417 |
| Eau | G4Water | 92.1718 | Isoleucine | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ | 0.01042 |
| | | | Leucine | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ | 0.01042 |
| | | | Lysine | $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ | 0.01448 |
| | | | Méthionine | $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ | 0.00298 |
| | | | Phénylalanine | $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ | 0.00655 |
| | | | Serine | $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$ | 0.00417 |
| | | | Thréonine | $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$ | 0.00942 |
| | | | Tryptophane | $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ | 0.00159 |
| | | | Tyrosine | $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NNa}_2\text{O}_5$ | 0.01030 |
| | | | Valine | G4Valine | 0.00933 |
| | | | Chlorure de choline | $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$ | 0.00040 |
| | | | Acide folique | $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$ | 0.00040 |
| | | | Inositol | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | 0.00071 |
| | | | Niacinamide | $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ | 0.00040 |
| | | | Acide pantothénique | $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$ | 0.00040 |
| | | | Pyridoxine | $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ | 0.00040 |
| | | | Riboflavine | $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ | 0.00004 |
| | | | Thiamine | $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS}$ | 0.00040 |
| | | | Glucose | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ | 0.09921 |
| | | | Rouge de phénol | $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NaO}_5\text{S}$ | 0.00158 |
| | | | Acide pyruvique | $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ | 0.01091 |
| | | | Glutamine | G4Glutamine | 0.02897 |
| | | | Pen-Strep | $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{S}$ | 0.00010 |
| | | | SVF | | 9.89404 |
| | | | Eau | G4Water | 88.77871 |

C | Spectroscopie des émissions β^-

Les chaînes de décroissance du ^{212}Pb et du ^{223}Ra (mais également de l' ^{225}Ac , voir **Table 1.1, Chapitre 1**) contiennent des émissions β^- , caractérisés par une portée beaucoup plus élevée dans les puits de culture. En parallèle du développement du dosimètre par spectroscopie α réalisée au cours de cette thèse, une étude par simulations Monte-Carlo de l'intérêt d'une spectroscopie de ces émissions β^- pour améliorer l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité a été réalisée, au cours du stage de Master 1 d'Ysabella Kassandra Ong, que j'ai encadré. Les résultats présentés dans cette annexe sont issus du rapport rédigé à l'issue de ce stage [174].

Un second détecteur à semi-conducteur en silicium a été utilisé pour des raisons similaires à celles discutées au **Chapitre 2** (en particulier en termes de résolution en énergie et de possibilité de réaliser une spectroscopie en temps réel). L'étude a fait l'objet de trois évaluation : sur le positionnement du détecteur des émissions β^- par rapport aux puits de culture, sur la possibilité d'évaluer une distribution spatiale d'activité à l'aide des émissions β^- uniquement, et sur la possibilité d'utiliser ce détecteur additionnel pour mesurer l'activité présente dans l'ensemble du puits de culture.

C.1 Positionnement du second détecteur

L'objectif initial étant d'améliorer l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité mesurée à l'aide des émissions α , la face d'entrée du second détecteur doit être positionnée dans l'axe vertical du puits de culture. Le détecteur d'émissions α devant demeurer à proximité du fond des puits de culture, deux positionnements possibles pour le second détecteur ont été identifiés, et sont présentés en **Figure C.1** : au-dessus des puits de culture, au contact de la plaque, ou au-dessous du premier détecteur dédié à la spectroscopie α , en géométrie télescope.

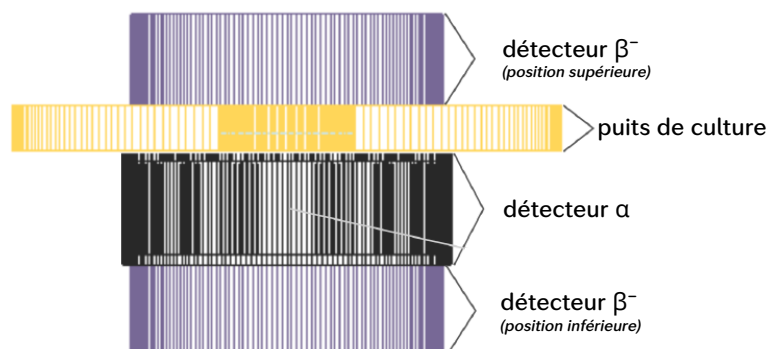


Figure C.1 – Positions testées pour l'ajout d'un détecteur semi-conducteur pour la spectroscopie β^- , par rapport au puits de culture et au détecteur utilisé pour la spectroscopie α utilisé dans le système de dosimétrie présenté dans ce manuscrit.

Les deux géométries de simulation testées ont été reproduites sous Geant4. Le détecteur associé aux émissions β^- a été simulé à l'aide d'un bloc de silicium de même diamètre que le volume sensible pour la détection des émissions α , mais avec une épaisseur beaucoup plus élevée (10 mm) pour assurer une collection totale de l'énergie des particules β^- , leur parcours dans le silicium étant d'environ 5 mm.

Pour déterminer le positionnement de détecteur le plus adapté à l'évaluation de la distribution spatiale de l'activité, les désintégrations β^- des radio-isotopes ^{212}Pb , ^{212}Bi et ^{208}Tl , qui se produisent le long de la chaîne de décroissance du ^{212}Pb , ont été simulées à différentes altitudes dans les puits de culture. L'énergie déposée dans chacune des deux configurations a ensuite été évaluée pour un grand nombre de désintégrations.

Comme mentionné au **Chapitre 3**, la possibilité de réaliser une déconvolution spectrale à l'aide d'une base de spectres nécessite que ces derniers soient suffisamment distincts entre eux. Pour chacune des hauteurs de désintégrations testées, pour chacune des positions et pour chacun des radio-isotopes, l'énergie maximale détectée ainsi que l'efficacité de détection ont donc été évaluées. Les courbes associées sont présentées en **Figures C.2a** et **C.2b**.

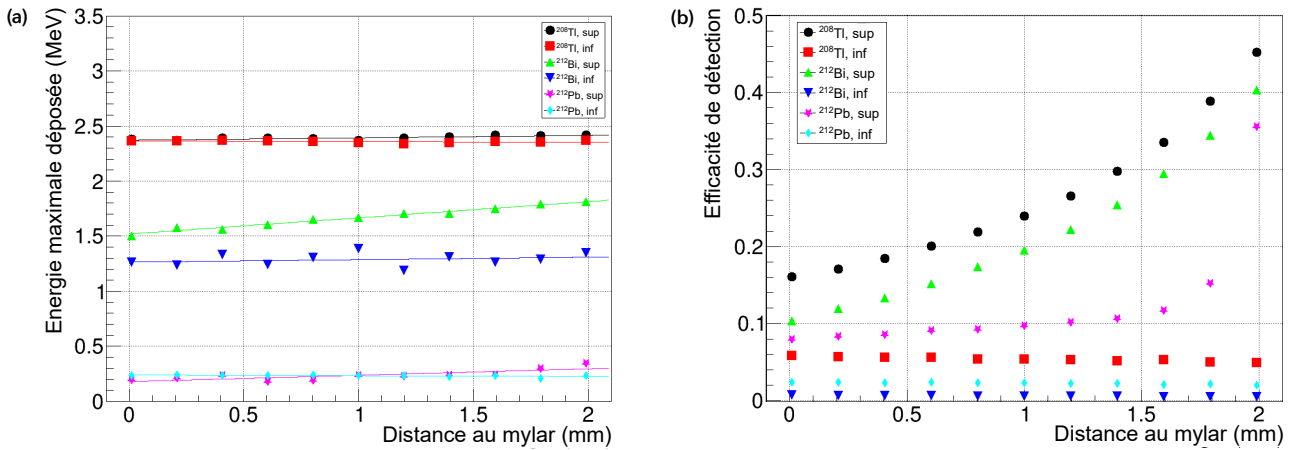


Figure C.2 – Évolution de l'énergie maximale détectée (a) et de l'efficacité de détection (b) en fonction de la hauteur d'émission dans le puits de culture, pour un positionnement du détecteur β^- au-dessus (sup) ou au-dessous (inf) du puits de culture, pour chacun des émetteurs β^- de la chaîne de décroissance du ^{212}Pb .

Ces résultats mettent en évidence la très faible variation de l'énergie maximale détectée en fonction du lieu d'émission pour les deux positions possibles pour le détecteur. Cependant, pour le détecteur positionné au dessus des puits de culture, l'évolution de l'efficacité de détection en fonction du lieu d'émission est beaucoup plus significative. Pour cette configuration de détecteur, la possibilité de distinguer entre différentes distributions spatiales d'activité a donc été évaluée.

C.2 Discrimination de différentes distributions spatiales

Pour tester la possibilité d'évaluer la distribution spatiale de l'activité, plusieurs irradiations ont été simulées avec des distributions d'activité différentes. Ces essais ont mis en évidence l'impossibilité de distinguer entre la présence ou l'absence de gradient d'activité au fond des puits de culture à partir des spectres en énergie β^- , qui se superposent pour l'ensemble des distributions testées, comme illustré en **Figure C.3**. Cette observation n'est que la conséquence logique de la très faible évolution de l'énergie maximale détectable en fonction du lieu d'émission et de la longueur caractéristique de l'évolution de l'efficacité beaucoup plus élevée que celle des gradients simulés (de l'ordre de 100 μm contre 3 μm).

Pour une localisation de gradient donnée, une superposition similaire des spectres mesurés a également été obtenue pour différentes amplitudes et différentes longueur caractéristique de

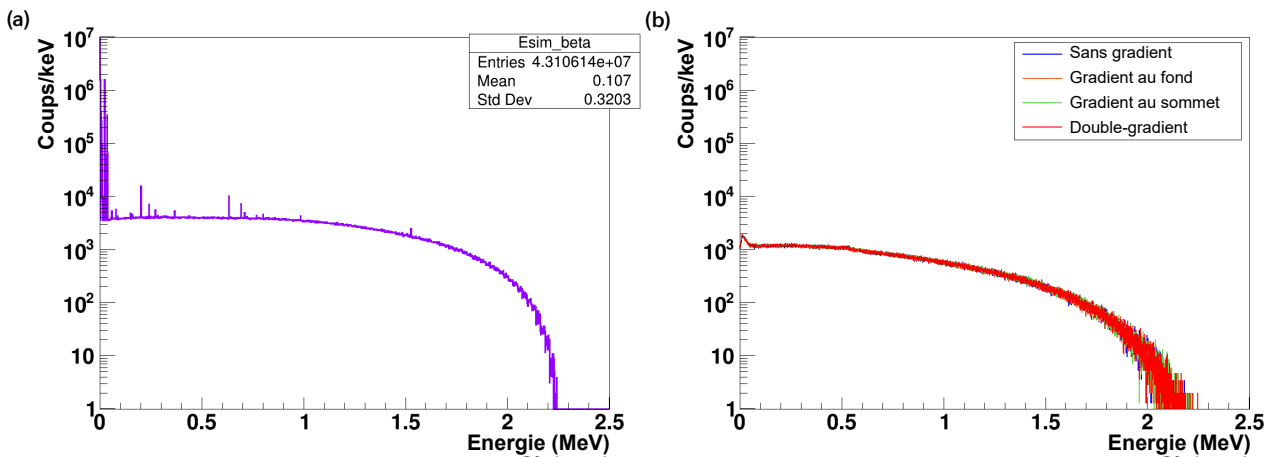


Figure C.3 – (a) Spectre en énergie simulé des émissions β^- et des désexcitations du ^{212}Bi . (b) Allure des spectres en énergie mesurés par un détecteur idéal placé au dessus des puits de culture pour quatre distributions spatiales d'activité en ^{212}Bi simulées : sans gradient, avec un gradient exponentiel au fond du puits, avec un gradient exponentiel au sommet du milieu de culture, avec un gradient à chaque extrémité du milieu de culture.

gradients. La détection des émissions β^- ne semble donc pas pouvoir apporter d'informations supplémentaires sur la distribution spatiale d'activité évaluée à l'aide des émissions α .

C.3 Évaluation de l'activité totale dans les puits de culture

Cependant, cette faible dépendance du signal mesuré avec la distribution d'activité présente dans les puits de culture peut constituer un intérêt dans le cadre de la déconvolution spatiale de l'activité. En effet, si l'allure du spectre en énergie des électrons ne varie que peu avec la distribution d'activité, son intégrale est alors directement proportionnelle à l'activité totale présente dans les puits de culture.

Pour vérifier cette hypothèse, 41 différentes distributions d'activité, incluant des gradients à une seule ou aux deux extrémités d'amplitudes et de longueur caractéristiques différentes ainsi qu'une distribution homogène, ont été simulées. L'ensemble de ces distributions correspondait à une activité totale dans les puits de culture de 15 kBq de ^{212}Bi , intégrés sur 600 s. Les efficacités obtenues pour les différents types de distributions testées sont présentées en **Figure C.4**.

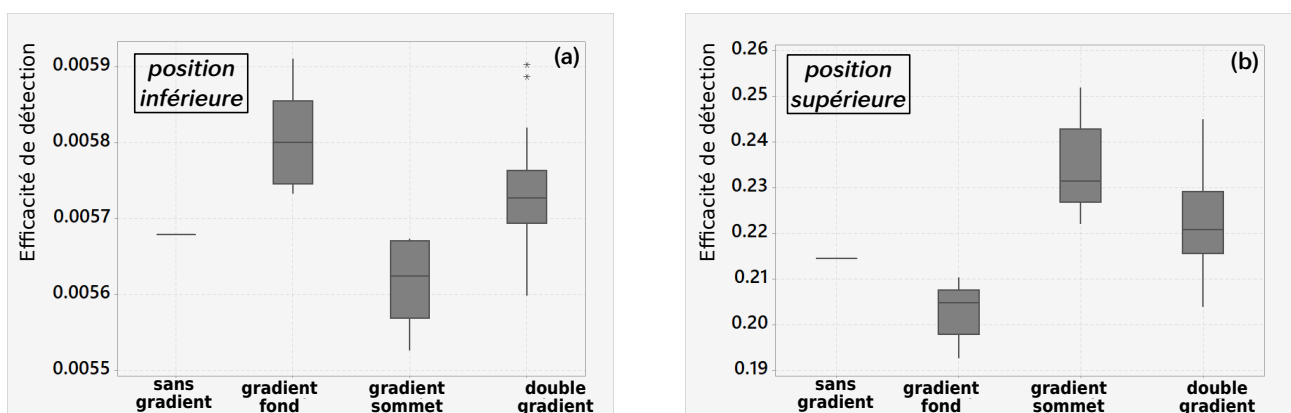


Figure C.4 – Répartition des efficacités de mesures évaluées pour l'ensemble des distributions d'activité testées, pour le détecteur en position inférieure (a) ou supérieure (b) (voir **Figure C.1**).

Du fait d'une plus grande sensibilité de l'efficacité de détection à la position d'émission pour le détecteur en position supérieure, mise en évidence en **Figure C.2b**, les fluctuations

associées sur l'efficacité de détection sont beaucoup plus élevées pour cette position de détecteur (entre 0.193 et 0.252, soit $\pm 13,3\%$) que pour le détecteur en position inférieure (entre $5,53$ et $5,91 \cdot 10^{-3}$, soit $\pm 3,3\%$). En prenant en compte la plus faible statistique de détection, dans les conditions expérimentales simulées, l'incertitude associée à l'évaluation de l'activité totale par mesure du nombre de coups détectés serait de $6,3\%$ pour le détecteur en position supérieure et de $1,7\%$ pour le détecteur en configuration télescope.

En comparaison de l'incertitude de 5% associée à l'activimètre utilisé lors des irradiations au ^{223}Ra présentées au **Chapitre 5**, l'utilisation du second détecteur en position inférieure pourrait permettre d'évaluer avec plus de précision l'activité totale présente dans les puits de culture, qui est un des paramètres contraignant l'algorithme de déconvolution spectrale C-NNML présenté au **Chapitre 3**. Cependant, ces résultats ont été obtenus en simulant un détecteur idéal, de grand volume. La modélisation de la géométrie de détection réelle pourrait être une source d'erreur sur l'évaluation d'un coefficient de proportionnalité entre débit de coups mesurés et activité totale présente dans le puits, qu'il conviendrait d'étudier en plus en détail si une telle solution était envisagée.

Dosimétrie pour l'évaluation *in vitro* de la radiothérapie interne vectorisée par émetteurs alpha

Résumé

L'évaluation des bénéfices associés au développement d'un nouveau radiopharmaceutique pour la radiothérapie interne vectorisée (RIV) ou l'établissement de nouveaux modèles radiobiologiques nécessite la réalisation d'essais *in vitro*. Mettant en relation des effets biologiques observés et l'irradiation réalisée, ces essais nécessitent de réaliser une dosimétrie de précision. Au cours de cette thèse, un nouveau système de dosimétrie adapté à l'évaluation de radiopharmaceutiques émetteurs α a été conçu. Il se base sur une spectroscopie en énergie des émissions α à proximité des cellules par des détecteurs à semi-conducteurs en silicium. Les détecteurs sont placés directement sous les puits de culture, qui ont été conçus avec un fond mince en mylar pour permettre la transmission des particules α émises depuis le milieu de culture. Une chambre étanche permettant d'interfacer les puits de culture et les détecteurs tout en protégeant ces derniers de l'humidité des incubateurs cellulaires a également été conçue. Dans un premier temps, l'ensemble du système de détection a été caractérisé expérimentalement. Un algorithme d'analyse spectrale permettant d'évaluer la distribution spatiale de l'activité dans le milieu de culture a ensuite été développé. Les distributions d'activité évaluées sont alors converties en doses délivrées à l'aide de simulations Monte-Carlo et du formalisme dosimétrique du MIRD. Les performances de l'algorithme ont été vérifiées à l'aide de simulations d'irradiations, avec une erreur observée sur la dose systématiquement inférieure à 3%. Le nouveau système de dosimétrie a enfin été utilisé en conditions expérimentales pour des irradiations au ^{223}Ra et au ^{212}Pb . Ces essais ont mis en évidence une dépendance de la distribution spatiale de l'activité avec les conditions expérimentales, et une variabilité significative des doses délivrées pour une même activité injectée (jusqu'à plus de 100 % d'écart-type). Ces essais ont donc validé l'utilisation et démontré l'utilité du nouveau système de dosimétrie développé.

Mots clés : dosimétrie, radiothérapie interne vectorisée, émetteurs alpha, essais *in vitro*, spectroscopie, déconvolution, monte-carlo

In vitro dosimetry for assessment of targeted alpha therapy

Abstract

Assessment of the benefits of a new radiopharmaceutical developed for targeted radionuclide therapy (TRT), as well as the construction of new radiobiological models heavily relies on *in vitro* assays. These assays require precision dosimetry to relate a biological response to a given irradiation. For the assessment of α -emitting radiopharmaceuticals, a new dosimetric system relying on energy spectroscopy of the α -particles emitted close to the cell medium has been developed. Silicon detectors were placed directly below the culture wells, which bottom was made of a thin foil of mylar to allow the transmission of the α -particles from the culture medium towards the detectors. A humidity-tight chamber allowing the contact between the detectors and the culture wells while protecting the formers from the atmosphere of the incubator has been conceived as well. In a first step, the detection setup was experimentally characterized. A spectral analysis algorithm allowing the evaluation of the activity spatial distribution in culture medium was then developed. These distributions are then converted into delivered doses through Monte-Carlo simulations, following the MIRD dosimetric formalism. The performances of the algorithm have been assessed via simulation of irradiations, with a dosimetric error systematically below 3%. The new dosimetric system has finally been used experimentally for irradiations with ^{223}Ra and ^{212}Pb . These assays highlighted a dependency of the activity spatial distribution with experimental conditions, as well as a significant variability of the delivered doses for a given injected activity (up to more than 100 % of standard deviation). These assays thus experimentally validated the use and demonstrated the necessity of the new dosimetric system developed in this work.

Keywords: dosimetry, targeted radiotherapy, alpha emitters, *in vitro* assays, spectroscopy, deconvolution, monte-carlo
