

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

APPROCHE MICRODOSIMETRIQUE DE LA RADIOIMMUNOTHERAPIE ALPHA

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Médecine

Spécialité : Physique Médicale

*présentée
et soutenue publiquement par*

Nicolas Chouin

le 20/06/2008, devant le jury ci-dessous

Président :

Rapporteurs : Monsieur André Pèlerin, DR INSERM, Montpellier
Madame Isabelle Gardin, Physicienne médicale, Rouen

Examineurs : Madame Françoise Kraeber-Bodéré, PU-PH, Université de Nantes
Monsieur Manuel Bardiès, CR INSERM, Université de Nantes

Directeur de thèse : Monsieur Manuel Bardiès, CR INSERM, Université de Nantes

" La plus belle chose dont nous puissions faire l'expérience est le mystère - la source de tout vrai art et de toute vraie science. " Albert Einstein

Abbréviations:

ADN : Acide Désoxyribonucléique
CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSDA : Approximation du Ralentissement Continu
Bmax : Nombre de sites antigéniques présents à la surface d'une cellule
DMS : Différence maximale de survie
EANM : European Association of Nuclear Medicine
EBR : Efficacité Biologique Relative
FA : Fraction Absorbée
FAM : Fraction Absorbée Massique
FFEMR : Fraction de la moelle osseuse rouge composée de fluide extracellulaire
HLA : Human Leukocyte Antigen
ICRU : International Commission on Radiation Units and measurements
INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
Kd : Constante de dissociation d'un anticorps
MC : Monte-Carlo
MCNP : Monte Carlo N-Particle
MIRD : comité Medical Internal Radiation Dose
RIT : Radioimmunothérapie
SEE : Specific Effective Energy
TCP : Tumour Control Probability
TEL : Transfert d'Energie Linéique
Voxel : élément parallélépipédique composant une image numérique tridimensionnelle
(VOLUME X ELEMENT)

Liste des tableaux et des figures :

Figure 1: Schéma de principe de la radioimmunothérapie.	23
Figure 2: Parcours et densité d'ionisations des particules α et des particules β dans la matière.	26
Figure 3: Survie cellulaire représentée en fonction de la dose après une irradiation α et après une irradiation β	30
Figure 4: Image planaire postérieure d'un patient après chaque injection de ^{213}Bi -HuM195 d'une série de 4.....	33
Figure 5: Scintigraphies au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP et au ^{223}Ra chez un patient avec des métastases osseuses.....	34
Tableau 1: Quantités et unités utilisées en microdosimétrie.....	38
Figure 6 : Représentation du DPK de l' ^{131}I dans l'eau.....	42
Figure 7: Fantôme anthropomorphique de Cristy et Eckerman et fantôme anthropomorphique en développement.....	43
Figure 8: Diffusion élastique de la particule α	65
Figure 9: Diffusion inélastique : excitation - Diffusion inélastique : ionisation.....	65
Figure 10 : Pouvoir d'arrêt total en fonction de l'énergie de la particule α	69
Figure 11: Pouvoir d'arrêt de la particule α en fonction de la distance de pénétration dans la matière.....	70
Figure 12: Parcours de particules α de 4 MeV dans l'eau (Simulation Geant4).	71
Figure 13: Régions de diamètre de site et d'énergie de particule dans lesquelles les dépôts d'énergie des événements individuels sont fortement influencés par le parcours (R), le straggling (S) et les rayonnements delta (δ).....	72
Figure 14: Géométries cellulaires simulables par le modèle.	86
Figure 15: Cluster de 13 cellules de compacité 0,74.....	87
Figure 16: Cluster cellulaire de rayon 100 μm	88
Figure 17: Distribution des anticorps radiomarqués à la périphérie d'un cluster.	90
Figure 18: T_1 en fonction de z_0	92
Figure 19: Schéma du modèle de calcul utilisé pour la distribution volumique.	95
Figure 20: Schéma du modèle de calcul utilisé pour la cross-dose.....	96
Figure 21: Distributions « simple-coup» (à gauche) et « multi-coups» (à droite) de l'énergie spécifique déposée dans le noyau d'une cellule située au centre d'un cluster de 13 cellules (de compacité 0,74) calculées par le modèle développé, par MCNPX et par Geant4.	101
Figure 22: Distributions « simple-coup» de l'énergie spécifique déposée dans le noyau d'une cellule isolée calculées par le modèle développé, par MCNPX et par Geant4.	102
Tableau 2: Dose absorbée et nombre moyen de coups reçus par le noyau de la cellule cible considérée dans cinq configurations distinctes calculées par Geant4, MCNPX et le modèle développé.	103
Figure 23: Schémas des cellules simulées dans le cadre de l'étude de l'influence de l'excentricité du noyau cellulaire sur les spectres microdosimétriques.....	105
Figure 24: Distributions « simple-coup» de l'énergie spécifique déposée dans le noyau d'une cellule isolée lors d'une irradiation surfacique (gauche) et lors d'une irradiation volumique (droite).	105

Figure 25: Distribution simple-coup d'énergie spécifique dans le noyau des cellules lors d'une irradiation surfacique.	107
Figure 26: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau. 5 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu à la surface de la cellule (gauche). 50 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu à la surface de la cellule (droite).	107
Figure 27: Survie cellulaire en fonction du nombre de désintégrations ayant lieu en surface des cellules.	108
Figure 28: Distribution simple-coup d'énergie spécifique dans le noyau lors d'une irradiation volumique.	109
Figure 29: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau. 100 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu dans le volume entourant la cellule (gauche). 10 000 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu dans le volume entourant la cellule (droite).	109
Figure 30: Survie cellulaire en fonction du nombre de désintégrations ayant lieu en surface des cellules.	110
Figure 31: Variation de la dose en fonction de la masse de la cible	115
Figure 32: Dose moyenne absorbée pour laquelle l'écart type relatif de la distribution $f(z)$ est égale à 20% en fonction du rayon du noyau.	117
Figure 33: Parcours des particules α dans la matière.	118
Figure 34: Distributions log-normale correspondant à différents paramètres de forme.	122
Figure 35: Survie cellulaire calculée en fonction de l'activité moyenne par cellule si l'on suppose que l'activité par cellule suit une distribution log-normale	122
Figure 36: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée par le noyau lorsque la localisation des sources varie (noyau, cytoplasme, membrane ou dans le milieu extracellulaire).	124
Figure 37: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau pour une dose moyenne absorbée de 5 Gy. Les trois courbes correspondent à des localisations des sources différentes (noyau, surface, milieu).	125
Tableau 3: Rapports des survies pour des doses moyennes (délivrées au noyau de la cellule) égales (1 Gy et 5 Gy) lorsque les sources sont localisées dans le noyau, à la surface de la cellule, dans le milieu entourant la cellule.	125
Tableau 4: DMS pour une même dose moyenne au noyau de la cellule entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du noyau ou de la membrane et entre une irradiation provenant de la membrane et une irradiation provenant du noyau.	126
Figure 38: Différence maximale de survie pour une même dose moyenne délivrée au noyau de la cellule entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du noyau pour différents rayons cellulaires et nucléaires.	126
Figure 39: Différence maximale de survie pour une même dose moyenne au noyau de la cellule entre une irradiation provenant de la surface de la cellule et une irradiation provenant du noyau pour différents rayons cellulaires et nucléaires.	127
Figure 40: DMS pour une même dose moyenne au noyau entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du noyau pour différents rayons nucléaires ($R_{\text{cef}}=10 \mu\text{m}$) et pour différentes radiosensibilités ($z_0=0,1$ ou $0,5$ ou 1 Gy). ..	128
Figure 41: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée par le noyau. Les 4 couleurs de points représentent des localisations de sources variables (noyau, volume, noyau+volume, surface+volume).	129
Figure 42: DMS en fonction du rayon du noyau pour trois radiosensibilités ($z_0=0,1; 0,5; 1$ Gy). Cette différence maximale exprime l'écart entre les courbes de survie d'une cellule comportant $1 \cdot 10^6$ sites antigéniques et une cellule ne comportant aucun site.	130

Figure 43: DMS en fonction du rayon du noyau pour trois radiosensibilités ($z_0=0,1; 0,5; 1$ Gy). Cette différence maximale exprime l'écart entre les courbes de survie d'une cellule comportant $2,5 \cdot 10^5$ sites antigéniques et une cellule ne comportant aucun site.....	130
Figure 44: Différence maximale de survie en fonction du rayon du noyau pour trois radiosensibilités ($z_0=0,1; 0,5; 1$ Gy). Cette différence maximale exprime l'écart entre les courbes de survie d'une cellule comportant $2,5 \cdot 10^5$ sites antigéniques et une cellule comportant $1 \cdot 10^6$ sites antigéniques.....	131
Figure 45: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée par le noyau pour deux localisations des sources (Noyau, ou dans le milieu extracellulaire), lorsqu'une distribution de rayons cellulaires au sein de la population est prise en compte et lorsqu'une distribution de la fixation de l'activité par les cellules est prise en compte.	132
Tableau 5: DMS pour une même dose moyenne au noyau lorsqu'une distribution de rayons cellulaires est prise en compte par rapport à un calcul réalisé avec des rayons moyens pour différentes localisations des sources (noyau, membrane, milieu extracellulaire).	132
Tableau 6: DMS pour une même dose moyenne au noyau lorsqu'une distribution de l'activité fixée (distribution log-normale, $\sigma=1$) est prise en compte par rapport à un calcul réalisé avec une activité moyenne pour différentes localisations des sources (noyau, membrane).....	133
Figure 46: Différence maximale de survie lorsque l'on tient compte de la distribution des rayons et lorsque l'on considère des rayons moyens ($R_{\text{cellmoyen}}=10 \mu\text{m}; R_{\text{noymoyen}}=5 \mu\text{m}$) en fonction de l'écart type relatif de la distribution gaussienne des rayons.	133
Figure 47: Différence maximale de survie lorsque le nombre de désintégrations en surface de la cellule est constant et lorsque ce nombre est distribué selon une distribution log-normale en fonction de la radiosensibilité z_0	134
Figure 48: Distributions d'énergie spécifique, $f(z)$, dans les noyaux d'une cellule située au centre du sphéroïde et d'une cellule située en périphérie du cluster ($R_{\text{cluster}}=100 \mu\text{m}$, compacité = 0,74). 21 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu à la surface de chaque cellule du cluster.	136
Figure 49: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon $21 \mu\text{m}$ en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Les courbes de survie sont calculées soit par une méthode microdosimétrique (lignes) soit par une méthode macrodosimétrique (pointillés).....	139
Figure 50: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon $50 \mu\text{m}$ en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Les courbes de survie sont calculées soit par une méthode microdosimétrique (lignes) soit par une méthode macrodosimétrique (pointillés).....	140
Figure 51: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon $100 \mu\text{m}$ en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Les courbes de survie sont calculées soit par une méthode microdosimétrique (lignes) soit par une méthode macrodosimétrique (pointillés).....	140
Tableau 7: DMS pour une même dose moyenne au sphéroïde entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du noyau ou de la membrane et entre une irradiation provenant de la membrane et une irradiation provenant du noyau.	141
Tableau 8: Différence maximale de survie pour une irradiation volumique et une irradiation surfacique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique.....	142
Figure 52: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon $100 \mu\text{m}$ en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources.	142

Tableau 9: Différence maximale de survie pour une irradiation volumique et une irradiation surfacique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique.....	143
Figure 53: Différence maximale de survie entre une irradiation volumique et une irradiation provenant du noyau pour trois tailles de noyaux de cellules. Le calcul a été effectué dans un cluster de rayon 100 µm pour trois radiosensibilités.	143
Figure 54: Différence maximale de survie pour une irradiation surfacique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique pour trois radiosensibilités et trois tailles de noyaux de cellules.....	144
Figure 55: Différence maximale de survie pour une irradiation volumique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique pour trois radiosensibilités et trois tailles de noyaux de cellules.....	145
Figure 56: Survie cellulaire en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Le calcul a été réalisé pour un cluster de rayon de 50 µm composé de cellules possédant toutes les mêmes rayons cellulaires (signes pleins) et des cellules dont les rayons cellulaires sont distribués selon une gaussienne tronquée (signes vides).	145
Figure 57: Survie cellulaire en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Le calcul a été réalisé pour un cluster de rayon de 100 µm composé de cellules possédant toutes les mêmes rayons cellulaires (signes pleins) et des cellules dont les rayons cellulaires sont distribués selon une gaussienne tronquée (signes vides).	146
Figure 58: Survie cellulaire en fonction de la dose au sphéroïde pour des sources de ²¹³ Bi localisées dans le noyau ou à la surface des cellules. Les deux courbes supérieures représentent les cas où l'activité est distribuée de façon log-normale ($\sigma=0,1$ et $\sigma=1$) à la surface des cellules.	147
Tableau 10: DMS lorsque le nombre de désintégrations (²¹³ Bi) en surface des cellule d'un cluster de rayon 100 µm est constant et lorsque ce nombre est distribué selon une distribution log-normale.	147
Figure 59: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster de 100 µm en fonction du nombre de désintégrations par cellule lorsque 100%, 50%, 10% des cellules ou seules les cellules situées en périphérie des clusters sont marqués.	148
Figure 60: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster de 100 µm en fonction de la dose moyenne au sphéroïde lorsque 100%, 50%, 10% des cellules ou seules les cellules situées en périphérie des clusters sont marqués.	149
Figure 61: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster contenant 1 million de cellules en fonction de l'activité fixée dans le cluster lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marqués (gauche). Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster contenant 1 million de cellules en fonction de la dose au sphéroïde lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marqués (droite).	149
Figure 62: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster contenant 1 million de cellules en fonction de la self dose et de la cross dose reçues par les cellules dans le cluster lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marqués.....	150
Figure 63: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster de rayon 100 µm de cellules en fonction de la dose au sphéroïde lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marqués.	151
Figure 64: Diamètre cellulaire des cellules en fonction de leur diamètre nucléaire (Lignée LP1).....	158
Figure 65: Courbes de Scatchard: LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) et U266 (rond).....	159
Tableau 11: Nombre de sites de fixation de l'anticorps B-B4.	159

Figure 66: Géométrie simplifiée du puits de culture implémentée dans le fichier d'entrée MCNPX.....	162
Figure 67: Nombre de désintégrations par cellule en fonction de la concentration d'activité administrée.	164
Figure 68: Nombre de désintégrations par unité de volume dans le surageant en fonction de la concentration d'activité administrée.....	164
Tableau 12: Facteurs S lorsque les sources sont réparties de façon homogène à la surface de la cellule calculés pour l' ¹³¹ I et la cellule U266 par MCNPX et Geant4.....	165
Tableau 13: Facteurs S _{self} , S _{cross} et S _{vol} calculés pour la cellule U266 et l' ¹³¹ I.	165
Figure 69: Dose moyenne absorbée par le noyau de la cellule U266 en fonction de la concentration d'activité administrée.	166
Figure 70: Origine de la dose moyenne absorbée par les noyaux des cellules et délivrée par les anticorps radiomarqués à l' ¹³¹ I et au ²¹³ Bi pour deux concentrations d'activité ajoutée (25 et 200 MBq/L).	167
Figure 71: Survie clonogénique en fonction de l'activité volumique ajoutée après exposition à des anticorps B-B4 radiomarqués avec différents radionucléides: ²¹³ Bi (carrés), ¹³¹ I (ronds).....	168
Figure 72: Survie clonogénique en fonction de la dose moyenne absorbée par les noyaux des cellules après exposition à des anticorps B-B4 radiomarqués avec différents radionucléides: ²¹³ Bi (rouge), ¹³¹ I (vert).	169
Figure 73: Survie clonogénique de 3 lignées de myélome multiple (LP1 : carré ; RPMI 8226 : triangle ; U266 : rond) après une irradiation non spécifique (formes vides) et spécifique par le ²¹³ Bi-B-B4 (formes pleines)	170
Figure 74: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau pour les trois lignées cellulaires (LP1, RPMI 8226, U266) lors de l'irradiation α.	170
Figure 75: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau pour les trois lignées cellulaires (LP1, RPMI 8226, U266) lors de l'irradiation γ.	171
Figure 76: Distributions multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau des cellules LP1.	172
Tableau 14: Pourcentage de cellules U266 recevant des doses comprises entre 0 et 0,18 Gy lorsque la dose moyenne absorbée vaut 0,146 Gy.....	172
Tableau 15: Valeurs des EBR « macrosimétriques » (calculés à partir des valeurs de D ₀) et les EBR « microdosimétriques » (calculés à partir des valeurs de z ₀) pour les trois lignées cellulaires du myélome multiple.....	173
Figure 77: Comparaison de valeurs d'EBR provenant de la littérature et d'EBR calculées lors de cette étude.	174
Figure 78: Survie cellulaire en fonction du nombre moyen de coups reçus par le noyau des cellules pour les trois lignées cellulaires (LP1, RPMI 8226, U266) lors de l'irradiation γ.	175
Figure 79: Distribution des rayons cellulaires mesurés au sein d'un échantillon de 200 cellules T2.	177
Figure 80: Voie de présentation des antigènes associés aux molécules de CMH I.	178
Figure 81: Survie des cellules T2 en fonction de la concentration d'anticorps ajoutés.	181
Figure 82: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau des cellules T2 pour un concentration d'anticorps ajoutés de 2,5*10 ⁻⁹ M.....	182
Figure 83: Survie cellulaire mesurée et pourcentage de cellules épargnées en fonction de la concentration de peptides ajoutés (cellules T2).....	183
Figure 84: Survie cellulaire des cellules T2 en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau lors de l'irradiation spécifique (rouge) et de l'irradiation non spécifique (vert).	184
Figure 85: Survie cellulaire des cellules Ada en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau lors de l'irradiation spécifique (rouge) et de l'irradiation non spécifique (vert).	184

Tableau 16: Paramètres D_0 , z_0 , et n_0 calculés pour les cellules Ada et T2 quand l'irradiation est non-spécifique ou spécifique.	185
Figure 86: Mortalité des cellules Ada en fonction du pourcentage de noyaux touchés (A) ou du pourcentage de cellules touchées (B).	186
Tableau 17: Paramètres D_0 , z_0 , et n_0 calculés pour les cellules Ada et T2 quand l'irradiation est non-spécifique ou spécifique.	186
Tableau 18: Valeurs des différents paramètres du modèle.	192
Figure 87: Dose moyenne absorbée en fonction de la masse d'anticorps injectés (A), de l'activité spécifique (B), du nombre de sites antigéniques par cellule (C) et de la constante de dissociation de l'anticorps (D).	193
Figure 88: Nombre de sites antigéniques nécessaires pour atteindre un TCP de 0,9 en fonction du nombre de cellules tumorales.	195
Figure 89: Nombre de sites antigéniques nécessaires pour atteindre un TCP de 0,9 en fonction du nombre de cellules tumorales.	196

Tables des matières :

Introduction Générale	15
Chapitre I : Contexte Général	20
1 La radiothérapie vectorisée :	21
1.1 Radiothérapie Métabolique	21
1.2 Applications locorégionales	21
1.3 Vectorisation par les peptides	21
1.4 Radioimmunothérapie	22
1.4.1 Indications :	23
1.4.2 Paramètres clé de la RIT :	24
1.4.2.1 Anticorps :	24
1.4.2.2 Radionucléides :	25
1.4.2.3 Tumeur :	27
1.4.3 Limitations et optimisations possibles :	27
1.4.4 RIT- α :	28
1.4.4.1 Caractéristiques radiologiques et radiobiologiques des particules α :	29
1.4.4.1.1 Caractéristiques radiologiques	29
1.4.4.1.2 Caractéristiques radiobiologiques	29
1.4.4.2 Indications de la RIT- α	30
1.4.4.3 Les différents émetteurs α	32
1.4.4.4 Limitations et Optimisations de la RIT- α	34
1.5 Conclusion:	36
2 Dosimétrie	37
2.1 Quelques généralités et formalisme du MIRD :	37
2.1.1 Définition de la dose absorbée :	38
2.1.2 Fraction absorbée et fraction absorbée massique :	38
2.1.3 Énergie moyenne par transition nucléaire	38
2.1.4 Activité cumulée	39
2.1.5 Dose absorbée	39
2.1.6 Facteur S et SEE	39
2.1.7 Conclusion	40
2.2 Détermination des facteurs S :	40
2.2.1 Modèles analytiques :	40
2.2.2 Calcul Monte-Carlo :	41
2.2.3 Calcul Point-Kernel :	41
2.2.4 Tables du MIRD :	42
2.3 Dosimétrie multi-échelles :	45
2.3.1 Dosimétrie Organe :	46
2.3.1.1 Détermination des facteurs S :	46
2.3.1.2 Quantification de l'activité :	46
2.3.2 Dosimétrie tissulaire :	47
2.3.2.1 Détermination des facteurs S :	47
2.3.2.2 Quantification de l'activité :	47
2.3.3 Dosimétrie cellulaire et multi-cellulaire :	48
2.3.4 Conclusion :	48
2.4 Relation Dose-Effet :	49

2.5 Conclusion:	51
Chapitre II : Interactions Rayonnements/matière et Microdosimétrie des particules α .	63
1 La radioactivité alpha :	64
2 Les interactions rayonnements/matière :	64
2.1 Les particules chargées :	64
2.2 Les différentes interactions :	64
2.3 Pouvoir d'arrêt:	66
2.3.1 Pouvoir d'arrêt électronique :	66
2.3.1.1 Correction des orbitales, C :	67
2.3.1.2 Potentiel moyen d'excitation, I :	68
2.3.1.3 Correction due à l'effet de densité :	68
2.3.2 Pouvoir d'arrêt nucléaire :	68
2.4 Parcours et pic de Bragg :	68
3 La dosimétrie des particules alpha :	70
3.1 Utilisation des pouvoirs d'arrêt:	70
3.2 Critères de l'applicabilité du TEL [7] :	72
4 La microdosimétrie :	73
4.1 Quelques définitions et grandeurs de la microdosimétrie :	74
4.2 Méthodes de calcul:	76
4.2.1 Méthodes analytiques :	76
4.2.2 Méthodes Monte-Carlo :	77
4.2.3 Choix d'une méthode de calcul:	77
4.2.4 Calcul de $f(z)$:	77
4.3 Critères d'applicabilité de la microdosimétrie :	78
4.4 Modèles et méthodes existant pour la microdosimétrie des particules α :	79
4.5 Conclusion	80
Chapitre III : Modèle implémenté et validations	84
1 Présentation générale du modèle	85
1.1 Objectifs du modèle :	85
1.2 Hypothèses du modèle :	86
1.2.1 Définition de la géométrie:	86
1.2.2 Modélisation de la physique:	88
1.2.2.1 Radioéléments:	88
1.2.2.2 Dépôts d'énergie :	89
1.3 Modèle de fixation des anticorps :	89
1.4 Modèle de survie cellulaire :	90
1.4.1 Détermination de la radiosensibilité d'une cellule à la suite d'une irradiation α :	91
1.5 Méthodes de calcul de \bar{n} , $f_1(z)$ et $f(z)$:	92
1.5.1 Détermination de f :	92
1.5.2 Détermination de \bar{n} et $f_1(z)$:	93
1.5.2.1 Anticorps radiomarqués à la surface de la cellule cible :	94
1.5.2.2 Anticorps radiomarqués internalisés dans le noyau de la cellule cible :	94
1.5.2.3 Anticorps radiomarqués libres dans le surnageant ou internalisés dans le cytoplasme:	95
1.5.2.4 Anticorps radiomarqués fixés à la surface, dans le noyau ou dans le cytoplasme des cellules voisines:	96
1.5.2.5 Prise en compte des variations intercellulaires des rayons cellulaires et nucléaires et de la fixation de l'activité:	97

1.6	Organigramme du programme.....	97
2	Validation.....	99
2.1	Matériel et méthodes:.....	99
2.1.1	MCNPX :.....	99
2.1.2	Geant4 :.....	99
2.1.3	Calculs effectués :.....	100
2.1.4	Résultats/Discussion :.....	101
2.2	Impact de la géométrie cellulaire:.....	104
2.2.1	Excentricité du noyau :.....	104
2.2.1.1	Matériel et méthodes :.....	105
2.2.1.2	Résultats/Discussion :.....	105
2.2.2	Écart par rapport à la sphéricité du noyau et de la cellule:.....	106
2.2.2.1	Matériel et méthodes :.....	106
2.2.2.2	Résultats :.....	106
2.2.2.2.1	Irradiation surfacique :.....	106
2.2.2.2.2	Irradiation volumique :.....	109
3	Conclusion :.....	110
Chapitre IV : Intérêt de la méthode microdosimétrique		114
1	Domaine d'emploi de la microdosimétrie selon le critère de Kellerer :.....	116
1.1	Matériel et méthodes :.....	116
1.2	Résultats/Discussion :.....	116
2	Microdosimétrie et courbes de survie :.....	118
2.1	Introduction :.....	118
2.2	Cellule isolée :.....	119
2.2.1	Matériel et méthodes :.....	119
2.2.1.1	Quantification des différences :.....	119
2.2.1.2	Variation de la localisation des sources :.....	120
2.2.1.3	Variation de la taille et de la radiosensibilité des cellules :.....	120
2.2.1.4	Etude de cas réalistes :.....	120
2.2.1.5	Prise en compte des non-uniformités :.....	121
2.3	Résultats :.....	123
2.3.1	Variation de la localisation des sources :.....	123
2.3.1.1	Variation de la taille et de la radiosensibilité des cellules :.....	126
2.3.1.2	Cas réalistes :.....	128
2.3.2	Prise en compte des non-uniformités :.....	131
2.3.2.1	Variation de l'écart type de la distribution gaussienne des rayons :.....	133
2.3.2.2	Variation du paramètre de forme de la distribution d'activité :.....	134
2.3.3	Discussion/Conclusion :.....	134
2.4	Cluster de cellules :.....	135
2.4.1	Matériel et méthodes :.....	137
2.4.1.1	Principe général des comparaisons :.....	137
2.4.1.2	Variation de la taille du cluster :.....	137
2.4.1.3	Variation de la taille des cellules et de la radiosensibilité :.....	138
2.4.1.4	Impact d'une distribution de rayons :.....	138
2.4.1.5	Impact d'une distribution d'activité.....	138
2.4.1.6	Hétérogénéités spatiales de l'activité :.....	138
2.4.2	Résultats:.....	139
2.4.3	Variation de la taille du cluster :.....	139
2.4.3.1	Dosimétrie multi-cellulaire :.....	140
2.4.3.2	Microdosimétrie vs Macrodosimétrie :.....	141

2.4.4	Variation des rayons cellulaires :	142
2.4.5	Influence de z_0 :	143
2.4.5.1	Dosimétrie multi-cellulaire :	143
2.4.5.2	Microdosimétrie vs Macrodosimétrie :	144
2.4.6	Impact d'une distribution des rayons :	145
2.4.7	Impact d'une distribution d'activités :	146
2.4.8	Hétérogénéités spatiales de l'activité:	148
2.4.9	Conclusion:	151
2.5	Conclusion :	153
Chapitre V : Applications biologiques		156
1.1	Cellules du myélome multiple :	157
1.1.1	Introduction.....	157
1.1.2	Matériel et Méthodes:.....	158
1.1.2.1	Lignées Cellulaires :	158
1.1.2.2	Fixation de l'anticorps :	159
1.1.2.3	Radiomarquage de l'anticorps :	160
1.1.2.3.1	Marquage à l' ^{131}I :	160
1.1.2.3.2	Marquage au ^{213}Bi :	160
1.1.2.4	Irradiations :	160
1.1.2.4.1	Irradiation externe au ^{60}Co	160
1.1.2.4.2	Irradiation au ^{213}Bi et à l' ^{131}I	160
1.1.2.5	Mesure de la survie :	161
1.1.2.6	Étude dosimétrique :	161
1.1.2.6.1	Incertitudes	162
1.1.2.7	Calcul de l'EBR:.....	163
1.1.3	Résultats:.....	163
1.1.3.1	Nombre de désintégrations à la surface de chaque cellule:	163
1.1.3.2	Calculs des facteurs S pour l' ^{131}I :.....	165
1.1.3.3	Comparaison Irradiation β /Irradiation α :.....	165
1.1.3.4	Différences de radiosensibilité entre les trois lignées :	169
1.1.3.5	Calcul de l'EBR:.....	171
1.2	Discussion et Conclusion:	173
2	Complexes CMH/peptides	176
2.1	Matériel et Méthodes :	176
2.1.1	Lignées cellulaires :	176
2.1.2	Anticorps :.....	177
2.1.3	Binding de l'anticorps:	178
2.1.4	Internalisation:	178
2.1.5	Radiomarquage des anticorps 7D4 et 8A11 :	179
2.1.6	Contrôle de la configuration cellulaire dans le puits de culture :.....	179
2.1.7	Mesure de la cytotoxicité de l'irradiation :	179
2.1.8	Calcul du nombre d'anticorps radiomarqués fixés à la surface des cellules ..	180
2.1.9	Étude dosimétrique :.....	180
2.1.9.1	Incertitudes	180
2.1.9.2	Détermination de la radiosensibilité des cellules T2 et Ada :.....	180
2.2	Résultats :	181
2.2.1	Impact de la spécificité de l'irradiation :	181
2.2.2	Comparaison Irradiation Spécifique – Irradiation Non spécifique :	183
2.2.3	Radiosensibilité des cellules:	184
2.3	Discussion et conclusion:	187

3	Modèle de la RIT- α :	189
3.1	Matériel et Méthodes :	189
3.1.1	Évaluation de l'efficacité du traitement:	189
3.1.2	Évaluation de la toxicité à la moelle :	190
3.1.3	Valeurs des différents paramètres :	191
3.1.4	Variations des paramètres clé:	192
3.1.4.1	Variation de la masse d'anticorps injectés :	192
3.1.4.2	Variation de l'activité spécifique:	192
3.1.4.3	Variation de la densité antigénique à la surface des cellules:	192
3.1.4.4	Variation du Kd de l'anticorps:	192
3.2	Résultats :	193
3.2.1	Paramètres clé de la RIT- α :	193
3.2.2	Nombre minimal de sites antigéniques présents à la surface des cellules tumoraux pour atteindre un TCP de 0,9 :	194
3.3	Discussion - Conclusion :	196
	Conclusion générale	203
	Annexes	207
	Liste des Publications et congrès internationaux	217

Introduction Générale

En 2000, d'après les estimations issues des registres, le nombre de nouveaux cas de cancer était d'un peu moins de 280 000 en France. Les cancers constituent la première cause de décès pour les hommes et la seconde cause pour les femmes : 150 000 décès dus au cancer ont été enregistrés en 2000. Ces deux chiffres sont en constante augmentation depuis les années 80 (+20% de décès par an dus au cancer par rapport à l'année 1980). Cette augmentation n'est pas le signe d'un échec des thérapies mais est le fait de l'accroissement et du vieillissement de la population. Lorsque l'on s'affranchit de ces effets, on remarque en effet que le risque de décès par cancer diminue. L'évolution démographique des sociétés occidentales devrait, à court terme, amplifier cette augmentation de l'incidence. Une autre évolution observée est l'augmentation de l'incidence des cancers de bon pronostic par rapport à ceux de pronostic médiocre. Ce changement entraîne une augmentation du nombre des patients survivants et guéris de leur maladie. La prise en charge de ces patients doit donc être revue, non plus sous le seul angle de leur survie mais aussi sur celui de leur qualité de vie et de l'après-maladie.

Tous ces chiffres généraux masquent de grandes disparités suivant les cancers. Pour certains cancers, la survie à 5 ans n'est que de 4% (cancer du pancréas) alors que pour d'autres ce chiffre est évalué à 90% (cancer du testicule). De nouvelles voies thérapeutiques doivent donc être explorées pour améliorer le pronostic de ces pathologies résistantes. Actuellement, il existe trois stratégies thérapeutiques principales dans la lutte contre le cancer : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Le choix entre ces différents traitements est réalisé en fonction de la localisation tumorale, du stade de la maladie, de l'âge et de l'état général des malades. Le traitement le plus efficace, lorsqu'il est possible, est la chirurgie. La chimiothérapie ou la radiothérapie externe, souvent associées, ont progressé avec l'apparition d'agents cytotoxiques plus efficaces pour la première, et par l'amélioration de la précision et de la reproductibilité du traitement pour la seconde. Les effets secondaires liés à la radiothérapie sont relativement négligeables par rapport à la morbidité induite par la chimiothérapie, mais elle n'est indiquée que pour les cancers localisés.

La radiothérapie vectorisée est une option intéressante pour utiliser des rayonnements ionisants dans le cadre d'un traitement systémique. La radioimmunothérapie (RIT) est un exemple très prometteur de ce type de thérapie. Cette stratégie thérapeutique utilise des anticorps monoclonaux, spécifiques de certains marqueurs tumoraux, auxquels on adjoint chimiquement des atomes radioactifs. Ces radioimmunoconjugués peuvent alors être injectés par voie systémique au patient et ainsi se disséminer vers les différents foyers tumoraux. La conception et l'optimisation de ces agents sont un processus long et complexe qui nécessite la collaboration de plusieurs disciplines : chimie, biologie, physique, médecine. Bien qu'étudiée de manière importante depuis 30 ans, la RIT n'a donné naissance qu'à deux traitements aujourd'hui autorisés sur le marché : le BexxarTM et le ZevalinTM, tous deux indiqués dans le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens. Les taux de réponse complète observés sont élevés et souvent meilleurs que ceux observés après des cycles de chimiothérapie. Les effets secondaires sont, en outre, relativement limités. Ces deux traitements utilisent deux radionucléides émetteurs β^- : l'⁹⁰Y et l'¹³¹I.

Plus récemment, l'idée d'utiliser des radionucléides émetteurs alpha a été avancée. Les particules α offrent en effet deux avantages par rapport aux particules β^- : une grande cytotoxicité permettant potentiellement de traiter des tumeurs peu radiosensibles et un court parcours dans les tissus qui permet de limiter l'irradiation des tissus sains situés près de la tumeur. La disponibilité des radionucléides émetteurs α a longtemps été un frein important au

développement de la RIT- α . La construction de cyclotron de moyenne énergie a permis l'augmentation de la production d' ^{211}At et des générateurs de ^{213}Bi ont été mis au point pour accroître la distribution de ce radioélément. Ces efforts ont permis le développement d'études pré-cliniques qui ont, finalement, donné naissance à des essais cliniques. Au moins six essais cliniques ont eu lieu ou sont en cours dans le monde. Ils concernent le traitement de la leucémie myéloïde aiguë, de glioblastomes, de mélanomes, de métastases osseuses et de lymphomes. Les premiers résultats sont très encourageants.

Comme pour tout traitement, celui-ci comporte des risques, notamment associés à l'utilisation de rayonnements ionisants. La toxicité n'est pas nulle et l'organe limitant est très souvent dans le cas de la RIT, la moelle osseuse. Il existe donc une fenêtre thérapeutique limitée par cette toxicité à la moelle ou à d'autres organes sains qui doit être pris en compte dans toute optimisation de la technique de la RIT.

La physique, à travers la discipline de la dosimétrie, a un rôle important à jouer dans ce processus d'optimisation. La dosimétrie permet de quantifier les doses de rayonnements délivrés à des organes sains, à la tumeur ou à toute autre cible considérée. Dans le domaine de la radiothérapie externe, une relation entre la dose de rayonnements déposée et les effets biologiques observés a été mise en évidence et est utilisée quotidiennement pour la prescription des traitements. Des logiciels de plan de traitement (TPS) permettent en effet de moduler les faisceaux d'irradiation externe afin de délivrer précisément la dose prescrite.

Bien que le contrôle de l'irradiation soit plus complexe dans le cadre de la RIT, l'utilisation d'une relation dose/effets pour augmenter l'efficacité est possible. On peut, en effet, envisager d'injecter une activité très faible d'anticorps radiomarqués en amont de la thérapie (activité traceuse) afin de connaître, au moyen de l'imagerie, la biodistribution du radiopharmaceutique chez le patient. À partir de la dose calculée pour l'organe sain critique lors de cette injection, il serait ensuite possible d'ajuster l'activité thérapeutique à injecter afin de maximiser l'efficacité du traitement. Cette individualisation beaucoup plus pertinente que l'ajustement de l'activité en fonction du poids du patient, utilisé actuellement, permettrait ainsi d'améliorer globalement l'efficacité des traitements.

La relation dose/effets est malheureusement plus complexe à établir dans le cadre de la RIT, notamment en raison de la non-uniformité de l'irradiation des tissus, et n'est pas encore caractérisée précisément. Cette non-uniformité provient de la fixation hétérogène des anticorps radiomarqués au sein de la tumeur ou des organes sains. Or, la résolution spatiale des détecteurs utilisés pour les patients est trop faible pour caractériser la fixation de l'activité au sein des tissus. Une solution pour étudier l'impact de la distribution non-uniforme de l'activité au sein des tissus sur la relation dose/effets est de travailler sur des données précliniques obtenues lors d'études sur des modèles animaux et des groupes de cellules in vitro.

La RIT- α , en raison des caractéristiques des particules α , semble particulièrement indiquée dans le traitement de maladies résiduelles, de cellules tumorales isolées ou de micrométastases. Cette particularité a des conséquences importantes pour la dosimétrie :

- la résolution de l'imagerie est insuffisante pour caractériser précisément la fixation de l'activité,
- la dosimétrie devra être réalisée au niveau cellulaire et non pas au niveau des organes,
- le caractère stochastique des dépôts d'énergie dans ces cibles de dimensions micrométriques devra être, *a priori*, pris en compte. C'est l'objectif de la

microdosimétrie.

Pour analyser les expériences *in vitro* permettant d'étudier la relation dose/effets et plus généralement les différents paramètres influençant l'efficacité de la RIT- α , un modèle de microdosimétrie cellulaire est indispensable. Le développement d'un tel modèle a constitué le cœur de notre travail de thèse. Ce modèle a été utilisé pour analyser des expériences d'irradiation cellulaires *in vitro* réalisées au sein de l'U892 de l'Inserm à Nantes et modéliser les mécanismes généraux de la RIT- α .

Les chapitres I et II de ce manuscrit s'attachent à décrire le contexte général de ce travail.

Le principe général de la RIT sera décrit et les principales réussites et limitations de cette modalité de traitement seront détaillées. Une attention particulière sera accordée à la RIT- α puisqu'elle constitue le sujet d'étude de ce travail. Le formalisme général de la dosimétrie interne sera ensuite détaillé. Il repose sur un schéma défini par le comité du MIRD (Medical Internal Radiation Dose), il y a tout juste 40 ans, qui peut s'appliquer à n'importe quelle échelle spatiale et notamment à la dosimétrie cellulaire. Enfin, les principales études démontrant une relation dose/effets dans le domaine de la radiothérapie interne seront citées.

Les particules α possèdent des caractéristiques originales qui en font des particules intéressantes dans le contexte de la thérapie. La description des interactions entre les particules α et la structure atomique de la matière fera l'objet de la première partie du chapitre II. Les méthodes de dosimétrie α seront expliquées et les diverses approximations physiques utilisées seront justifiées à partir des données de la littérature. Lorsque l'on s'intéresse à la dosimétrie des particules α dans des cibles cellulaires, le caractère stochastique des dépôts d'énergie doit être considéré. C'est l'objet de la microdosimétrie dont les principaux paramètres et les outils de calcul correspondants seront détaillés dans la seconde partie de ce chapitre.

Le cœur de notre travail de thèse a consisté à développer un modèle microdosimétrique pour analyser les résultats des expériences d'irradiations cellulaires réalisées *in vitro*. Ce modèle permet de simuler l'ensemble des situations rencontrées lors de ces expériences. Il calcule les spectres d'énergie spécifique déposée dans la cible cellulaire considérée (cellule entière, noyau ou cytoplasme de la cellule) ainsi que les paramètres macrodosimétriques associés : la dose absorbée, le nombre moyen de particules α ayant traversé la cible. Le logiciel développé permet également de modéliser la fixation des anticorps aux cellules et utilise un modèle microdosimétrique de la survie cellulaire pour évaluer la toxicité d'une irradiation. Le principe général de ce modèle, basé sur un calcul analytique, et sa validation par comparaison avec deux codes Monte-Carlo (MCNPX et Geant4) seront présentés dans le chapitre III.

L'emploi de la microdosimétrie dans le cadre des expériences *in vitro* d'irradiations cellulaires par des particules α est justifié par un critère défini par Kellerer. Ce critère repose sur des considérations physiques liées aux fluctuations statistiques des dépôts d'énergie dans des cibles de faibles dimensions. Dans le chapitre IV, nous chercherons à déterminer, si l'utilisation de la microdosimétrie apporte réellement des informations supplémentaires dans la modélisation de la survie cellulaire par rapport à un calcul macrodosimétrique. Cette étude portera sur un ensemble de situations théoriques et réalistes dans le contexte de la RIT- α . L'impact de la distribution non-uniforme de l'activité à l'échelle cellulaire sur la survie d'une population de cellules tumorales sera également évalué.

Le chapitre V présente, enfin, l'application de ce modèle à l'analyse de données expérimentales obtenues dans le laboratoire de l'U892 par le groupe étudiant la RIT- α . Les

apports de la dosimétrie cellulaire et de la microdosimétrie pour ce type d'analyse seront évalués. Les limitations de ces approches seront aussi soulignées. La dernière partie présente un modèle théorique général de la RIT- α permettant de quantifier l'efficacité et la toxicité de ce type de traitement. Les paramètres clé pour le succès de la RIT- α seront caractérisés.

Chapitre I : Contexte Général

La radiothérapie externe est aux côtés de la chimiothérapie et de la chirurgie une des stratégies thérapeutiques les plus utilisées dans le traitement des différents cancers. Son mode d'administration, une irradiation des tumeurs à partir d'une source radioactive ou d'un accélérateur de particules situé à l'extérieur du corps du patient, limite, à quelques exceptions près, son indication à un traitement loco-régional des tumeurs.

L'utilisation de rayonnements ionisants pour traiter des cancers diffus ou déjà à un stade métastatique est donc exceptionnelle et la technique privilégiée dans ce cadre sera la chimiothérapie. Celle-ci présente, selon la multitude de traitements chimiques disponibles, une morbidité importante et parfois une certaine inefficacité.

La radiothérapie vectorisée est une alternative à la chimiothérapie, du moins dans son indication. Elle consiste à administrer au patient par voie locale ou systémique un agent pharmaceutique (vecteur) radiomarqué, naturel ou de synthèse. Le vecteur va aller se fixer spécifiquement sur la cible biologique. Les particules ou rayonnements ionisants émis par le radionucléide vont détruire sélectivement cette cible. Le vecteur peut être le radionucléide lui-même, un analogue métabolique, un peptide ou un anticorps monoclonal.

1 La radiothérapie vectorisée :

1.1 Radiothérapie Métabolique

La radiothérapie métabolique est la méthode de radiothérapie vectorisée la plus ancienne. Elle repose sur la propriété de certains vecteurs ou radionucléides de s'intégrer aux métabolismes de groupes cellulaires spécifiques. Ainsi, on utilise depuis 1936 le phosphore 32, qui est incorporé naturellement dans les cellules à prolifération rapide, pour le traitement des pathologies myéloprolifératives telles que les polycythémies vera et les thrombocythémies essentielles. Depuis plus de 50 ans, l'iode 131 est utilisé dans le cadre des traitements des cancers thyroïdiens différenciés après thyroïdectomie [1]. La thyroïde est, en effet, un organe qui capte naturellement l'iode, quel que soit son isotope.

Par la suite, des formes moléculaires plus complexes nécessitant un travail parfois long de chimie de synthèse ont été développées. La molécule de synthèse métaïodo-benzyl-guanidine marquée à l'iode 131 (MIBG-¹³¹I) est, par exemple, utilisée pour le traitement des phéochromocytomes malins et des neuroblastomes [2, 3].

1.2 Applications locorégionales

Les tumeurs inopérables localisées ou confinées dans un organe peuvent être ciblées par voie artérielle. Cette stratégie exploite le fait que la plupart des tumeurs présentent une irrigation sanguine plus importante que les tissus sains environnants. Certains carcinomes hépatocellulaires sont ainsi traités par injection intra-artérielle de lipiodol marqué à l'iode 131 [4].

1.3 Vectorisation par les peptides

Les peptides marqués avec des radionucléides émetteurs β^- constituent un nouveau groupe

prometteur de radiopharmaceutiques [5, 6]. Les peptides naturels, tels que les hormones et neurotransmetteurs, ont une grande affinité avec des récepteurs membranaires spécifiques, mais ils sont inutilisables en raison de leur courte demi-vie biologique. La Somatostatine a été plus spécialement étudiée, et des peptides analogues avec une demi-vie plus longue ont été synthétisés, permettant un radiomarquage et une utilisation en médecine nucléaire. Des analogues de la Bombesine, de la Cholecystokinine, et de l'Oxytocine ont également été développés. Ces peptides, marqués à l'indium 111, à l'yttrium 90, ou au lutétium 177 ont permis le développement d'applications diagnostiques et thérapeutiques.

Dans le cadre de la thérapie, plusieurs essais cliniques de phase I-II sont en cours notamment dans le traitement de tumeurs endocrines avec le radiopharmaceutique ^{177}Lu -DOTATATE [7]. Les premiers résultats sont très prometteurs. Des taux de réponse complète ou partielle de 30% ont été mesurés dans le cadre de traitements de tumeurs neuroendocrines [8].

La principale limitation de cette technique thérapeutique est la forte fixation du peptide radiomarké dans les reins lors de son élimination. Ce dernier est réabsorbé au niveau des cellules tubulaires proximales et est retenu dans l'interstice ce qui entraîne une irradiation importante des reins. La toxicité liée à cette irradiation apparaît quelques mois à quelques années après le traitement et peut entraîner la nécessité pour le patient d'effectuer des dialyses régulières. Des molécules (L-lysine, L-arginine, Amifostine) sont utilisées pour bloquer les récepteurs rénaux des radiopeptides et ainsi limiter la toxicité [9, 10].

1.4 Radioimmunothérapie

Le concept de la radioimmunothérapie (Figure 1), i.e. radiothérapie vectorisée utilisant un anticorps radiomarké, a été proposé, il y a plus d'un siècle, par Ehrlich [11]. La radioimmunothérapie (RIT) a pour objectif principal de délivrer la dose la plus élevée possible à la tumeur tout en épargnant les tissus sains.

Les travaux initiaux dans ce domaine n'ont eu qu'un succès limité en raison du manque de spécificité des anticorps utilisés vis-à-vis des tumeurs. En 1976, avec le développement des techniques d'hybridation, la production d'anticorps monoclonaux a été rendue possible. Ils ont alors été marqués par des radionucléides (principalement l'iode 131) et ont été utilisés contre des antigènes spécifiques de tumeurs ou contre des marqueurs (enzymes, hormones et autres molécules) surexprimés dans les cellules tumorales. Les applications, initialement diagnostiques (immunoscintigraphie), ont petit à petit progressé vers des applications thérapeutiques (radioimmunothérapie) [12, 13, 14, 15, 16].

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 1: Schéma de principe de la radioimmunothérapie.

1.4.1 Indications :

Les cancers hématologiques sont la première indication actuelle de la RIT, notamment les lymphomes non-Hodgkiniens (NHL) [17]. Ils sont des cibles cliniques privilégiées pour la radioimmunothérapie, car ils expriment de façon très abondante des antigènes caractéristiques et sont fortement radiosensibles [18, 19]. Actuellement, les deux seuls radioimmunoconjugués utilisés en routine sont indiqués pour le traitement des NHL : le ^{90}Y ibritumomab tiuxetan (Zevalin™) a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) aux Etats-Unis et en Europe, le ^{131}I tositumomab (Bexxar™) a également obtenu l'AMM mais uniquement aux Etats-Unis. Ces deux traitements ont démontré, lors d'essais cliniques, une efficacité supérieure aux traitements de chimiothérapie, prescrits jusqu'alors. Chez des patients présentant un lymphome non-Hodgkinien folliculaire de bas grade et réfractaires aux traitements de chimiothérapie, le taux de réponse global a été évalué à 65% (28% pour la chimiothérapie précédente) et les réponses complètes à 30% avec une médiane de durée de rémission de 5 ans pour le Bexxar™ [20]. Ces taux de réponse à la RIT sont encore plus élevés lorsque le traitement est utilisé en première ligne, i.e. chez des patients n'ayant pas reçu d'autres modalités de traitement auparavant. Dans un essai clinique de phase II concernant le lymphome non-Hodgkinien folliculaire de bas grade, on a ainsi observé après un traitement au Bexxar™, un taux de réponse objective de 97% et un taux de réponse complète de 63% [21]. Dans un autre essai clinique de même type mais cette fois-ci pour des lymphomes folliculaires avancés, Kaminski [22] a observé un taux de réponse complète de 75%. Des taux de réponse similaires ont été observés avec le Zevalin™ [23, 24, 25].

La toxicité primaire observée lors de ces traitements est une myélosuppression transitoire. En général, la toxicité non-hématologique est, en revanche, minimale. Il n'y a pas, par exemple, de perte de cheveux, ou de mucosite comme dans le cas de la chimiothérapie. À long terme, la toxicité semble équivalente à celle de la chimiothérapie [26].

Il existe de nombreuses autres applications étudiées actuellement, telles que le traitement des leucémies [27, 28] et des lymphomes à cellules-B agressifs réfractaires ou en rechute [29].

La RIT des tumeurs solides s'est avérée, en revanche, beaucoup moins efficace avec des taux de réponses objectives de moins de 2% [30]. La radiosensibilité plus faible des cellules tumorales dans ces cancers ainsi que la faible pénétration des anticorps pourraient limiter

l'efficacité de la RIT. Toutefois, dans le cadre de certaines tumeurs cervicales ou ovariennes, des injections intra-cavitaires d'anticorps radiomarqués après chirurgie ou non semblent montrer une certaine efficacité [31, 32, 33, 34]. Malgré des résultats initiaux peu encourageants, les recherches se poursuivent pour les cancers du sein, colorectaux, pancréatiques, ou encore les cancers pulmonaires à petites cellules [35] en envisageant différentes méthodes d'optimisation de la RIT. À l'heure actuelle, dans le cadre des tumeurs solides, il semble que le traitement des micrométastases et des maladies résiduelles soit l'approche optimale.

1.4.2 Paramètres clé de la RIT :

Pour répondre à l'objectif principal de la RIT, détruire les cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains, le rapport de l'activité concentrée dans la tumeur sur l'activité concentrée dans les tissus sains (Tumeur/Non-Tumeur ratio, ou T/NT) doit être le plus élevé possible. Ce paramètre clé de l'efficacité de la RIT va dépendre de plusieurs facteurs physiques, chimiques, biologiques et physiologiques du radioimmunoconjugué (anticorps + radionucléide) et de la tumeur à cibler [14].

1.4.2.1 Anticorps :

Un anticorps est une glycoprotéine utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries et les virus. Les anticorps ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène.

Le choix de l'anticorps, et en creux de l'antigène, va décider de la spécificité du traitement et de la quantité de radioactivité qui va pouvoir être accumulée dans les tumeurs. Pour une efficacité maximale, cet anticorps doit cibler un antigène spécifique des cellules tumorales, bien représenté à la surface de celles-ci et posséder une bonne affinité pour cet antigène. Son taux de pénétration à l'intérieur des tumeurs doit être satisfaisant et son taux de clairance du sang ou des organes sains doit être le plus rapide possible.

Il a été observé que les anticorps intacts avaient un faible taux de pénétration à l'intérieur des tumeurs. Plusieurs types de fragments d'anticorps, dont la taille moléculaire est plus faible que celle d'une immunoglobuline (IgG) intacte, sont étudiés pour améliorer cette pénétration tumorale. Les fragments bivalents $F(ab')_2$ et les fragments monovalents $F(ab')$ ont montré d'excellents résultats thérapeutiques lors d'essais cliniques ou sur des animaux [36, 37, 38, 39, 40, 41] bien que leurs temps de résidence à l'intérieur des tumeurs soient plus faibles que pour un anticorps intact. D'autres constructs encore plus petits sont étudiés : les « diabodies » et les « minibodies » par exemple [42].

Les premiers anticorps monoclonaux développés dans le cadre de la RIT étaient des anticorps murins. Cette caractéristique pose problème lors des essais cliniques chez l'homme. L'injection d'anticorps murins dans un organisme humain provoque en effet le déclenchement d'une réponse immunitaire et la fabrication, par l'organisme hôte, d'anticorps anti-anticorps murins (également appelé HAMA : human anti-mouse antibodies). Ce phénomène est appelé immunogénicité. L'immunogénicité limite l'administration de l'anticorps à une ou deux injections. Lors d'injections supplémentaires, les anticorps murins sont alors attaqués et dégradés par les anticorps de l'organisme. Le fractionnement potentiel de la thérapie est alors rendu impossible. Des anticorps chimériques ou humanisés (certains fragments de l'anticorps sont remplacés par des fragments d'anticorps humains), et même humains sont développés pour limiter ou supprimer cette réponse immunitaire.

1.4.2.2 Radionucléides :

De très nombreux radionucléides sont disponibles pour la RIT. L'idée principale guidant le choix du radionucléide est son adéquation avec le mode d'administration de la RIT choisi et avec le type de tumeurs à traiter.

Dans le cadre de la RIT, la période physique du radionucléide doit être en rapport avec la cinétique de fixation et de rétention du vecteur utilisé. Une période physique trop courte entraînera un nombre élevé de désintégrations à l'extérieur de la cible, avant que le vecteur radiomarqué n'ait pu se fixer, et conduira donc à une irradiation non spécifique importante. À l'inverse, une période physique trop longue entraînera une irradiation à très faible débit de dose, qui on le sait, est beaucoup moins toxique pour la tumeur.

Le second paramètre à considérer est le type de rayonnement émis par le radionucléide :

- Émissions β^- : Les émetteurs β^- ont un transfert d'énergie linéique (TEL) faible. Le TEL est la quantité d'énergie délivrée par la particule par unité de distance parcourue dans la matière. Le parcours des particules β est relativement long dans la matière (de quelques centaines de micromètres à quelques millimètres), ce qui permet d'envisager en radiothérapie vectorisée la destruction d'une cellule non ciblée du fait des émissions provenant de cellules adjacentes. Ce phénomène, appelé "feu croisé", permet l'augmentation de l'efficacité d'un traitement, puisqu'il n'est pas nécessaire de cibler l'ensemble des cellules à détruire, mais qu'il importe juste de cibler un nombre suffisant de cellules dans la zone à détruire. Les émetteurs β sont les radionucléides les plus employés pour la radioimmunothérapie, notamment l'iode 131, le cuivre 67 et l'yttrium 90, le lutétium 177, le rhénium 186.
- Émissions Auger : Les électrons Auger ont un TEL élevé sur les premiers nanomètres de leur trajectoire. En outre, leur énergie d'émission est faible et leur parcours dans les tissus est très court (de l'ordre de 30 μm pour l'électron le plus énergétique de l' ^{125}I). Ils peuvent donc provoquer une toxicité importante lorsqu'ils sont internalisés au sein même de la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN). À distance du point d'émission, les électrons Auger ont un TEL faible. Une internalisation dans le cytoplasme de ces radionucléides s'est avérée peu cytotoxique [43]. Paradoxalement, il semble que des émissions Auger au niveau de la membrane cellulaire soient plus cytotoxiques [44]. Plusieurs émetteurs Auger ont été utilisés pour la radiothérapie vectorisée, notamment l'iode 125, l'indium 111 et le gallium 67. Les radionucléides émetteurs Auger sont donc très prometteurs, mais le principal défi est de les associer à des vecteurs capables de leur faire pénétrer la membrane de la cellule et la membrane nucléaire. Les radionucléides émetteurs Auger en raison du faible parcours dans les tissus des électrons émis, semblent appropriés pour traiter des cellules isolées ou des micrométastases.
- Émissions alpha : Les émetteurs α ont un TEL élevé, contrairement aux particules β (Figure 2). Les particules α délivrent une dose importante le long de leur trajectoire (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres) ce qui les rend très toxiques. L'astate 211, le bismuth 212 et 213 et l'actinium 225 semblent être les émetteurs les plus prometteurs pour la RIT- α . Leur faible parcours limitant l'effet de feu croisé, les particules α semblent indiquer dans le traitement des cellules isolées (lymphomes, leucémies) et des micrométastases.
- Émissions gamma : Les photons γ , de TEL faible, ont un long parcours dans

les tissus biologiques. La présence d'émissions γ augmente la dose corps entier, non spécifique, puisqu'un photon émis dans la cible va irradier les organes sains à distance. Cependant, quand leur énergie est comprise dans la plage de fonctionnement des gamma caméras (de 100 à 400 keV, avec un maximum d'efficacité autour de 150 keV), il est possible d'acquérir des images scintigraphiques pendant le traitement. Ces images permettent de connaître la biodistribution de la radioactivité. Cette connaissance est nécessaire pour réaliser des études dosimétriques.

QuickTime™ et un
décodeur TIF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décodeur TIF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 2: Parcours et densité d'ionisations des particules α (haut) et des particules β (bas) dans la matière.

Des contraintes techniques limitent ces choix optimaux. Le choix d'un radionucléide se fera, en premier lieu, sur sa disponibilité et son coût de production. Ses propriétés physiques et chimiques vont également beaucoup influencer son couplage à l'anticorps choisi. Le radiomarquage doit, en effet, être simple, reproductible et réalisable dans un temps acceptable par rapport à la période physique du radioélément. L'activité spécifique obtenue à l'issue de cette phase de couplage, qui représente l'activité par unité de masse d'anticorps ou plus simplement la proportion d'anticorps radiomarqués, doit être la plus élevée possible afin d'augmenter l'efficacité anti-tumorale du traitement une fois injecté [45]. Enfin, le couplage devra s'avérer stable *in vivo*. De très nombreux radionucléides, une fois détachés de l'anticorps, ont en effet un certain tropisme pour quelques organes sains. On a ainsi observé que l' ^{211}At libre avait tendance à aller se fixer sur la thyroïde et l'estomac dans des études sur la souris [46]. Cette modification de la biodistribution due au manque de stabilité du radioimmunoconjugué peut entraîner une toxicité importante chez le patient.

1.4.2.3 Tumeur :

Lors du diagnostic d'un cancer, le type, la physiologie et la localisation des tumeurs sont caractérisés à l'aide de l'imagerie médicale et de biopsies. Ces premières informations sont décisives dans le choix de la stratégie thérapeutique.

Dans le cadre de la RIT, la localisation des tumeurs va décider de la voie d'accès des anticorps radiomarqués. Deux types d'injections sont possibles :

- une injection intra-cavitaire pour des cancers dont les cellules tapissent une cavité naturelle ou une cavité née de la résection d'une tumeur par chirurgie (exemples: cancer ovarien, glioblastomes),
- une injection systémique pour des cancers hématologiques ou solides non accessibles.

Le pourcentage de radioimmunoconjugués fixés par les cellules tumorales est un facteur limitant de la RIT. La vascularisation, les barrières à la pénétration des anticorps ainsi que la pression intratumorale et la nature de la maladie (masse tumorale importante vs petite tumeur) vont notamment influencer l'accumulation des anticorps dans la tumeur. Un calcul simple montre que pour 0,001%-0,01% de la dose injectée d'anticorps radiomarqués par gramme de tumeur, la dose cumulée à la tumeur est inférieure à 15 Gy ce qui est très éloigné des 50 Gy nécessaires pour obtenir une réponse thérapeutique dans la plupart des néoplasmes [13]. Si l'accumulation dans la tumeur est faible, la dose nécessaire ne peut pas être atteinte en raison de la dose limitante aux organes sains. En effet, augmenter l'activité injectée pour augmenter la dose à la tumeur s'accompagnera d'une augmentation importante de la dose aux tissus sains et entraînera donc une certaine toxicité. Dans le cadre de la RIT, l'organe sain critique est très souvent la moelle.

Enfin, le dernier point qui va beaucoup influencer l'efficacité de la RIT est la radiosensibilité des cellules tumorales. Les premiers succès obtenus en RIT l'ont été pour les lymphomes. Ces types de cancers sont habituellement très radiosensibles et la dose et le débit de dose nécessaires pour détruire les cellules tumorales sont, dans ce cas, beaucoup moins élevés que pour les tumeurs solides, par exemple.

1.4.3 Limitations et optimisations possibles :

La radioimmunothérapie est étudiée depuis plus de 30 ans par de nombreuses équipes à travers le monde. Au cours des différentes études cliniques et pré-cliniques et avec les informations recueillies lors de traitements routiniers de BexxarTM et de ZevalinTM, les limitations et difficultés liées à la RIT sont désormais bien connues.

La faible accumulation des anticorps dans la tumeur par rapport aux organes sains reste la principale limitation pour délivrer efficacement des doses élevées à la tumeur. L'efficacité de la RIT, comme nous l'avons dit précédemment, est basée sur le différentiel entre l'activité accumulée dans la tumeur et l'activité accumulée dans les organes sains. Plus ce différentiel sera important, plus les doses injectées pourront être augmentées afin d'améliorer la réponse thérapeutique.

Plusieurs méthodes sont envisagées pour améliorer l'index thérapeutique, qui désigne le ratio des effets à la tumeur sur les effets aux tissus sains. Comme mentionné précédemment, des vecteurs moléculaires plus petits sont étudiés afin d'améliorer la perméabilité vasculaire de la tumeur. Ils ont montré un taux de clairance du sang très rapide ce qui limite leur toxicité hématologique.

Une autre solution pour accélérer le taux de clairance des anticorps dans le sang est le préciblage ou pretargeting. Cette méthode consiste à injecter en plusieurs étapes et séparément l'anticorps et le radionucléide afin de diminuer le nombre d'anticorps radiomarqués non fixés dans le sang. Plusieurs approches ont été étudiées. L'une d'entre elles

consiste, lors d'une première étape, à injecter de l'avidine ou streptavidine conjuguée à un anticorps. Lorsque l'on estime que les anticorps non fixés ont disparu de la circulation, on injecte alors de la biotine radiomarquée qui va se fixer, avec une très grande affinité, sur l'avidine conjuguée aux anticorps [47]. Les essais cliniques utilisant cette méthode ont toutefois été décevants en raison d'une forte toxicité aux reins [48, 49, 50]. Paganelli a développé une méthode similaire mais en trois étapes [51]. Une autre approche, appelée Affinity Enhancement System (AES), est utilisée par l'équipe de recherche U892 de l'Inserm de Nantes [52, 53, 35]. La technique AES requiert un haptène radiomarqué et un anticorps monoclonal bispécifique capable de reconnaître, d'une part, la cellule cible et, d'autre part, la molécule radioactive. Dans un premier temps, l'anticorps est injecté. Dans un deuxième temps, quelques jours plus tard, quand l'anticorps est fixé sur les cellules tumorales, une injection diagnostique ou thérapeutique d'haptènes radiomarqués est réalisée. De très bons résultats en matière d'imagerie de la tumeur ont été ainsi obtenus lors d'essais cliniques [54, 55, 35].

La toxicité aux organes sains est le facteur qui empêche l'augmentation des activités injectées aux patients. Une méthode évidente consiste à protéger les organes sains de cette toxicité. Pour limiter la toxicité aux reins, des acides aminés ou de sucres aminés sont administrés et vont bloquer la réadsorption des fragments d'anticorps radiomarqués. Des facteurs de croissance hématopoïétiques voire des cellules souches du sang périphérique peuvent être également injectés au patient afin de contrer les effets myélosuppressifs de la RIT.

Le fractionnement, qui est un protocole dans lequel les injections d'anticorps radiomarqués se succèdent dans le temps, permet de délivrer les anticorps radiomarqués, et donc des doses, de façon plus uniforme (la taille de la tumeur et le nombre de cellules pourraient diminuer après les premières administrations), de réduire la toxicité, d'augmenter la dose maximale tolérée et de prolonger la réponse. En revanche, le débit de dose délivré qui influence la réponse de la tumeur est plus faible. Le fractionnement requiert également l'utilisation d'un anticorps non murin afin d'éviter toute réponse immunitaire lors des injections successives.

Les succès dans le traitement des tumeurs solides ont été très relatifs pour la RIT. Peu de réponses objectives ont été observées chez les patients. Pour ces types de cancers, il semble que le rationnel pour la RIT soit le traitement des micrométastases et des maladies résiduelles. Pour dépasser cet échec, il est envisagé d'associer la RIT à d'autres modalités de traitement et notamment la chimiothérapie. Des résultats pré-cliniques encourageants ont été obtenus [56]. Des études d'optimisation sont nécessaires afin de déterminer précisément comment administrer ces deux agents de la manière la plus efficace.

1.4.4 RIT- α :

L'utilisation de radionucléides émetteurs α est relativement récente dans l'histoire de la RIT. L'intérêt de cette modalité est suscité par les caractéristiques des particules α qui pourraient permettre de traiter certains cancers pour lesquels la RIT- β semble inefficace.

Les particules β ont un parcours relativement long dans les tissus (quelques millimètres à plusieurs centimètres) ce qui permet de penser qu'elles sont appropriées pour traiter de grosses tumeurs. Ce long parcours permet aussi de pallier, dans une certaine mesure, la non-uniformité de l'expression de l'antigène ciblé à la surface des cellules tumorales. Les cellules non ciblées pourront en effet être tuées par le passage de particules fixées à des cellules tumorales voisines (feu croisé). En revanche, les tissus sains proches de la tumeur vont également subir ce feu croisé et la spécificité de la RIT va s'en trouver diminuée.

Les particules α possèdent, elles, la particularité d'avoir des parcours très courts dans la matière (quelques dizaines de micromètres) et surtout une efficacité biologique relative beaucoup plus élevée que les β (i.e. à dose équivalente, les particules α seront beaucoup plus

toxiques que les particules β). Ces particules constitueront donc des armes thérapeutiques très sélectives et très efficaces, particulièrement indiquées dans le traitement des micrométastases ou des maladies résiduelles.

La liste des radioéléments émetteurs α potentiellement utilisable est plus restreinte que la liste des radioéléments émetteurs β . Leur production est surtout beaucoup plus difficile ce qui limite leur utilisation. Toutefois, le fort potentiel de la RIT- α a entraîné le développement de leur production et leur plus large distribution. La construction du cyclotron de haute énergie ARRONAX à Nantes qui va permettre la production d' ^{211}At est, dans ce contexte, une étape importante pour le développement de cette technique thérapeutique.

1.4.4.1 Caractéristiques radiologiques et radiobiologiques des particules α :

1.4.4.1.1 Caractéristiques radiologiques

Les particules α sont des noyaux d'hélium constitués de deux protons et deux neutrons. Il s'agit donc de particules chargées positivement (He^{2+}). Ces particules sont le produit de la désintégration de certains radionucléides de Z élevé (^{238}U , ^{226}Ra , ^{213}Po ...).

L'énergie de recul produite lors de cette désintégration va être élevée (100 à 200 keV) et va briser les liaisons carbone qui relient l'anticorps à l'atome radioactif dans le cadre de la RIT. L'élément-fils produit va donc être libre et pouvoir se diffuser dans les tissus. Cette caractéristique est un problème pour l'utilisation de radionucléides qui comportent un ou plusieurs émetteurs α parmi leurs éléments-fils (^{225}Ac , ^{211}At). Si la période de ces éléments-fils est longue, leur diffusion et leur tropisme pour certains organes sains peuvent entraîner une toxicité non négligeable dans la thyroïde, l'estomac et la voie urinaire par exemple.

Les particules possèdent une énergie inférieure à 10 MeV qu'elles déposent le long d'un parcours relativement court (quelques dizaines de micromètres). Ce parcours correspond à la traversée de moins de 10 cellules. Leur TEL est donc très élevé, en moyenne 100 keV/ μm . Ce TEL augmente lorsque l'énergie des particules α diminue au fil de leur parcours dans la matière.

1.4.4.1.2 Caractéristiques radiobiologiques

La forte cytotoxicité des particules α a été démontrée depuis longtemps [57] et a été jugée très vite prometteuse pour le développement de la RIT- α . Des études ont montré que seulement 1 à 4 traces de particules α dans le noyau d'une cellule pouvaient suffire à tuer celle-ci [58, 59]. Pour comparaison, l'inactivation d'une cellule nécessite plus de 20 000 traces de particules β dans le noyau de celle-ci.

Le TEL élevé est une des explications de cette forte cytotoxicité. Les particules α , utilisées en médecine nucléaire, ont, en effet, un TEL moyen de l'ordre de 100 keV/ μm , bien supérieur au TEL moyen des β : 0,2 keV/ μm . Cette valeur est proche de celle où la toxicité des rayonnements est la plus élevée [60]. La séparation moyenne entre deux événements ionisants (densité d'ionisation) correspondrait en effet au diamètre de la double hélice d'ADN, ce qui augmenterait la probabilité des cassures double brin (DSB : double strand-breaks en anglais). Les cassures double brin ne sont habituellement pas réparables par la cellule. La propension des particules α à provoquer des cassures double brin fait que leur action cytotoxique dépend peu du débit de dose au contraire des particules β . Cette propriété est intéressante dans le contexte de la RIT où les débits de dose ne sont pas très élevés. Les rayonnements de TEL élevé ont enfin un autre avantage, ils permettent de traiter aussi efficacement les populations cellulaires oxygènes ou hypoxiques [60].

Il a été montré qu'il existait également une réponse cellulaire à l'irradiation α . Les particules α provoquent l'apoptose chez certaines cellules et des arrêts en G2/M ou d'autres délais dans le cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages chromosomiques [61].

Les courbes de survie des cellules irradiées par des particules sont caractérisées par des exponentielles sans épaulement. Cette observation semble indiquer que la toxicité d'une irradiation α est reliée aux passages individuels de particules α dans le noyau et non pas à la combinaison des effets de dommages sublétaux induits par l'accumulation de passage de particules α dans le noyau. Le modèle de survie est donc linéaire et non pas linéaire quadratique comme pour les irradiations β (Figure 3).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (Uncompressed)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 3: Survie cellulaire représentée en fonction de la dose après une irradiation α (courbe de gauche) et après une irradiation β (courbe de droite) (d'après [59]).

Toutes ces caractéristiques font des particules α des particules très prometteuses dans le cadre de la thérapie. Les nombreuses études pré-cliniques ont confirmé ces avantages et plusieurs essais cliniques sont en cours pour confirmer ce potentiel.

1.4.4.2 Indications de la RIT- α

La géométrie et la taille des tumeurs sont des facteurs importants pour la sélection du type de rayonnement dans le cadre d'une application thérapeutique particulière. La proximité des cellules tumorales avec des tissus sains très radiosensibles est également un élément essentiel à prendre en compte. Lorsque la taille des tumeurs diminue, l'avantage potentiel des particules α sur les particules β grandit même si l'on ne prend pas en compte l'efficacité biologique relative. Humm [62] a comparé un émetteur α (^{211}At) et un émetteur β (^{90}Y) en calculant le rapport de leurs fractions absorbées pour des tumeurs de différentes tailles. Ce rapport est de 9 pour une tumeur de 1mm et de 33 pour une tumeur de 0,2 mm en faveur de

l'émetteur α . L'avantage en matière de spécificité de l'irradiation est indéniable : moins d'énergie de la particule α sera « gaspillée » en dehors de la tumeur. Humm a également montré qu'il faudrait 1000 fois plus de désintégrations surfaciques avec l' ^{90}Y pour atteindre la toxicité de l' ^{211}At pour une cellule isolée [63]. Les indications naturelles de la RIT- α semblent donc être les tumeurs caractérisées par des cellules libres flottantes dans la circulation (e.g. lymphomes) et les micrométastases. La RIT- α semble également appropriée pour traiter les cancers qui s'établissent sous la forme d'une fine couche à la surface des cavités (méningites néoplasiques, cancer ovarien). Le court parcours des particules α dans les tissus permet d'épargner les tissus sains situés autour de la cavité [64, 65]. L'injection intracavitaire est également intéressante car elle permet de délivrer rapidement ces émetteurs à la demi-vie habituellement assez courte. L'élimination de maladies résiduelles après chirurgie est également très étudiée [66].

La RIT- α a été étudiée pour de nombreux types de cancers sur des modèles animaux. Le premier essai pré-clinique encourageant fut l'utilisation d'un anticorps radiomarqué au ^{212}Bi pour une thérapie *in vivo* d'ascites de cellules T chez la souris [67]. De nombreux autres essais ont eu lieu pour traiter des modèles de cancer du poumon, de carcinome du colon, de neuroblastomes, de mélanomes, de rhabdomyosarcomes et de leucémies [68].

Les trois derniers essais chez la souris ont donné de bons résultats thérapeutiques et ont conduit à un essai clinique chez l'homme.

Le premier essai clinique de RIT- α a débuté en 1996. Le radioimmunoconjugué injecté était le $(^{213}\text{Bi})\text{CHX-}\alpha\text{-DTPA-HuM195}$ qui est spécifique de l'antigène CD33 de la leucémie myéloïde [69]. 9 patients (8 en rechute et 1 réfractaire) touchés par la leucémie aiguë myéloïde ont été traités avec 10,4, 15,5 ou 20,7 MBq/kg (0,28 ; 0,42 ; 0,56 mCi/kg) en trois ou six fractions sur 2 à 4 jours. En matière de toxicité, seul un épisode myélosuppressif transitoire a été observé chez 6 patients. 5 patients évaluable ont eu des réductions transitoires des cellules leucémiques dans le sang périphérique et 5 patients ont eu également une réduction du pourcentage de leurs blastes de leucémie dans la moelle osseuse. La dose maximale tolérée n'a pas été atteinte en raison de la disponibilité insuffisante et du coût important des générateurs $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$. À la suite de cette étude, les auteurs de cet essai clinique ont évalué que pour atteindre des rémissions complètes, le nombre de cellules à cibler était trop important par rapport au nombre d'anticorps radiomarqués injectés. Ils ont donc préconisé l'utilisation de ce traitement après une réduction partielle de la maladie par un premier traitement. Ils ont appliqué ce protocole thérapeutique dans un second essai clinique. Lors de cet essai de phase I/II, les patients ont d'abord été traités par chimiothérapie (cytarabine) pour permettre une réduction partielle des masses tumorales leucémiques puis ils ont reçu une injection de $^{213}\text{Bi-HuM195}$. Des réponses complètes ont été observées. La toxicité médullaire observée a été importante à l'activité injectée la plus élevée (myélosuppression prolongée) [70].

L'idée d'utiliser la RIT- α après un premier traitement a été reprise dans un autre essai clinique par l'équipe de l'université de Duke aux Etats-Unis. Un anticorps chimérique antitenascine radiomarqué à l' ^{211}At , a été injecté dans la cavité résultant de la résection de tumeurs cérébrales malignes (gliomes) [66]. Il s'agit du premier essai clinique utilisant l' ^{211}At . La dose maximale tolérée (Maximum Tolerated Dose : MTD) n'a été atteinte dans cet essai, ce qui indique que la très grande majorité des désintégrations ont eu lieu dans la cavité (96,7%). Une neurotoxicité de grade II a été observée chez 6 patients sur 18. Les médianes de survie observées chez les patients se sont révélées proches de celles qui sont observées lors d'un autre essai clinique avec le même anticorps radiomarqués à l' ^{131}I [34, 71] mais le traitement avec l' ^{211}At semble moins toxique.

D'autres essais cliniques ont également vu le jour récemment. En Australie, des essais cliniques de phase I et II de traitements par RIT- α de mélanomes secondaires sous-cutanés de

stade 4 ont mis en évidence une destruction des capillaires tumoraux par les particules α [72, 73]. En Suède, l'effet palliatif d'un traitement à base de ^{223}Ra a été montré chez des patients souffrant de métastases osseuses [74]. Enfin, un essai sur le lymphome est en cours à Düsseldorf [66].

1.4.4.3 Les différents émetteurs α

Il existe approximativement 100 radionucléides (la majorité ayant un numéro atomique, Z, supérieur à 82) qui se désintègrent en émettant des particules α . La majorité des émetteurs α est produite par purification isotopique de déchets nucléaires civils. Ils sont ensuite incorporés dans un générateur et peuvent être élués. Des émetteurs produits par cyclotron sont également disponibles [75].

Différents critères [76, 45] peuvent être retenus pour choisir un radionucléide :

- 1) la disponibilité dans un contexte académique ou commercial,
- 2) le processus chimique permettant leur couplage à un anticorps : il doit être compatible avec leurs propriétés physiques (e.g. pour le ^{213}Bi , l'éluion, la purification et le couplage doivent être très rapides pour préserver une activité suffisante),
- 3) la biodistribution du radionucléide libre dans les tissus biologiques (^{211}At est par exemple relargué beaucoup plus rapidement de la cellule que le ^{213}Bi et peut s'accumuler dans certains organes)
- 4) la stabilité *in vivo* : le ^{213}Bi a un couplage stable, celui de ^{211}At doit être amélioré (une fois libre, on observe une accumulation de ^{211}At dans l'estomac, la thyroïde, les poumons) [46].
- 5) la chaîne de décroissance : il existe un problème de stabilité du couplage pour les éléments-fils. L'énergie de recul communiquée au noyau lors de la première désintégration α est suffisante pour briser la liaison chimique qui lie le radionucléide fils à l'anticorps. En outre, les éléments-fils sont souvent chimiquement différents de l'élément père. Une demi-vie courte de l'élément-fils est souhaitable pour éviter sa diffusion loin de la cellule tumorale. Le ^{225}Ac ne peut ainsi être utilisé que s'il est internalisé [77].
- 6) la fraction des désintégrations qui produit une particule α doit être élevée et l'absence d'émissions de particules β est un avantage. Des émissions gamma permettent d'obtenir des images.
- 7) La demi-vie du radionucléide doit être compatible avec la dynamique de la localisation de la tumeur et de la rétention de la molécule porteuse.

Voici une liste des principaux émetteurs α utilisés lors d'études pré-cliniques ou d'essais cliniques chez l'homme [68]. Les chaînes de désintégration de ces divers radioéléments ont été reproduites en annexe.

^{212}Bi : $T_{1/2}$: 60,6 min

Sa demi-vie limite son utilisation à des cas où une localisation rapide de la tumeur peut être réalisée. Les injections intraveineuses avec un anticorps monoclonal semblent irréalistes. Des générateurs $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Bi}$ sont disponibles.

^{212}Pb $T_{1/2}$: 10,6 h

Il peut être produit avec le générateur $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$. Le problème du ^{212}Pb est qu'il a tendance à détruire le chélate qui le relie à l'anticorps dans sa chaîne de désintégration.

^{213}Bi $T_{1/2}$: 45,6 min

Ce radionucléide est disponible sous la forme d'un générateur $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$. Ce générateur peut produire du ^{213}Bi pendant 10 jours. Les activités spécifiques obtenues sont comprises entre 370-925 MBq/mg (10-25 mCi/mg). On trouve dans les données nucléaires une émission photonique à 440 keV permettant de faire des images avec une gamma caméra (Figure 4).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 4: Image planaire postérieure d'un patient après chaque injection de ^{213}Bi -HuM195 d'une série de 4 (d'après [69]).

^{211}At : $T_{1/2}$: 7,2h

C'est l'émetteur α le plus prometteur en raison notamment de sa demi-vie. L'imagerie est possible. Au cours de sa décroissance, l' ^{211}At émet, en effet, différents photons dont l'énergie est comprise entre 77 keV et 90 keV (25 %). Un élément fils, le ^{207}Bi , émet, lui, des photons compris entre 73 keV et 75 keV (58 %) et entre 500 keV et 1,1 MeV (1,72 photons par désintégration). La disponibilité de l' ^{211}At est réduite car on a besoin d'un cyclotron de moyenne énergie avec un faisceau de particules α pour le produire. Pour l'obtenir, on bombarde une cible de métal (^{209}Bi) et on le récupère ensuite par distillation sèche. Le produit fils ^{207}Bi a une demi-vie de 33,4 ans. Ceci n'est pas vraiment problématique car l'activité de ^{207}Bi générée à partir de 37MBq (1mCi) d' ^{211}At est 0.033 MBq (0.0009 mCi) [78].

^{223}Ra $T_{1/2}$: 11,4 j

Il est disponible sous la forme d'un générateur $^{227}\text{Ac}/^{223}\text{Ra}$. Il comporte 4 émissions α dans sa chaîne de désintégration. Plusieurs photons gamma avec des énergies autour de 90 keV (52%) et de 270 keV (14%) sont émis par le ^{223}Ra ce qui rend l'imagerie possible [74] (Figure 5).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 5: Scintigraphies au ^{99m}Tc -MDP (haut) et au ^{223}Ra (bas) chez un patient avec des métastases osseuses (d'après [74]).

^{225}Ac $T_{1/2}$: 10 j

Il s'agit également d'un radionucléide très prometteur. Il comporte 6 radionucléides fils dans sa chaîne de désintégrations jusqu'au ^{209}Bi qui est stable. Pour chaque désintégration du ^{225}Ac , 5 particules α et 3 particules β sont émises. Toutefois, il est difficile de trouver un chélate résistant à l'énergie de recul (100 à 200 keV : cette énergie correspond à l'énergie de liaison d'un complexe macrocyclique metal-ion) et la stabilité est donc impossible à assurer.

^{255}Fm (Fermium) $T_{1/2}$: 20,1 h

Il émet une particule α de 7,02 MeV (93,4%) jusqu'au californium-251 qui a une demi-vie de 900 ans. Il peut être produit à partir d'un générateur d'einsteinium-255.

^{149}Tb $T_{1/2}$: 4 h

Il se désintègre en émettant un alpha (17%), un positon (4%) et par une capture électronique (79%). Le nombre de particules α produites par désintégration est un peu faible pour envisager son utilisation en thérapie.

1.4.4.4 Limitations et Optimisations de la RIT- α

La forte cytotoxicité des particules α a pour conséquence qu'un à quatre passages de ces particules dans le noyau d'une cellule peuvent suffire à la tuer. Contrairement à la RIT- β , des

anticorps radiomarqués avec des émetteurs α peuvent donc tuer des cellules isolées sans besoin de feu croisé. Le court parcours des particules α entraînera, en outre, une grande spécificité de l'irradiation : les tissus sains environnants seront épargnés. Comme nous l'avons précisé dans la partie précédente, la RIT- α offre donc une opportunité thérapeutique jusqu'alors peu accessible aux traitements de radiothérapie : le traitement de maladies résiduelles, de micrométastases, de cellules tumorales circulantes.

Cette élimination des cellules tumorales, une à une, va avoir pour conséquence une grande sensibilité de cette technique par rapport à certains paramètres. La fenêtre thérapeutique sera très étroite.

Le succès d'un traitement de RIT- α va, dans ce contexte, dépendre de:

- la variation intra- et inter-individuelle de l'expression antigénique à la surface des cellules tumorales. Celle-ci ne pourra pas, en effet, être compensée par un feu croisé important comme dans le cas de la RIT- β ,
- la quantité de cellules tumorales à éliminer,
- la radiosensibilité des cellules tumorales (qui peut être modifiée en raison de traitements antérieurs à la RIT).

On considère que, pour obtenir une rémission complète, 99,9% des cellules tumorales doivent être éliminées [69]. Si seulement 1% des cellules tumorales isolées ne présentent pas d'antigènes à leur surface, le traitement va échouer ou tout au moins ne pas conduire à une rémission complète.

La variation inter-individuelle de cette présence antigénique à la surface des cellules va entraîner d'autres limitations. Face à cette fenêtre thérapeutique très étroite, il va falloir déterminer très précisément l'activité qui doit être injecté pour chaque patient afin d'augmenter les chances de succès du traitement. L'imagerie pré-thérapeutique ne nous fournira que peu d'informations ; la résolution des appareils actuels ne va pas nous permettre de caractériser précisément la quantité de cellules tumorales et surtout la fixation effective de l'anticorps radiomarqué sur ces cellules. Des biopsies ou des prélèvements de sang seront beaucoup plus efficaces. Une fois connus ces paramètres, la dosimétrie sera essentielle pour ajuster la quantité d'anticorps à injecter suivant l'activité spécifique des anticorps radiomarqués. Elle permettra en effet d'évaluer l'efficacité potentielle du traitement en regard d'une toxicité à la moelle ou à tout autre organe sain supportable. La radiosensibilité des cellules tumorales, potentiellement appréciables par des études *in vitro* sera également un paramètre d'ajustement important dans ce processus.

La demi-vie relativement courte des émetteurs α envisagés (^{213}Bi , ^{211}At) limite grandement la quantité d'atomes radioactifs que l'on peut injecter. Par ailleurs, l'activité spécifique que l'on peut atteindre est encore relativement limitée (1 anticorps sur 2700 est marqué) [69]. Si l'on considère une cellule comportant 10000 sites de fixation [69], on verra que l'on pourra dans un cas idéal ne fixer que 3 ou 4 atomes radioactifs à chaque cellule. Si ces anticorps ne sont pas internalisés, moins d'une particule α traversera, en moyenne, le noyau de la cellule. C'est insuffisant pour tuer la cellule. Plusieurs voies doivent donc être explorées :

- cibler des antigènes présents en très grand nombre sur les cellules tumorales [79],
- augmenter l'activité spécifique [79, 45].

Les optimisations envisagées dans le cas de la RIT- β peuvent également être reprises dans le cadre de la RIT- α . L'utilisation de fragments d'anticorps peut permettre une meilleure distribution de ceux-ci dans les micrométastases ou tumeurs plus grosses et ainsi augmenter les chances de contrôler les tumeurs. Ce progrès pourrait permettre d'envisager l'utilisation de la RIT- α dans les traitements de tumeurs solides. Le pre-targeting peut également être envisagé. Une étude a, toutefois, montré que l'administration en plusieurs étapes de

l'anticorps et d'une petite molécule radiomarquée (« l'effecteur »), souvent un peptide, pouvait augmenter fortement la dose délivrée aux reins lors de l'élimination des effecteurs non fixés par la tumeur [80]. L'utilisation d'une combinaison d'un traitement de RIT- α avec un traitement de chimiothérapie peut être envisagée selon deux visions différentes. Un traitement préalable de chimiothérapie peut réduire de façon importante la quantité de cellules tumorales afin d'augmenter la probabilité de succès de la RIT- α administrée dans un second temps [69]. Une synergie entre les deux traitements peut également être envisagée afin d'augmenter l'efficacité intrinsèque des deux traitements. Cet effet a été démontré *in vitro* [56]. Cette dernière option implique des études complexes pour déterminer le protocole optimal d'administration de ces deux types de thérapie. Enfin, l'utilisation de ^{225}Ac au lieu du ^{213}Bi et de ^{211}At semble très prometteuse [77] en raison de sa période plus longue (10 jours) et la production de 4 particules α par désintégration.

Pour finir, une question plus générale se pose quant à l'utilisation de la RIT- α :

Est ce qu'une application clinique large des émetteurs α est techniquement et économiquement faisable à des doses thérapeutiques ?

Le problème de la disponibilité des émetteurs α ne doit pas être occulté. Lors du premier essai clinique de RIT- α , les doses maximales tolérables n'ont ainsi pas été atteintes en raison du manque de disponibilité et du coût des générateurs $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ [69]. La construction de cyclotrons pouvant produire des émetteurs α , sur le modèle du cyclotron ARRONAX, qui sera en fonctionnement fin 2008 à Nantes, pourrait permettre de résoudre ce problème.

1.5 Conclusion:

La radioimmunothérapie est une stratégie thérapeutique dans le traitement des cancers qui utilise des anticorps monoclonaux couplés à des émetteurs radioactifs. Ces anticorps sont spécifiques d'antigènes ou d'autres récepteurs présents à la surface de cellules tumorales. La radioactivité est donc vectorisée vers les cellules tumorales. La toxicité des particules émises permet alors de tuer les cellules tumorales. Le but de cette modalité thérapeutique est de pouvoir traiter de manière spécifique des cancers disséminés ou difficilement contrôlables par d'autres techniques. Plus précisément, l'objectif est de délivrer une dose maximale aux cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains afin de limiter les effets secondaires.

Le développement et la mise au point de la RIT est complexe car elle nécessite notamment la collaboration de nombreuses disciplines : immunologie pour la recherche d'antigènes spécifiques présentés par les cellules tumorales et la production d'anticorps correspondants, chimie pour la fabrication des radioimmunoconjugués, biologie pour bien comprendre l'action des rayonnements sur les cellules, la physique pour le choix des radionucléides et l'évaluation dosimétrique d'un traitement et enfin la médecine pour les études cliniques.

Étudiée et mise au point depuis environ trente ans, la RIT est désormais reconnue depuis l'autorisation de mise sur le marché de deux agents thérapeutiques : le ZevalinTM et le BexxarTM indiqués dans le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens. Il s'agit de traitements de RIT- β utilisant deux radionucléides différents : ^{90}Y et ^{131}I . Les nombreux essais cliniques, qui ont précédé leur mise sur le marché, ont montré que la RIT pouvait permettre d'obtenir des réponses durables et importantes, même après des rechutes suivant des traitements de chimiothérapie.

La toxicité observée de ces modalités de traitements de cancers hématologiques a été une toxicité myéloïdique importante nécessitant dans certains cas des greffes autologues de cellules de la moelle. À long terme, la RIT ne semble pas plus toxique que des traitements de chimiothérapie utilisés pour les mêmes indications. Diverses optimisations, notamment pour limiter cette toxicité, sont étudiées. Le pré-ciblage, qui consiste à administrer l'anticorps et le

radionucléide en plusieurs étapes, semble particulièrement prometteur. La protection des organes sains par des agents chimiques est également envisagée. Enfin la combinaison de la RIT avec des traitements de chimiothérapie a déjà montré son efficacité *in vitro*.

Plus récemment, les émetteurs α ont été étudiés dans le cadre de la RIT. Les particules α ont un court parcours dans la matière, ce qui entraîne une grande spécificité de l'irradiation. Elles sont en outre très cytotoxiques. Cette dernière propriété permet d'envisager leur utilisation pour éliminer des cellules tumorales isolées puisqu'il est possible dans certaines conditions de fixer suffisamment d'atomes radioactifs à une cellule pour que la dose auto-absorbée soit létale pour celle-ci. La RIT- α semble donc particulièrement indiquée dans le traitement de micrométastases ou de maladies résiduelles. Les premiers essais cliniques réalisés ont montré des résultats intéressants notamment dans le cadre d'injections intra-cavitaires. Les essais cliniques pour des cancers disséminés ont montré que certaines optimisations restaient nécessaires. La taille très restreinte des cibles tumorales empêche de bien comprendre les raisons des échecs de certains traitements grâce aux techniques d'imagerie habituellement utilisées. Nous pensons qu'une meilleure connaissance de la distribution des anticorps au niveau des cellules tumorales accompagnée d'une modélisation dosimétrique au niveau cellulaire pourrait permettre de mieux évaluer le réel potentiel de la RIT- α . Il s'agit d'un des objectifs de ce travail de thèse.

2 Dosimétrie

2.1 Quelques généralités et formalisme du MIRD :

La dosimétrie interne des radionucléides s'est développée dès 1920 dans le domaine de la radioprotection. La méthode de Marinelli présentée en 1949 [81] a été développée par Loevinger pour aboutir au formalisme actuel du Comité Medical Internal Radiation Dose (MIRD) en 1968 [82]. Ce formalisme a été publié sous forme de rapports (pamphlets). Un ouvrage de référence sur la méthode a été publié en 1988 [83] et révisé en 1991 [84]. Le formalisme actuel de la CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique) [85] est équivalent à celui du MIRD. Seuls les termes varient.

Le formalisme du MIRD [84] permet de calculer la dose moyenne dans une région cible à partir d'une irradiation venant d'une région source. Ce formalisme utilise plusieurs quantités données dans le tableau 1 avec le nom et l'unité de chaque symbole [86].

Tableau 1: Quantités et unités utilisées en microdosimétrie (d'après [86]).

2.1.1 Définition de la dose absorbée :

La dose absorbée moyenne, \bar{D} , dans une région cible k correspond à la quantité d'énergie E déposée dans cette région par les rayonnements ionisants émis par une ou plusieurs régions sources, par unité de masse m_k de la région cible k :

$$\bar{D}_k = \frac{E}{m_k} \quad (1-1)$$

\bar{D}_k s'exprime en gray (Gy). 1 Gray correspond à 1 joule.kg⁻¹.

2.1.2 Fraction absorbée et fraction absorbée massique :

Le point de départ du formalisme réside dans l'adoption du concept de la fraction absorbée, introduit par Ellett [87].

Soit une région source r_h émettant un rayonnement monoénergétique d'énergie initiale E_0 dans un milieu isotrope et E l'énergie absorbée dans une région cible r_k , la fraction absorbée $\phi(r_k \leftarrow r_h)$ est définie comme :

$$\phi(r_k \leftarrow r_h) = \frac{E}{E_0} \quad (1-2)$$

La fraction absorbée $\phi(r_k \leftarrow r_h)$ est une grandeur sans dimension. Si l'on divise $\phi(r_k \leftarrow r_h)$ par la masse m_k de la région cible, on obtient la fraction absorbée massique $\Phi(r_k \leftarrow r_h)$ exprimée en kg⁻¹.

$$\Phi(r_k \leftarrow r_h) = \frac{\phi(r_k \leftarrow r_h)}{m_k} \quad (1-3)$$

2.1.3 Énergie moyenne par transition nucléaire

L'énergie moyenne émise par transition nucléaire, Δ_i , permet de tenir compte des différents types de rayonnements émis lors d'une désintégration. Soit n_i le nombre de particules de type i émis par désintégration et E_i l'énergie moyenne par particule de type i, Δ_i s'écrit alors :

$$\Delta_i = n_i . E_i \quad (1-4)$$

L'énergie totale émise par désintégration, Δ , est alors :

$$\Delta = \sum_i \Delta_i = \sum_i n_i . E_i \quad (1-5)$$

Δ et Δ_i s'expriment en J.Bq⁻¹.s⁻¹.

2.1.4 Activité cumulée

L'irradiation, après une administration interne de radioéléments, se déroule sur une durée non négligeable. Il est nécessaire de considérer l'activité cumulée \tilde{A}_{r_h} , exprimée en Bq.s et qui correspond au nombre total de désintégrations survenues dans une source r_h , pendant l'intervalle de temps considéré. L'activité cumulée, \tilde{A}_{r_h} , se calcule en intégrant l'activité présente dans la source au cours du temps :

$$\tilde{A}_{r_h} = \int_0^t A_{r_h}(t) dt \quad (1-6)$$

Dans le cas de la radiothérapie vectorisée, t est souvent considéré comme suffisamment long pour pouvoir intégrer toutes les désintégrations émanant de la radioactivité présente lors du traitement.

2.1.5 Dose absorbée

La dose moyenne \bar{D} , exprimée en Gy, absorbée par la région cible r_k , est donnée par l'expression :

$$\bar{D}(r_k \leftarrow r_h) = \tilde{A}_{r_h} \sum_i \Delta_i \Phi_i(r_k \leftarrow r_h) \quad (1-7)$$

2.1.6 Facteur S et SEE

Le rapport N°11 du MIRD [88] propose une expression simplifiée de cette équation en introduisant le concept de facteur S qui correspond à la dose moyenne par unité d'activité cumulée. Le facteur S ($\text{Gy} \cdot \text{Bq}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est défini pour un couple de régions source-cible et un radionucléide donnés tel que :

$$S(r_k \leftarrow r_h) = \sum_i \Delta_i \Phi_i(r_k \leftarrow r_h) \quad (1-8)$$

En utilisant cette notation, l'équation 1-7 devient :

$$\bar{D}(r_k \leftarrow r_h) = \tilde{A}_{r_h} S(r_k \leftarrow r_h) \quad (1-9)$$

Dans le cas général où une région cible r_k est irradiée par plusieurs régions sources r_h , alors la dose absorbée dans la région r_k est :

$$\bar{D}(r_k \leftarrow r_h) = \sum_h \tilde{A}_{r_h} S(r_k \leftarrow r_h) \quad (1-10)$$

L'expression équivalente au facteur S selon le formalisme de la CIPR est la SEE (Specific Effective Energy) :

$$SEE(r_k \leftarrow r_h) = \sum_i \Delta_i \Phi_i(r_k \leftarrow r_h) Q_i \quad (1-11)$$

où Q_i est le facteur de pondération lié à la qualité des rayonnements i . Ce facteur est égal à 1 pour les photons et les électrons et est égal à 20 pour les particules α .

2.1.7 Conclusion

Selon le formalisme du MIRD détaillé ci-dessus, la dose absorbée dans une région cible est le produit de deux grandeurs :

- le facteur S qui dépend de la géométrie du problème et du radionucléide,
- l'activité cumulée \tilde{A}_{r_s} , ou le nombre de désintégrations radioactives ayant eu lieu dans la région source r_h .

La grande puissance du MIRD repose dans sa simplicité et son côté très général. L'équation 10 établit une séparation claire entre les aspects physiques du calcul de dose (contenus dans la valeur du facteur S) et les aspects temporels du calcul de dose (contenus dans la valeur de l'activité cumulée). L'activité cumulée dépend de la cinétique biologique du radionucléide mais également de la décroissance physique du radionucléide. Le calcul du facteur S prend lui en compte toutes les hypothèses physiques du modèle, ainsi que les rayonnements émis par le radionucléide et les dépôts d'énergie dans les composants du modèle.

Dans cette équation générale du MIRD, aucune hypothèse n'est faite sur la composition et la géométrie des régions source ou cible. Les facteurs S peuvent être calculés pour tous les modèles géométriques de source ou de cible. Les données biocinétiques, nécessaires pour le calcul de l'activité cumulée, doivent être obtenues avec le degré de détail requis par le modèle physique.

2.2 Détermination des facteurs S :

Selon le formalisme du MIRD, la détermination des facteurs S est nécessaire pour le calcul de la dose absorbée. Comme on l'a vu précédemment, le facteur S contient les grandeurs physiques indépendantes du temps, c'est-à-dire les caractéristiques de dépôt d'énergie de différentes particules émises par le radionucléides pour une géométrie et un milieu donnés.

Le calcul des facteurs S (Equation 1-8) va dépendre des hypothèses physiques du modèle utilisé. Plusieurs moyens sont disponibles pour obtenir ces facteurs S pour tous les radionucléides d'intérêt en médecine nucléaire et pour différentes échelles spatiales de calcul.

Les facteurs S peuvent être calculés par des méthodes analytiques ou pseudo-analytiques et des méthodes stochastiques en utilisant des modèles dosimétriques standards ou personnalisés. Ces valeurs sont également disponibles sous la forme de tables pour un grand nombre de radionucléides et de combinaisons géométriques qui vont de la sphère à des modèles plus complexes (mathématiques ou voxelisés).

2.2.1 Modèles analytiques :

Historiquement, les premières méthodes de calcul en dosimétrie étaient analytiques. Avec le développement des méthodes de calcul Monte-Carlo et Point-kernel (qui est une méthode basée sur un calcul Monte-Carlo initial), celles-ci ont été globalement abandonnées en raison de leur imprécision. À l'échelle de la cellule, les résultats fournis par les méthodes analytiques restent relativement précis. Cette méthode a été notamment utilisée pour établir les tables de facteurs S cellulaires publiés par le MIRD pour les électrons et les particules α . Pour ces dernières, les méthodes analytiques sont particulièrement adaptées puisque les particules

voyagent dans la matière quasiment en ligne droite et l'énergie déposée par les électrons secondaires est *a priori* négligeable par rapport à l'énergie déposée par la particule α primaire. Le modèle microdosimétrique que nous avons implémenté au cours de ce travail de thèse est basé sur une méthode de calcul analytique. Les détails de cette méthode seront donnés dans le chapitre III.

2.2.2 Calcul Monte-Carlo :

La méthode Monte-Carlo est employée pour résoudre, par un artifice statistique, tout type de problèmes complexes pour lesquels les approches traditionnelles analytiques ou numériques s'avèrent insuffisantes. Pour utiliser une méthode Monte-Carlo, le problème doit être reformulé en termes de probabilités. Les processus stochastiques considérés sont alors décrits par des lois de probabilité échantillonnées à partir de nombres aléatoires équidistribués issus d'un générateur. L'incertitude du calcul est liée au nombre de tirages de nombres aléatoires. Ce principe lui a valu son nom, par analogie avec le caractère aléatoire de la roulette du Casino de Monte-Carlo.

La méthode Monte-Carlo, apparue dès les années 40, constitue aujourd'hui l'outil de base des statisticiens. Elle est utilisée dans de nombreux domaines pour simuler les phénomènes obéissant à des lois statistiques. Le transport des particules dans la matière étant par nature stochastique, il est aisé de lui trouver un équivalent exploitable : chaque "histoire" correspond au suivi de la cascade de particules engendrée par une particule primaire. Les variables aléatoires sont les paramètres d'interaction (nature de l'interaction, type de particule créée, transfert d'énergie, etc...). Les distributions de probabilité correspondent, quant à elles, aux différentes sections efficaces d'interaction. Le développement particulièrement important de la simulation du transport des particules par la méthode Monte-Carlo est dû, d'une part, à l'essor de la physique quantique qui a permis de calculer les sections efficaces d'interaction des particules avec la matière, et d'autre part, à l'accroissement des performances des ordinateurs.

En 1963, Berger [118] présente dans un article les principes de la méthode Monte-Carlo et les premières applications dans le domaine de la physique médicale. Depuis, l'utilisation de la méthode Monte-Carlo dans ce domaine s'est largement généralisée [119, 120, 121, 122]. De nombreux codes Monte-Carlo ont été développés tels que les codes MCNP(X) (Monte-Carlo N-Particles) [123], EGS4 (Electron-Gamma Shower) [91], GEANT4 [124], PENELOPE (PENetration and Energy LOSS of Positrons and Electrons) [125], etc...

Ce mode de calcul permet de prendre en compte un très grand nombre de paramètres géométriques (géométries complexes, hétérogénéité des matériaux) et physiques (génération des particules secondaires, prise en compte de la nature stochastique des événements des dépôts d'énergie). Il est l'outil le plus précis pour la détermination des facteurs S à toutes les échelles.

2.2.3 Calcul Point-Kernel :

Un dose point-kernel (DPK) représente la distribution radiale de la dose absorbée autour d'un point source isotrope de rayonnement dans un milieu infini homogène (habituellement de l'eau) (Figure 6). Les DPKs ont été, en premier lieu, calculés pour des électrons monoénergétiques par Spencer, qui a utilisé une solution numérique de l'équation de transport [103, 104]. Le développement du code Monte-Carlo ETRAN au début des années 70 a été un tournant dans la dosimétrie des électrons. Avec ce code, Berger [105] a recalculé des DPKs et obtenu des résultats plus en accord avec les données expérimentales que ceux de Spencer. Depuis, des DPKs ont été calculés avec une version améliorée d'ETRAN [106], et avec les codes Monte-Carlo EGS4 [107], ACCEPT [108], EGSnrc [109], MCNPX et Geant4 [110], NOREC [111].

Pour des radionucléides qui émettent également des photons, la contribution des photons à la dose doit être prise en compte. Pour calculer les DPKs photon, la méthode publiée dans le pamphlet MIRD n°2 est habituellement utilisée [112]. Des DPKs photons ont été générés par le code Monte-Carlo EGS4 [111] pour 14 radionucléides en milieu aqueux (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , $^{117\text{m}}\text{Sn}$ et $^{99\text{m}}\text{Tc}$) et pour des photons monoénergétiques [113].

Pour des particules monoénergétiques ou pour des spectres d'émission pour un radionucléide spécifique, le DPK, nous l'avons dit, représente la dose moyenne absorbée à une distance radiale donnée par transition nucléaire pour un point source isotrope localisé dans un milieu homogène et infini. Si l'on considère l'activité dans une source comme une grille en 3 dimensions de points source, la dose absorbée en un point cible correspondra à la superposition des contributions de tous les points source entourant ce point cible [114]. Cette superposition correspond, si on la formalise mathématiquement, à une convolution. Des méthodes numériques (Fast Fourier transform ou Fast Hartley transform) permettent de réaliser ces convolutions dans un temps raisonnable [115, 116, 117]. Cette méthode de calcul dosimétrique est applicable à n'importe quelle échelle. Il faudra cependant veiller à ce que le pas d'échantillonnage utilisé pour les courbes de DPKs soit en accord avec les dimensions de la cible considérée.

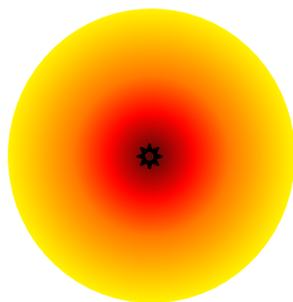


Figure 6 : Représentation du DPK de l' ^{131}I dans l'eau. Le calcul a été effectué avec le code Monte-Carlo MCNPX. Les zones en rouge représentent les zones où les dépôts d'énergie sont les plus importants.

Cette méthode est relativement simple à implémenter et s'avère très intéressante en raison de ses temps de calculs très faibles. Sa principale limitation est due à l'hypothèse d'un milieu infini et homogène. La densité des tissus humains est variable, particulièrement lorsque l'on étudie les zones des poumons ou des os. Dans ces cas là, le calcul point-kernel conduit à des erreurs importantes sur la valeur de la dose [100, 101].

2.2.4 Tables du MIRD :

Suite à l'édition des principes et schéma du MIRD, des calculs ont permis la détermination de valeurs de facteurs S à l'échelle de l'organe, du tissu ou de la cellule. Nous l'avons rappelé, la valeur d'un facteur S dépend, entre autres, de la géométrie de l'irradiation. Pour que ces tables de facteurs S soient utilisables dans un grand nombre de cas, les calculs ont été réalisés pour des modèles, représentant une moyenne des cas rencontrés. Les calculs pour les facteurs S à l'échelle des organes humains ont ainsi été réalisés pour un fantôme

anthropomorphique (homme de référence : Reference Man), représentant un homme de 1m70 et 70 kg, qui à l'époque représentait la taille et le poids moyens des hommes occidentaux [89].



Figure 7: Fantôme anthropomorphique de Cristy et Eckerman (gauche) et fantôme anthropomorphique en développement (droite)

Trois séries principales de tables ont ainsi été publiées par le comité MIRD. Chaque table correspond à une échelle différente, de l'organe à la cellule.

- les tables du MIRD pamphlet 11 [88] ont été éditées en 1975. Les calculs des facteurs S ont été réalisés pour l'homme de référence, un fantôme anthropomorphique [89], avec le code Monte-Carlo ALGAM. Toutefois, les masses des différents organes du corps humain varient beaucoup entre les individus. On sait que la dose est définie comme le rapport de l'énergie déposée dans un volume sur la masse de ce volume. Ce dernier facteur va donc avoir une influence importante sur la valeur de la dose. Dans le pamphlet 11 [88], une méthode de correction des facteurs S a donc été proposée pour prendre en compte la valeur de la masse des organes :

$$S(\text{organe du patient} \leftarrow \text{organe du patient}) = \frac{m_{\text{organe du modèle}}}{m_{\text{organe du patient}}} * S(\text{organe du modèle} \leftarrow \text{organe du modèle})$$

Ces tables sont encore très utilisées notamment lors d'essais cliniques puisqu'elles sont à la base du logiciel Olinda [90], largement distribué dans le monde. Une nouvelle série de tables calculées pour un modèle anthropomorphique plus réaliste (Figure 7) doit être publiée au cours de l'année 2008 [91].

- les tables du MIRD pamphlet 17 [92] ont été publiées en 1999 pour des voxels cubiques de 3 et 6 mm pour 5 radionucléides (^{32}P , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{131}I) et pour des voxels de 0,1 mm pour ^{131}I . Les voxels sont des parallélépipèdes rectangle ou des cubes qui constituent l'élément de base d'une image.

En sus de ces tables calculées pour un nombre limité de radionucléides, cet article explique dans les détails la méthode d'obtention de facteurs S pour les voxels. Un facteur S voxel est défini comme la dose moyenne absorbée par un voxel cible par désintégration dans un voxel source, les deux voxels étant contenus dans un milieu tissulaire infini homogène. Pour chaque distance séparant les deux voxels, les valeurs des S facteurs voxel ont été déterminées par le

code EGS4 [93], en utilisant les algorithmes PRESTA. Les calculs ont été réalisés pour des électrons et des photons monoénergétiques. Une somme pondérée des contributions des différentes particules émises lors d'une désintégration est effectuée pour obtenir le facteur S pour un radionucléide. Les tables de données de désintégrations nucléaires utilisées sont celles d'Eckerman [94]. Le matériau considéré est basé sur la composition des tissus mous du modèle mathématique du fantôme anthropomorphique de Cristy et Eckerman [95].

La dose dans le voxel cible, $voxel_k$, est finalement obtenue en additionnant les facteurs S tabulés en utilisant l'équation :

$$D(voxel_k) = \sum_0^n \tilde{A}_{voxel_h} * S(voxel_k \leftarrow voxel_h) \quad (1-12)$$

- les tables de facteurs S pour des cellules ont été publiées en 1997 par le comité du MIRD [94]. Ces tables fournissent les facteurs S pour le noyau ou la cellule entière pour des électrons ou des particules α monoénergétiques mais aussi pour 260 radionucléides émetteurs β^- ou α . Différentes tailles de cellules sont considérées : de 3 μm à 10 μm (avec des rayons cellulaires compris entre 2 μm et 9 μm).

L'activité est distribuée uniformément à l'intérieur de compartiments source qui peuvent être le noyau, le cytoplasme, la membrane cellulaire ou la cellule entière. Dans le modèle de calcul utilisé, la cellule est représentée sous la forme de deux sphères concentriques (cellule entière et son noyau) homogènes de densité 1 g.cm^{-3} . Pour les électrons et les particules α , la méthode de calcul repose sur l'utilisation de facteurs géométriques [96, 97] et du pouvoir d'arrêt défini par Cole [98] pour les particules β et du pouvoir d'arrêt publié par l'ICRU pour les particules α [99]. Les facteurs géométriques représentent la probabilité moyenne qu'un vecteur de longueur x et de direction choisie au hasard et dont l'origine est choisie au hasard dans la région source intercepte la région cible. La fraction absorbée pour des rayonnements particuliers peut, dès lors, être écrite ainsi :

$$\phi_i(r_k \leftarrow r_h) = \int_0^{\infty} \Psi_{r_k \leftarrow r_h}(x) \frac{1}{E_i} \frac{dE}{dX} \Big|_{X(E_i)-x} dx \quad (1-13)$$

où E_i est l'énergie initiale de la $i^{\text{ème}}$ particule, $\Psi_{r_k \leftarrow r_h}(x)$ est le facteur géométrique correspondant à la géométrie source-cible et $\frac{dE}{dX} \Big|_{X(E_i)-x}$ est le pouvoir d'arrêt évalué à

$X(E_i)-x$, le parcours résiduel de la particule d'énergie initiale E_i (qui a déjà parcouru une distance x dans le milieu). La fraction absorbée est ensuite intégrée dans l'équation 1-8 pour déterminer le facteur S correspondant.

On le voit, un grand nombre de tables de facteurs S sont disponibles pour la dosimétrie à différentes échelles. Il faut, toutefois, toujours bien connaître et garder à l'esprit les limites de ces valeurs liées aux hypothèses et aux méthodes de calcul.

À l'échelle des organes, les facteurs S ont été tabulés pour un fantôme. On pourra lors d'une dosimétrie patient-spécifique noter des écarts avec les valeurs tabulées. La correction de masse permet de personnaliser un peu le modèle et les résultats sont alors très proches des résultats obtenus par un calcul Monte-Carlo direct [100] pour des doses auto-absorbées (self-

dose). En revanche pour la dose résultant du feu croisé (cross-dose), qui va dépendre entre autres, de la distance séparant l'organe source de l'organe cible, les facteurs S tabulés seront différents des facteurs S correspondant aux patients. Des différences allant jusqu'à 100% ont été mises en évidence [100].

Les données disponibles pour les voxels sont encore relativement limitées (5 radionucléides) même si d'autres publications du MIRD sont prévues à ce sujet en 2008 [91]. En outre, ces facteurs S ont été déterminés pour un milieu homogène infini (composition : tissus mous). Pour des radionucléides aux parcours relativement courts, cette approximation peut être acceptable dans certaines zones du corps humain. En revanche, si l'on s'intéresse à des zones proches de zones osseuses, par exemple, les valeurs utilisées seront alors peu pertinentes [101].

La dosimétrie cellulaire est moins sujette à ce problème d'homogénéité de matériau des différents compartiments puisque l'on considère généralement, en première approximation, que les cellules ne sont composées que d'eau. Les tables de facteurs S sont donc très intéressantes. Toutefois, l'utilisation des pouvoirs d'arrêt publiés par Cole [98] pour les électrons est une source d'imprécision dans le calcul. Ils ne tiennent, en effet, pas compte qu'une partie de l'énergie perdue par les particules primaires lors des ionisations est convertie en énergie cinétique fournie à des électrons secondaires (delta rays). Cette énergie va être déposée hors de la trace de la particule primaire. La distance parcourue par ces électrons secondaires peut être supérieure aux dimensions des cellules et par conséquent une partie de l'énergie ne sera pas déposée dans celles-ci. Les facteurs S pour les électrons fournis dans les tables, notamment pour des énergies initiales supérieures à 500 keV, sont donc surestimés. Une comparaison avec des calculs effectués par le code Monte-Carlo OREC montre que cette surestimation peut atteindre 20%. [96]. Pour les particules α , les dépôts d'énergie par des électrons secondaires sont quasi-négligeables par rapport aux dépôts d'énergie des particules α . Les facteurs S sont donc relativement précis *a priori*.

Les facteurs S publiés dans les tables du MIRD sont basés sur un modèle géométrique qui suppose que les cellules et leur noyau sont de forme sphérique. Très souvent, celles-ci ont une forme proche d'un ellipsoïde. Bien qu'il soit possible de déduire des facteurs géométriques s'appliquant à des ellipsoïdes [102], il est pratique d'utiliser des codes Monte-Carlo pour effectuer des calculs dosimétriques dans des ellipsoïdes. Des calculs menés avec le code Monte-Carlo OREC ont montré que les différences pour des facteurs S calculés pour des électrons pouvaient atteindre 50% lorsque l'on considère des ellipsoïdes.

Enfin, les tables mentionnées ci-dessus ne fournissent aucun facteur S correspondant à des irradiations provenant des cellules voisines de la cellule cible (« facteur S cross »). Seules quelques valeurs de facteurs S cross, calculées par Howell pour l' ^{131}I , sont disponibles sur le site du département de recherche sur les rayonnements de la faculté de médecine de New Jersey (http://www.umdnj.edu/radweb/multicellular_dosimetry/index.htm). Des calculs sont également nécessaires pour des cellules dont le rayon dépasse 10 μm .

2.3 Dosimétrie multi-échelles :

L'objectif de la dosimétrie est de fournir un index que l'on peut relier de façon pertinente à la réponse d'une structure biologique. D'après cette définition, il convient de ne pas traiter les organes comme des masses uniformes mais de bien caractériser les différentes composantes fonctionnelles qui les constituent. Dans le domaine de la radiothérapie externe, les doses délivrées aux organes suffisent pour prédire la réponse biologique de ces derniers. Ce principe repose sur la bonne uniformité des dépôts de dose dans les organes. Chaque partie d'un

organe va en effet recevoir une dose égale à la dose totale reçue par l'organe entier. Une des principales caractéristiques de la radiothérapie vectorisée est la distribution non-uniforme de l'activité au sein des organes ou des tumeurs. Les diverses composantes d'un organe recevront des doses variables, et différentes de la dose reçue par l'organe entier. De nombreuses études ont cherché à évaluer les implications potentielles d'une distribution non-uniforme de l'activité aux niveaux macroscopique [126, 127, 128], multicellulaire [129, 130, 131, 132] et cellulaire [133, 134] dans les organes et les tumeurs.

Sur le modèle de la radiothérapie externe, la dosimétrie patient est, dans le domaine de la radiothérapie vectorisée, généralement réalisée à l'échelle des organes. Toutefois, les différences fonctionnelles entre différentes zones d'un même organe peuvent être considérées en contournant ces différentes zones sub-organiques ou en effectuant des calculs à l'échelle des voxels. Pour d'autres organes, notamment la moelle osseuse, une dosimétrie à l'échelle des cellules devra peut-être être réalisée dans la cadre de la RIT- α [135, 136]. Pour chaque échelle, la détermination de l'activité cumulée fera appel à des techniques différentes afin d'obtenir une bonne adéquation entre la résolution des techniques de quantification et l'échelle souhaitée.

Pour toutes ces résolutions, le même formalisme pourra être utilisé pour le calcul de la dose. La grande puissance du MIRD est, en effet, que ce formalisme peut s'appliquer à n'importe quelle échelle de taille.

2.3.1 Dosimétrie Organe :

2.3.1.1 Détermination des facteurs S :

La dose moyenne absorbée par un organe ou la tumeur est le paramètre considéré dans la majorité des études sur patients. Le volume et la position de chaque organe peuvent être déterminé à partir d'images anatomiques (IRM ou CT) par segmentation automatique ou contourage manuel. Les facteurs S, corrigés ou non de la masse, pourront être déterminés à partir des tables existantes regroupées notamment dans le logiciel OLINDA, ou bien calculés par Monte-Carlo ou Point-Kernel. L'activité cumulée dans l'organe et dans les organes voisins sera, elle, déterminée à partir des images fonctionnelles obtenues par les techniques citées ci-dessous.

2.3.1.2 Quantification de l'activité :

En médecine nucléaire, le calcul de l'activité cumulée dans les organes fixants peut être réalisé à partir d'une ou plusieurs méthodes [137] :

- les méthodes d'imagerie:
 - l'imagerie en mode planaire
 - la tomographie d'émission monophotonique (SPECT)
 - la tomographie d'émission de positons (TEP)
- les méthodes sans imagerie :
 - le comptage externe avec un détecteur adapté (sonde NaI ou compteur Geiger-Muller)
 - le comptage de prélèvements sanguins ou de biopsies
 - le comptage des urines ou des selles.

La quantification et la localisation des sources par imagerie scintigraphique, qui est une méthode très étudiée, vont être perturbées par plusieurs phénomènes :

- l'absorption dans le patient

- la diffusion dans le patient
- l'auto-absorption dans les sources épaisses
- la superposition de plusieurs sources en mode planaire
- la pénétration septale à travers le collimateur
- la variation de la résolution spatiale de la caméra en fonction de la profondeur
- l'effet de volume partiel
- le bruit de fond
- le temps mort de l'électronique de comptage de la caméra, lorsque le taux de comptage est élevé.

Afin de parvenir à une quantification satisfaisante, il est indispensable de corriger ces phénomènes, particulièrement les phénomènes d'absorption et de diffusion. La présence d'un scanner (CT) sur certaines caméras permet d'obtenir une carte d'atténuation du patient qui est ensuite utilisée pour corriger le phénomène d'absorption.

2.3.2 Dosimétrie tissulaire :

Pour prendre en compte des distributions non-uniformes d'activité au sein d'un organe, le calcul dosimétrique peut toujours être réalisé selon le formalisme du MIRD. Il convient juste de développer de nouveaux modèles géométriques pour décrire les systèmes biologiques [138, 139]. L'organe doit alors être divisé en sous-régions. La dose moyenne absorbée peut être calculée à partir du moment où l'on connaît les caractéristiques de fixation et de clairance pour chaque sous-région. Il existe plusieurs fantômes d'organes pour lesquels différentes sous-régions ont été caractérisées. Le pamphlet n°19 du comité MIRD décrit ainsi les différentes sous-régions fonctionnelles constitutives du rein [140]. Ce modèle est approprié pour évaluer la toxicité rénale des traitements à base de peptides radiomarqués. La prise en compte de la non-uniformité de l'activité cumulée à l'échelle des voxels dans les reins a conduit à des distributions de dose très variables selon les régions pour des émetteurs de faible énergie (^{177}Lu , ^{111}In) contrairement à ^{90}Y , d'énergie plus élevée, et pour lequel la distribution de dose dans le rein est relativement homogène [141].

2.3.2.1 Détermination des facteurs S :

La détermination des facteurs se fera très souvent à l'échelle des voxels soit en utilisant les tables existantes ou bien en les calculant à l'aide d'une méthode Monte-Carlo ou Point-Kernel comme décrit précédemment.

2.3.2.2 Quantification de l'activité :

Pour réaliser une dosimétrie à l'échelle suborgane, l'activité cumulée devra être déterminée à l'échelle du voxel. Les systèmes d'imagerie tomographique (SPECT ou TEP) permettent cette mesure avec des voxels de taille proche de 3-6 mm. Il est ensuite possible, à partir de données anatomiques, par exemple, acquises par un scanner ou un IRM, de regrouper certains voxels qui appartiennent à la même région fonctionnelle à l'intérieur d'un organe. Les images devront être corrigées de certains effets nuisant à la quantification déjà détaillés dans la partie 2.3.1.2.

2.3.3 Dosimétrie cellulaire et multi-cellulaire :

Dans une image de patient, les voxels ont des dimensions de 3 à 6 mm. Ils représentent la zone la plus petite pour laquelle on peut obtenir une valeur relativement fiable de l'activité. Pour des volumes plus petits, on considère alors que l'activité est distribuée de façon homogène. Une étude a montré que la survie cellulaire calculée à partir de plusieurs distributions hétérogènes d'activité à l'échelle d'un voxel pouvait être extrêmement variable selon l'énergie du radionucléide considéré [132]. Une dosimétrie à l'échelle multi-cellulaire ou cellulaire doit donc parfois être réalisée.

Ce principe est implicite lorsque l'on s'intéresse à la dosimétrie d'expériences d'irradiations cellulaires réalisées *in vitro* ou à l'effet de traitements ciblant des cellules isolées *in vivo*. La dosimétrie multi-cellulaire est également très importante lorsque l'on s'intéresse à de petits amas cellulaires. Dans des tumeurs de petites tailles (micrométastases), les doses reçues par les cellules peuvent être très variables et la réponse biologique va être reliée à la réponse collective de toutes les cellules [96, 142]. Le calcul des doses délivrées à chaque cellule sera particulièrement pertinent quand les radionucléides se concentrent dans les cellules et/ou émettent des rayonnements dont les parcours sont comparables aux dimensions des cellules (émetteurs Auger ou émetteurs α).

L'intérêt de la dosimétrie cellulaire pour des structures biologiques plus importantes (tumeurs centimétriques ou organes) est encore questionnable. On peut tout de même penser qu'établir des liens entre les résultats dosimétriques obtenus à l'échelle cellulaire et des résultats dosimétriques à l'échelle du voxel pourront permettre de mieux appréhender la relation dose/effet. Enfin, la dosimétrie cellulaire semble particulièrement adaptée aux études biologiques actuelles qui s'intéressent fortement au micro-environnement tumoral.

Les profils de dose, calculés dans le cadre de la dosimétrie cellulaire, vont dépendre de :

- des données biocinétiques,
- des propriétés radiatives du radionucléide,
- de la fraction de cellules marquées,
- de la localisation des radioéléments dans la cellule,
- des dimensions des cellules et du cluster.

Ces paramètres sont parfois difficiles à caractériser, particulièrement chez des patients car cela nécessite des techniques invasives (biopsies, prélèvements sanguins). Pour les études *in vivo* chez la souris et le rat, la micro autoradiographie est très utilisée pour caractériser la distribution de l'activité au niveau cellulaire [143, 144, 145, 146]. Pour les études *in vitro*, de nouveaux dispositifs d'imagerie peuvent permettre d'estimer la distribution des anticorps au niveau cellulaire : la microscopie confocale, l'imagerie par bioluminescence. Une méthode très utilisée en immunologie peut également être employée pour caractériser la fixation des anticorps aux cellules : la méthode Scatchard (les détails de cette méthode sont décrits dans les annexes).

Ces mesures comportent souvent des incertitudes importantes. Ces incertitudes constituent une des principales limites de la dosimétrie cellulaire.

2.3.4 Conclusion :

L'établissement du formalisme du MIRD a été une étape essentielle dans le développement de la dosimétrie en radiothérapie interne. La succession des nombreux pamphlets au cours des deux dernières décennies illustre parfaitement les directions actuelles de la recherche dans ce domaine et les progrès techniques de l'imagerie et de la quantification de l'activité. La réduction de l'échelle du calcul de dose à des parties d'organe ou au niveau du voxel ou de la cellule n'a qu'un seul but : mieux prendre en compte les non-uniformités de la distribution de

l'activité pour établir une relation dose/effet comme dans le domaine de la radiothérapie externe. Cette évolution est particulièrement nécessaire pour l'étude des rayonnements dont les parcours dans la matière sont restreints et pour les traitements dont les cibles sont de faibles dimensions. La dosimétrie cellulaire est donc appropriée pour l'étude de la RIT- α . Le calcul de la dose moyenne absorbée ne doit pas être en soi l'objectif ultime d'un physicien. Dans de très nombreux cas, ce paramètre ne suffit pas pour prédire la réponse biologique. Le calcul de la dose moyenne absorbée ne constitue en fait que la première tâche indispensable dans l'analyse risque/bénéfice d'un traitement.

2.4 Relation Dose-Effet :

Dans le domaine de la radiothérapie externe, une forte corrélation entre la dose absorbée et la réponse de la tumeur et/ou des organes sains a été mise en évidence. Cette relation est utilisée en routine clinique et les traitements sont, dans ce cadre, prescrits sous la forme d'unités de dose absorbée. Des systèmes de planification de traitements reposant sur des outils de calcul de dose sont désormais largement distribués dans les services de radiothérapie et permettent d'effectuer des dosimétries personnalisées afin de choisir la meilleure option thérapeutique pour chaque patient.

Actuellement, dans le domaine de la RIT et plus largement de la radiothérapie vectorisée, les radiopharmaceutiques sont prescrits sous forme d'unités d'activité administrée. Paradoxalement, il a été montré dans plusieurs études que l'injection d'une même activité à plusieurs patients conduisait à des doses à la tumeur et aux organes sains très hétérogènes [147]. Cette prescription par unités d'activité administrée, similaire à la pratique de la chimiothérapie, semble donc peu justifiée. À l'opposé, il semble logique et naturel d'utiliser l'index de la dose pour prescrire les traitements de RIT comme cela se fait en radiothérapie externe. Toutefois, les premiers résultats des études cliniques de la RIT n'ont pas montré de corrélation claire entre la dose absorbée et la réponse des tissus sains [148, 149, 150, 23]. Plusieurs explications peuvent expliquer cette absence de corrélation [151]:

- Utilisation d'une dosimétrie non spécifique (modèle)
- Quantification de l'activité très imprécise
- Distributions non uniformes de l'activité dans les organes
- Différences inter-individuelles dans la radiosensibilité des tissus ou de la tumeur
- Différence d'histoire thérapeutique (chirurgie ou chimiothérapie préalables),
- Existence d'une activité anti-tumorale propre pour certains anticorps
- La repopulation cellulaire entre deux fractions d'un traitement [152, 153, 154]
- L'efficacité biologique relative (EBR) des différents rayonnements. L'EBR désigne le rapport, déterminé expérimentalement, de la dose absorbée du rayonnement d'intérêt sur la dose absorbée d'un rayonnement de référence qui conduit au même effet biologique dans un organisme ou dans un tissu.
- Enfin, il est possible que la dose moyenne absorbée ne soit pas un paramètre suffisant pour prédire les effets des radionucléides

De nombreux développements ont eu lieu ces dernières années sur ces points précis. Plusieurs logiciels de dosimétrie personnalisée ont été implémentés [155, 156, 157, 158] et permettent à partir d'images anatomiques et fonctionnelles de calculer les doses reçues par la tumeur et par chaque organe sain. Différentes méthodes de correction des images sont également utilisées en médecine nucléaire afin d'améliorer la quantification. Enfin l'étude de l'impact du débit de

dose et d'autres paramètres dosimétriques ont été réalisés afin d'améliorer les modèles radiobiologiques [159, 160, 161].

Ces efforts ont permis à quelques équipes de mettre en évidence des relations dose/effet.

En 1992, un essai clinique multicentrique de phase I sur l'utilisation de l'¹³¹I-MIBG pour le traitement des neuroblastomes chimiorésistants a montré une relation possible entre la dose corps entier (mesurée à l'aide d'une sonde externe placée dans la chambre du patient) et la toxicité à la moelle [162]. Il a ainsi été observé qu'au-delà d'une dose corps entier de 2,5 Gy 80% des patients présentaient des thrombocytopenies de grade 3 et 4. Cette étude a permis la mise au point d'un protocole rationnel d'administration du radiopharmaceutique. Une faible activité traceuse est injectée, dans un premier temps au patient. La dose corps entier est alors mesurée grâce à la sonde externe. Ensuite, pour l'injection réellement thérapeutique, l'activité est ajustée afin de ne pas dépasser une dose corps entier de 2,5 Gy. L'utilisation de ce protocole particulier dans le cadre de ce traitement semble appropriée. En 2005, une seconde étude [163] a montré que la dose prescrite était généralement atteinte avec une erreur maximale d'environ 17%. La toxicité à la moelle peut donc, dans ce cas précis, être contrôlée et la dose délivrée à la tumeur peut ainsi être maximisée.

En 2000, Akabani [164] a montré une corrélation entre la dose délivrée lors d'une injection intra-péritonéale dans le cadre d'un traitement de glioblastomes multiformes avec des anticorps antitenascine radiomarqués à l'¹³¹I et différents paramètres qui reflètent une amélioration pour le patient. Il a montré que les réponses anti-tumorales et la toxicité étaient reliées à la dose déposée dans la couche de 2 cm entourant la cavité ainsi qu'au débit de dose initial. Il a pu calculer une dose (43 ± 16 Gy) et un débit de dose initial ($0,41 \pm 0,10$ Gy/h) qui minimisent les dommages au cerveau et maximisent le contrôle tumoral.

Une étude plus récente a également montré des résultats prometteurs. Les traitements à base de peptides radiomarqués entraînent une toxicité importante au niveau des reins en raison de l'absorption des peptides par les reins au moment de leur passage dans cet organe. Au cours d'un essai clinique étudiant le ⁹⁰Y-DOTATOC, Barone [165] a montré une excellente corrélation ($r=0,93$ $p<0,0001$) entre le déclin de la fonction rénale (exprimé en perte de la clairance de la créatinine par an) et la dose biologique effective (biological effective dose : BED) reçue par les reins. Comme son nom l'indique, le BED est en réalité le paramètre résultat d'un modèle radiobiologique qui repose originellement sur le modèle linéaire-quadratique. Le BED est une abstraction et représente la dose délivrée à la limite mathématique d'un faible débit de dose qui aurait le même effet que la dose effectivement reçue par la structure biologique. Plus simplement, le BED tient compte, non seulement de la dose moyenne absorbée mais aussi de la radiosensibilité des cellules irradiées, de la demi-vie effective du radionucléide, de la demi-vie de réparation des dommages sublétaux infligés aux cellules, du débit de dose et de d'autres paramètres du traitement (nombre d'injections, activité injectée par fraction...). Konijnenberg a depuis montré que la corrélation obtenue était semblable aux courbes utilisées en radiothérapie externe pour relier la dose absorbée à la toxicité rénale (ce travail a été présenté au congrès annuel de l'EANM en 2007. La présentation est disponible sur le site internet de l'EANM : http://www.eanm.org/education/cme/cme_2007/cme_session2.php?navId=510).

Tous ces résultats sont encourageants et laissent penser que, dans quelques années, nous disposerons de systèmes de planification de traitements à l'image de ce qui se fait en radiothérapie externe. La quantification précise de l'activité dans les organes et la tumeur ainsi que l'étude de l'impact de la distribution non uniforme de cette activité demeurent les

deux grands défis de la dosimétrie en médecine nucléaire. Au cours de ce travail, nous avons, entre autres, abordé ce dernier problème à l'échelle des cellules.

2.5 Conclusion:

Si le formalisme du MIRD est toujours utilisé 40 ans après sa publication, les modèles géométriques et les hypothèses physiques permettant le calcul de la dose se sont beaucoup complexifiés au cours de ces quatre décennies. Le corps humain, dans le domaine de la dosimétrie, n'est plus constitué de sphère et d'ellipsoïdes simples mais d'organes finement représentés à l'aide de NURBS (non-uniform rational b-spline) [166] ou d'une grille tri-dimensionnelle de voxels. Chacune des particules émises par un radioélément et toutes les particules secondaires qu'elle met en mouvement peuvent être suivies et leurs dépôts d'énergie dans la matière quantifiés grâce à l'utilisation de codes Monte-Carlo de plus en plus adaptés à la physique médicale.

De façon générale, le calcul des doses déposées dans des structures biologiques complexes n'est plus, en soi, un problème en raison des outils de calcul à notre disposition. Le défi actuel de la dosimétrie interne est de développer des systèmes de planification de traitement, notamment pour la RIT. Le schéma général de prise en charge d'un patient pourrait être, dans quelques années le suivant. En préalable au traitement, le patient recevrait une faible activité d'anticorps radiomarqués. Une imagerie dynamique de la distribution de cet anticorps et de son élimination permettrait de caractériser la biocinétique du radioimmunoconjugué. Le système de planification de traitement serait alors utilisé pour déterminer l'activité à injecter au patient afin d'atteindre une efficacité anti-tumorale maximale en regard de la toxicité pour les organes sains.

Trois facteurs limitent encore le développement de tels systèmes de planification.

Malgré des progrès rapides, les méthodes de quantification de l'activité à partir de l'imagerie médicale ne permettent pas encore d'obtenir une valeur précise de l'activité à l'échelle du voxel.

Le second problème concerne les temps de calculs qui seraient nécessaires au logiciel pour effectuer la dosimétrie personnalisée à partir des images du patient. Ce problème va disparaître avec l'augmentation de la puissance de calculs des ordinateurs ou pourra être contourné aisément en utilisant, dans des cas appropriés, une méthode Point-Kernel beaucoup moins gourmande en temps de calculs.

Le troisième défi va consister à développer des modèles radiobiologiques simples et pertinents permettant de prévoir la réponse des tissus aux irradiations. Dans ce cadre, il convient d'améliorer nos connaissances à propos de l'impact des non-uniformités de la distribution d'activité sur les effets biologiques des rayonnements. Ces études doivent être réalisées en évaluant les paramètres dosimétriques pertinents à des échelles spatiales réduites. La dosimétrie cellulaire peut, dans ce contexte, fournir des informations très utiles.

Ce troisième défi constitue un enjeu de cette thèse. A partir de données expérimentales d'irradiation cellulaire, nous avons cherché à modéliser la toxicité des particules α . Ces informations recueillies *in vitro* nous ont permis d'étudier de façon théorique l'impact potentiel de différentes non-uniformités à l'échelle cellulaire sur l'efficacité d'un traitement de RIT- α .

Bibliographie

1. W. H. Beierwaltes, The treatment of thyroid carcinoma with radioactive iodine. *Semin Nucl Med* **8**, 79-94 (1978).
2. S. H. Britz-Cunningham and S. J. Adelstein, Molecular targeting with radionuclides: state of the science. *J Nucl Med* **44**, 1945-1961 (2003).
3. J. C. Sisson, B. Shapiro, W. H. Beierwaltes, J. V. Glowniak, M. Nakajo, T. J. Mangner, J. E. Carey, D. P. Swanson, J. E. Copp, et al., Radiopharmaceutical treatment of malignant pheochromocytoma. *J Nucl Med* **25**, 197-206 (1984).
4. J. R. Novell and A. J. Hilson, Iodine-131-Lipiodol for hepatocellular carcinoma: the benefits of targeting. *J Nucl Med* **35**, 1318-1320 (1994).
5. J. C. Reubi, Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Q J Nucl Med* **41**, 63-70 (1997).
6. J. C. Reubi, H. R. Macke and E. P. Krenning, Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**, 67S-75S (2005).
7. D. J. Kwekkeboom, J. J. Teunissen, W. H. Bakker, P. P. Kooij, W. W. de Herder, R. A. Feelders, C. H. van Eijck, J. P. Esser, B. L. Kam and E. P. Krenning, Radiolabeled

- somatostatin analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. *J Clin Oncol* **23**, 2754-2762 (2005).
8. D. J. Kwekkeboom, J. Mueller-Brand, G. Paganelli, L. B. Anthony, S. Pauwels, L. K. Kvols, M. O'Dorisio T, R. Valkema, L. Bodei, et al., Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**, 62S-66S (2005).
 9. E. J. Rolleman, F. Forrer, B. Bernard, M. Bijster, M. Vermeij, R. Valkema, E. P. Krenning and M. de Jong, Amifostine protects rat kidneys during peptide receptor radionuclide therapy with [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**, 763-771 (2007).
 10. E. J. Rolleman, M. de Jong, R. Valkema, D. Kwekkeboom, B. Kam and E. P. Krenning, Inhibition of kidney uptake of radiolabeled somatostatin analogs: amino acids or gelifosine? *J Nucl Med* **47**, 1730-1731; author reply 1731 (2006).
 11. P. Ehrlich, On immunity with special reference to cell life. The Collected Papers of Paul Ehrlich, Volume II : Immunology and Cancer Research. Pergamon Press, London U.K.
 12. J. F. Chatal and C. A. Hoefnagel, Radionuclide therapy. *Lancet* **354**, 931-935 (1999).
 13. D. M. Goldenberg, Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med* **43**, 693-713 (2002).
 14. D. M. Goldenberg, Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother* **52**, 281-296 (2003).
 15. S. J. DeNardo, L. A. Kroger and G. L. DeNardo, A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr Opin Immunol* **11**, 563-569 (1999).
 16. R. M. Sharkey and D. M. Goldenberg, Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**, 115S-127S (2005).
 17. D. G. Maloney, A. J. Grillo-Lopez, C. A. White, D. Bodkin, R. J. Schilder, J. A. Neidhart, N. Janakiraman, K. A. Foon, T. M. Liles, et al., IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **90**, 2188-2195 (1997).
 18. Kaminski MS, Zelenetz AD, Press O et al. Multicenter, phase III study of iodine-131 tositumomab (anti-B1 antibody) for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Blood* **92**(suppl 1), 316a (1998).
 19. J. W. Friedberg, Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* **10**, 7789-7791 (2004).
 20. D. L. Morris, H. G. Jeong, S. D. Jordan, N. E. Kaminski and M. P. Holsapple, Characterization of the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in B6C3F1 and DBA/2 mice following single and repeated exposures. *Arch Toxicol* **72**, 157-168 (1998).
 21. J. M. Vose, R. L. Wahl, M. Saleh, A. Z. Rohatiner, S. J. Knox, J. A. Radford, A. D. Zelenetz, G. F. Tidmarsh, R. J. Stagg and M. S. Kaminski, Multicenter phase II study of iodine-131 tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade and transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* **18**, 1316-1323 (2000).
 22. M. S. Kaminski, J. A. Radford, S. A. Gregory, J. P. Leonard, S. J. Knox, S. Kroll and R. L. Wahl, Re-treatment with I-131 tositumomab in patients with non-Hodgkin's lymphoma who had previously responded to I-131 tositumomab. *J Clin Oncol* **23**, 7985-7993 (2005).
 23. G. A. Wiseman, C. A. White, M. Stabin, W. L. Dunn, W. Erwin, M. Dahlbom, A. Raubitschek, K. Karvelis, T. Schultheiss, et al., Phase I/II 90Y-Zevalin (yttrium-90 ibritumomab tiuxetan, IDEC-Y2B8) radioimmunotherapy dosimetry results in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med* **27**, 766-777 (2000).
 24. T. E. Witzig, The use of ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* **27**, 74-78 (2000).
 25. B. D. Cheson, Future strategies toward the cure of indolent B-cell malignancies:

introduction. *Semin Hematol* **36**, 1-2 (1999).

26. A. K. Gopal, T. A. Gooley, D. G. Maloney, S. H. Petersdorf, J. F. Eary, J. G. Rajendran, S. A. Bush, L. D. Durack, J. Golden, et al., High-dose radioimmunotherapy versus conventional high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular non-Hodgkin lymphoma: a multivariable cohort analysis. *Blood* **102**, 2351-2357 (2003).
27. S. J. DeNardo, L. E. Williams, B. R. Leigh and R. L. Wahl, Choosing an optimal radioimmunotherapy dose for clinical response. *Cancer* **94**, 1275-1286 (2002).
28. J. G. Jurcic, S. M. Larson, G. Sgouros, M. R. McDevitt, R. D. Finn, C. R. Divgi, A. M. Ballangrud, K. A. Hamacher, D. Ma, et al., Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* **100**, 1233-1239 (2002).
29. W. J. Oyen, L. Bodei, F. Giammarile, H. R. Maecke, J. Tennvall, M. Luster and B. Brans, Targeted therapy in nuclear medicine--current status and future prospects. *Ann Oncol* **18**, 1782-1792 (2007).
30. M. Mahe and J. F. Chatal, [Radioimmunotherapy in the treatment of cancers]. *Bull Cancer* **81**, 788-799 (1994).
31. G. L. DeNardo, R. T. O'Donnell, L. A. Kroger, C. M. Richman, D. S. Goldstein, S. Shen and S. J. DeNardo, Strategies for developing effective radioimmunotherapy for solid tumors. *Clin Cancer Res* **5**, 3219s-3223s (1999).
32. A. A. Epenetos, V. Hird, H. Lambert, P. Mason and C. Coulter, Long term survival of patients with advanced ovarian cancer treated with intraperitoneal radioimmunotherapy. *Int J Gynecol Cancer* **10**, 44-46 (2000).
33. D. D. Bigner, M. T. Brown, A. H. Friedman, R. E. Coleman, G. Akabani, H. S. Friedman, W. L. Thorstad, R. E. McLendon, S. H. Bigner, et al., Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase I trial results. *J Clin Oncol* **16**, 2202-2212 (1998).
34. D. A. Reardon, G. Akabani, R. E. Coleman, A. H. Friedman, H. S. Friedman, J. E. Herndon, 2nd, I. Cokgor, R. E. McLendon, C. N. Pegram, et al., Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J Clin Oncol* **20**, 1389-1397 (2002).
35. M. Bardies, S. Bardet, A. Faivre-Chauvet, P. Peltier, J. Y. Douillard, M. Mahe, M. Fiche, A. Lisbona, F. Giacalone, et al., Bispecific antibody and iodine-131-labeled bivalent hapten dosimetry in patients with medullary thyroid or small-cell lung cancer. *J Nucl Med* **37**, 1853-1859 (1996).
36. F. Buchegger, C. Pfister, K. Fournier, F. Prevel, M. Schreyer, S. Carrel and J. P. Mach, Ablation of human colon carcinoma in nude mice by 131I-labeled monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibody F(ab')₂ fragments. *J Clin Invest* **83**, 1449-1456 (1989).
37. F. Buchegger, A. Pelegrin, B. Delaloye, A. Bischof-Delaloye and J. P. Mach, Iodine-131-labeled MAb F(ab')₂ fragments are more efficient and less toxic than intact anti-CEA antibodies in radioimmunotherapy of large human colon carcinoma grafted in nude mice. *J Nucl Med* **31**, 1035-1044 (1990).
38. F. Buchegger, M. Gillet, F. Doenz, C. A. Vogel, C. Achantari, J. P. Mach, B. Delaloye and A. B. Delaloye, Biodistribution of anti-CEA F(ab')₂ fragments after intra-arterial and intravenous injection in patients with liver metastases due to colorectal carcinoma. *Nucl Med Commun* **17**, 500-503 (1996).
39. T. M. Behr and D. M. Goldenberg, Improved prospects for cancer therapy with radiolabeled antibody fragments and peptides? *J Nucl Med* **37**, 834-836 (1996).
40. M. Juweid, R. M. Sharkey, T. M. Behr, L. C. Swayne, R. Dunn, Z. Ying, J. A. Siegel, H. J. Hansen and D. M. Goldenberg, Clinical evaluation of tumor targeting with the

- anticarcinoembryonic antigen murine monoclonal antibody fragment, MN-14 F(ab)₂. *Cancer* **78**, 157-168 (1996).
41. T. M. Behr, R. D. Blumenthal, S. Memtsoudis, R. M. Sharkey, S. Gratz, W. Becker and D. M. Goldenberg, Cure of metastatic human colonic cancer in mice with radiolabeled monoclonal antibody fragments. *Clin Cancer Res* **6**, 4900-4907 (2000).
42. D. E. Milenic, Radioimmunotherapy: designer molecules to potentiate effective therapy. *Semin Radiat Oncol* **10**, 139-155 (2000).
43. T. S. Quang and L. W. Brady, Radioimmunotherapy as a novel treatment regimen: 125I-labeled monoclonal antibody 425 in the treatment of high-grade brain gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 972-975 (2004).
44. J. P. Pouget, L. Santoro, L. Raymond, N. Chouin, M. Bardiès, C. Bascoul-Mollevis, H. Huguet, D. Azria, P.-O. Kotzki, M. Pèlerin, E. Vivès and A. Pèlerin, Cell membrane is a more sensitive target than cytoplasm to dense ionization produced by Auger electrons. *Radiat Res* - sous presse.
45. M. Chereil, F. Davodeau, F. Kraeber-Bodere and J. F. Chatal, Current status and perspectives in alpha radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **50**, 322-329 (2006).
46. R. H. Larsen, S. Slade and M. R. Zalutsky, Blocking [211At]astatide accumulation in normal tissues: preliminary evaluation of seven potential compounds. *Nucl Med Biol* **25**, 351-357 (1998).
47. D. J. Hnatowich, The in vivo uses of streptavidin and biotin: a short progress report. *Nucl Med Commun* **15**, 575-577 (1994).
48. H. B. Breitz, D. R. Fisher, M. L. Goris, S. Knox, B. Ratliff, A. D. Murtha and P. L. Weiden, Radiation absorbed dose estimation for 90Y-DOTA-biotin with pretargeted NR-LU-10/streptavidin. *Cancer Biother Radiopharm* **14**, 381-395 (1999).
49. H. B. Breitz, P. L. Weiden, P. L. Beaumier, D. B. Axworthy, C. Seiler, F. M. Su, S. Graves, K. Bryan and J. M. Reno, Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and 90Y-DOTA-biotin. *J Nucl Med* **41**, 131-140 (2000).
50. S. J. Knox, M. L. Goris, M. Tempero, P. L. Weiden, L. Gentner, H. Breitz, G. P. Adams, D. Axworthy, S. Gaffigan, et al., Phase II trial of yttrium-90-DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/streptavidin in patients with metastatic colon cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 406-414 (2000).
51. G. Paganelli, P. Magnani and F. Fazio, Pretargeting of carcinomas with the avidin-biotin system. *Int J Biol Markers* **8**, 155-159 (1993).
52. F. Kraeber-Bodéré, A. Faivre-Chauvet, E. Cerato, A. Devillers, R. M. Sharkey, K. Chang, D.M. Goldenberg, J. Barbet, and J-F. Chatal, Clinical optimization of two-step radioimmunotherapy (RAIT) using an ¹³¹I-labeled anti-CEA/anti-DTPA bispecific antibody and an ¹³¹I-labeled bivalent DTPA hapten in patients with CEA-expressing tumor. *J. Nucl. Med. (Suppl.)* **42**:123P (2001).
53. F. Kraeber-Bodere, S. Bardet, C. A. Hoefnagel, M. R. Vieira, J. P. Vuillez, A. Murat, T. C. Ferreira, M. Bardiès, L. Ferrer, et al., Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine 131-labeled bivalent hapten: preliminary results of a phase I/II clinical trial. *Clin Cancer Res* **5**, 3190s-3198s (1999).
54. J. Barbet, F. Kraeber-Bodere, J. P. Vuillez, E. Gautherot, E. Rouvier and J. F. Chatal, Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* **14**, 153-166 (1999).
55. E. Rouvier, E. Gautherot, P. Meyer and J. Barbet, Targeting medullary thyroid carcinomas with bispecific antibodies and bivalent haptens. Results and clinical perspectives. *Horm Res* **47**, 163-167 (1997).
56. S. Supiot, F. Thillays, E. Rio, S. Gouard, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, M. A. Mahe, J. F. Chatal, F. Davodeau and M. Chereil, Gemcitabine radiosensitizes multiple

- myeloma cells to low let, but not high let, irradiation. *Radiother Oncol* **83**, 97-101 (2007).
57. G. W. Barendsen and H. M. Walter, Effects of Different Ionizing Radiations on Human Cells in Tissue Culture. Iv. Modification of Radiation Damage. *Radiat Res* **21**, 314-329 (1964).
58. M. A. Walicka, G. Vaidyanathan, M. R. Zalutsky, S. J. Adelstein and A. I. Kassis, Survival and DNA damage in Chinese hamster V79 cells exposed to alpha particles emitted by DNA-incorporated astatine-211. *Radiat Res* **150**, 263-268 (1998).
59. A. I. Kassis, C. R. Harris, S. J. Adelstein, T. J. Ruth, R. Lambrecht and A. P. Wolf, The in vitro radiobiology of astatine-211 decay. *Radiat Res* **105**, 27-36 (1986).
60. E. J. Hall, Radiobiology for the Radiologist. Fourth edition. Philadelphia: J.B.Lippincott Company (1994).
61. O. V. Belyakov, K. M. Prise, K. R. Trott and B. D. Michael, Delayed lethality, apoptosis and micronucleus formation in human fibroblasts irradiated with X-rays or alpha-particles. *Int J Radiat Biol* **75**, 985-993 (1999).
62. J. L. Humm, Dosimetric aspects of radiolabeled antibodies for tumor therapy. *J Nucl Med* **27**, 1490-1497 (1986).
63. J. L. Humm, A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **13**, 1767-1773 (1987).
64. J. Elgqvist, H. Andersson, T. Back, R. Hultborn, H. Jensen, B. Karlsson, S. Lindegren, S. Palm, E. Warnhammar and L. Jacobsson, Therapeutic efficacy and tumor dose estimations in radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 cells in nude mice with (211)At-labeled monoclonal antibody MX35. *J Nucl Med* **46**, 1907-1915 (2005).
65. J. Elgqvist, H. Andersson, T. Back, I. Claesson, R. Hultborn, H. Jensen, B. R. Johansson, S. Lindegren, M. Olsson, et al., Alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions: Outcome related to measured tumor size and mean absorbed dose. *J Nucl Med* **47**, 1342-1350 (2006).
66. M. R. Zalutsky, D. A. Reardon, G. Akabani, R. E. Coleman, A. H. Friedman, H. S. Friedman, R. E. McLendon, T. Z. Wong and D. D. Bigner, Clinical experience with alpha-particle emitting 211At: treatment of recurrent brain tumor patients with 211At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J Nucl Med* **49**, 30-38 (2008).
67. R. M. Macklis, B. M. Kinsey, A. I. Kassis, J. L. Ferrara, R. W. Atcher, J. J. Hines, C. N. Coleman, S. J. Adelstein and S. J. Burakoff, Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science* **240**, 1024-1026 (1988).
68. O. Couturier, S. Supiot, M. Degraef-Mougin, A. Faivre-Chauvet, T. Carlier, J. F. Chatal, F. Davodeau and M. Cherel, Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**, 601-614 (2005).
69. J. G. Jurcic, S. M. Larson, G. Sgouros, M. R. McDevitt, R. D. Finn, C. R. Divgi, A. M. Ballangrud, K. A. Hamacher, D. Ma, et al., Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* **100**, 1233-1239 (2002).
70. J. G. Jurcic, Radioimmunotherapy for acute and chronic leukemias. Conference Record of « Nuclear Medicine tomorrow », March 30-April 2, 2008, Nantes, France.
71. D. A. Reardon, G. Akabani, R. E. Coleman, A. H. Friedman, H. S. Friedman, J. E. Herndon, 2nd, R. E. McLendon, C. N. Pegram, J. M. Provenzale, et al., Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J Clin Oncol* **24**, 115-122 (2006).
72. B. J. Allen, C. Raja, S. Rizvi, Y. Li, W. Tsui, P. Graham, J. F. Thompson, R. A. Reisfeld and J. Kearsley, Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther* **4**, 1318-1324 (2005).
73. B. J. Allen, C. Raja, S. Rizvi, E. Y. Song and P. Graham, Tumour anti-vascular alpha

- therapy: a mechanism for the regression of solid tumours in metastatic cancer. *Phys Med Biol* **52**, L15-19 (2007).
74. S. Nilsson, R. H. Larsen, S. D. Fossa, L. Balteskard, K. W. Borch, J. E. Westlin, G. Salberg and O. S. Bruland, First clinical experience with alpha-emitting radium-223 in the treatment of skeletal metastases. *Clin Cancer Res* **11**, 4451-4459 (2005).
75. M. R. McDevitt, G. Sgouros, R. D. Finn, J. L. Humm, J. G. Jurcic, S. M. Larson and D. A. Scheinberg, Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* **25**, 1341-1351 (1998).
76. G. Vaidyanathan and M. R. Zalutsky, Targeted therapy using alpha emitters. *Phys Med Biol* **41**, 1915-1931 (1996).
77. M. R. McDevitt, D. Ma, L. T. Lai, J. Simon, P. Borchardt, R. K. Frank, K. Wu, V. Pellegrini, M. J. Curcio, et al., Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* **294**, 1537-1540 (2001).
78. D. S. Wilbur and M. D. Hylarides, Radiolabeling of a monoclonal antibody with N-succinimidyl para-[⁷⁷Br]bromobenzoate. *Int J Rad Appl Instrum B* **18**, 363-365 (1991).
79. G. Sgouros and H. Song, Cancer stem cell targeting using the alpha-particle emitter, ²¹³Bi: mathematical modeling and feasibility analysis. *Cancer Biother Radiopharm* **23**, 74-81 (2008).
80. Z. Yao, M. Zhang, K. Garmestani, D. B. Axworthy, R. W. Mallett, A. R. Fritzberg, L. J. Theodore, P. S. Plascjak, W. C. Eckelman, et al., Pretargeted alpha emitting radioimmunotherapy using (²¹³Bi) 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-biotin. *Clin Cancer Res* **10**, 3137-3146 (2004).
81. L. D. Marinelli, Dosage determination in the use of radioactive isotopes. *J Clin Invest* **28**, 1271-1280 (1949).
82. R. Loevinger and M. Berman, A formalism for calculation of absorbed dose from radionuclides. *Phys Med Biol* **13**, 205-217 (1968).
83. R. Loevinger, T. F. Budinger and E. E. Watson, MIRD primer for absorbed dose calculations. New York : Society of Nuclear Medicine (1988).
84. R. Loevinger, T. F. Budinger and E. E. Watson, MIRD primer for absorbed dose calculations, Revised edition. New York : Society of Nuclear Medicine (1991).
85. ICRP, Publication 60. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Oxford : International Commission on Radiological Protection (1990).
86. R. E. Toohey, M. G. Stabin and E. E. Watson, The AAPM/RSNA physics tutorial for residents: internal radiation dosimetry: principles and applications. *Radiographics* **20**, 533-546; quiz 531-532 (2000).
87. W. H. Ellett, A. B. Callahan and G. L. Brownell, Gamma-Ray Dosimetry of Internal Emitters. Monte Carlo Calculations of Absorbed Dose from Point Sources. *Br J Radiol* **37**, 45-52 (1964).
88. W. S. Snyder, M. R. Ford, G. G. Warner and S.B. Watson, MIRD Pamphlet No 11 : "S", absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and organs. Society of Nuclear Medicine (1975).
89. ICRP, Publication 23. Report on the task group on reference man. Oxford : International Commission on Radiological Protection (1975).
90. M. G. Stabin, R. B. Sparks and E. Crowe, OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J Nucl Med* **46**, 1023-1027 (2005).
91. M. Stabin and A. B. Brill, Physics applications in nuclear medicine: 2007. *J Nucl Med* **49**, 20N-25N (2008).
92. W. E. Bolch, L. G. Bouchet, J. S. Robertson, B. W. Wessels, J. A. Siegel, R. W.

- Howell, A. K. Erdi, B. Aydogan, S. Costes, et al., MIRD pamphlet No. 17: the dosimetry of nonuniform activity distributions--radionuclide S values at the voxel level. Medical Internal Radiation Dose Committee. *J Nucl Med* **40**, 11S-36S (1999).
93. W. R. Nelson, H. Hirayama and D. W. O. Rogers, The EGS4 Code System. SLAC-265, Standford : Standford Linear Accelerator Center (1985).
94. K. F. Eckerman, R. J. Westfall, J. C. Ryman and M. Cristy, Availability of nuclear decay data in electronic form, including beta spectra not previously published. *Health Phys* **67**, 338-345 (1994).
95. M. Cristy and K. F. Eckerman, Specific Absorbed Fractions of Energy at Various Ages from Internal Photon Sources. ORNL/NUREG/TM-8381/V1. Oak Ridge, TN : Oak Ridge National Laboratories (1987).
96. S. M. Goddu, R. W. Howell, L. G. Bouchet, W. E. Bolch, D. V. Rao, MIRD Cellular S Values: Self-absorbed Dose per Unit Cumulated Activity for Selected Radionuclides and Monoenergetic Electron and Alpha Particle Emitters Incorporated into Different Cell Compartments. Reston, VA. Society of Nuclear Medicine (1997).
97. S. M. Goddu, R. W. Howell and D. V. Rao, Cellular dosimetry: absorbed fractions for monoenergetic electron and alpha particle sources and S-values for radionuclides uniformly distributed in different cell compartments. *J Nucl Med* **35**, 303-316 (1994).
98. A. Cole, Absorption of 20-eV to 50,000-eV electron beams in air and plastic. *Radiat Res* **38**, 7-33 (1969).
99. ICRU Report 49, Stopping Powers and Ranges for Protons and Alpha Particles. Bethesda, MD, USA (1993).
100. S. Chiavassa, Développement d'un outil dosimétrique personnalisé pour la radioprotection en contamination interne et la radiothérapie vectorisée en médecine nucléaire. Thèse de doctorat (2005).
101. C. S. Kwok, M. Irfan, M. K. Woo and W. V. Prestwich, Effect of tissue inhomogeneity on beta dose distribution of ³²P. *Med Phys* **14**, 98-104 (1987).
102. J. S. Nettleton and R. S. Lawson, Cellular dosimetry of diagnostic radionuclides for spherical and ellipsoidal geometry. *Phys Med Biol* **41**, 1845-1854 (1996).
103. L. V. Spencer, Theory of electron penetration. *Phys Rev* **98**, 1597-1615 (1955).
104. L. V. Spencer, Energy dissipation by fast electrons. *National Bureau of Standards Monograph No 1* (1959).
105. M. J. Berger, Improved Points Kernels for electron and beta-ray dosimetry. NBSIR-73-107. *National Bureau of Standards*. Gaithersburg, MD (1973).
106. S. M. Seltzer, Electron-photon Monte Carlo calculations : the ETRAN code. *Appl. Radiat. Isot.* **42**, 917-41 (1991).
107. D. J. Simpkin and T. R. Mackie, EGS4 Monte Carlo determination of the beta dose kernel in water. *Med Phys* **17**, 179-186 (1990).
108. W. G. Cross, N. O. Freedman and P. Y. Wong, Beta-ray dose distributions from point sources in an infinite water medium. *Health Phys* **63**, 160-171 (1992).
109. E. Mainegra-Hing, D. W. Rogers and I. Kawrakow, Calculation of photon energy deposition kernels and electron dose point kernels in water. *Med Phys* **32**, 685-699 (2005).
110. L. Ferrer, N. Chouin, A. Bitar, A. Lisbona and M. Bardies, Implementing dosimetry in GATE: dose-point kernel validation with GEANT4 4.8.1. *Cancer Biother Radiopharm* **22**, 125-129 (2007).
111. S. H. Cho, O. N. Vassiliev and J. L. Horton, Jr., Comparison between an event-by-event Monte Carlo code, NOREC, and ETRAN for electron scaled point kernels between 20 keV and 1 MeV. *Radiat Environ Biophys* **46**, 77-83 (2007).
112. M. J. Berger, Energy deposition in water by photons from point isotropic sources. *J*

Nucl Med, Suppl 1:17-25 (1968).

113. E. E. Furhang, G. Sgouros and C. S. Chui, Radionuclide photon dose kernels for internal emitter dosimetry. *Med Phys* **23**, 759-764 (1996).

114. G. Luxton and G. Jozsef, Radial dose distribution, dose to water and dose rate constant for monoenergetic photon point sources from 10 keV to 2 MeV:EGS4 Monte Carlo model calculation. *Med Phys* **26**, 2531-2538 (1999).

115. A. K. Erdi, E. D. Yorke, M. H. Loew, Y. E. Erdi, M. Sarfaraz and B. W. Wessels, Use of the fast Hartley transform for three-dimensional dose calculation in radionuclide therapy. *Med Phys* **25**, 2226-2233 (1998).

116. H. B. Giap, D. J. Macey, J. E. Bayouth and A. L. Boyer, Validation of a dose-point kernel convolution technique for internal dosimetry. *Phys Med Biol* **40**, 365-381 (1995).

117. G. Akabani, W. G. Hawkins, M. B. Eckblade and P. K. Lechner, Patient-specific dosimetry using quantitative SPECT imaging and three-dimensional discrete Fourier transform convolution. *J Nucl Med* **38**, 308-314 (1997).

118. M. J. Berger, Monte Carlo calculation of the penetration and diffusion of fast charged particles. In : Alder B, Fernbach S, Rotenberg M, eds, *Methods in computational physics* vol. 1. New-York : Academic Press, 135-215 (1963).

119. D. E. Raeside, Monte Carlo principles and applications. *Phys Med Biol* **21**, 181-197 (1976).

120. P. Andreo, Monte Carlo techniques in medical radiation physics. *Phys Med Biol* **36**, 861-920 (1991).

121. H. Zaidi and G. Sgouros, *Therapeutic applications of Monte Carlo calculations in Nuclear Medicine*. London : Institute of Physics Publishing (2002).

122. H. Zaidi, Monte Carlo techniques in diagnostic and therapeutic nuclear medicine. In : "Proceeding series : Standards and codes of practice in medical radiation dosimetry", volume 2 :29-44, IAEA-CN-96-65, Vienna (2003).

123. J. F. Briesmeister, MCNPTM - A general Monte Carlo N-particle transport code, version 4B. Report LA-12625-M. Los Alamos, NM : Los Alamos National Laboratory (1997).

124. S. Agostinelli, J. Allison, and K. Amako, *Nucl Instrument Meth Phys Res A* **506**, 250-255 (2003).

125. F. Salvat, J. M. Fernandez-Varea and J. Sempau, PENELOPE- a code system for Monte Carlo simulation of electron and photon transport. Workshop Proceedings, ISBN 92-64-02145-0 (2003).

126. R. W. Howell, D. V. Rao and K. S. Sastry, Macroscopic dosimetry for radioimmunotherapy: nonuniform activity distributions in solid tumors. *Med Phys* **16**, 66-74 (1989).

127. C. S. Kwok, W. V. Prestwich and B. C. Wilson, Calculation of radiation doses for nonuniformity distributed beta and gamma radionuclides in soft tissue. *Med Phys* **12**, 405-412 (1985).

128. J. L. Humm, Dosimetric aspects of radiolabeled antibodies for tumor therapy. *J Nucl Med* **27**, 1490-1497 (1986).

129. G. M. Makrigiorgos, S. J. Adelstein and A. I. Kassis, Limitations of conventional internal dosimetry at the cellular level. *J Nucl Med* **30**, 1856-1864 (1989).

130. R. V. Griffith, The next decade in external dosimetry. *Health Phys* **55**, 177-189 (1988).

131. A. Malaroda, G. D. Flux, F. M. Buffa and R. J. Ott, Multicellular dosimetry in voxel geometry for targeted radionuclide therapy. *Cancer Biother Radiopharm* **18**, 451-461 (2003).

132. A. Malaroda, G. Flux and R. Ott, The application of dose-rate volume histograms and survival fractions to multicellular dosimetry. *Cancer Biother Radiopharm* **20**, 58-65 (2005).

133. A. I. Kassis, F. Fayad, B. M. Kinsey, K. S. Sastry, R. A. Taube and S. J. Adelstein, Radiotoxicity of ¹²⁵I in mammalian cells. *Radiat Res* **111**, 305-318 (1987).
134. D. E. Charlton, Radiation effects in spheroids of cells exposed to alpha emitters. *Int J Radiat Biol* **76**, 1555-1564 (2000).
135. C. J. Watchman, D. W. Jokisch, P. W. Patton, D. A. Rajon, G. Sgouros and W. E. Bolch, Absorbed fractions for alpha-particles in tissues of trabecular bone: considerations of marrow cellularity within the ICRP reference male. *J Nucl Med* **46**, 1171-1185 (2005).
136. C. J. Watchman, V. A. Bourke, J. R. Lyon, A. E. Knowlton, S. L. Butler, D. D. Grier, J. R. Wingard, R. C. Braylan and W. E. Bolch, Spatial distribution of blood vessels and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells within the marrow cavities of human cancellous bone. *J Nucl Med* **48**, 645-654 (2007).
137. J. A. Siegel, S. R. Thomas, J. B. Stubbs, M. G. Stabin, M. T. Hays, K. F. Koral, J. S. Robertson, R. W. Howell, B. W. Wessels, *et al.*, MIRD pamphlet no. 16: Techniques for quantitative radiopharmaceutical biodistribution data acquisition and analysis for use in human radiation dose estimates. *J Nucl Med* **40**, 37S-61S (1999).
138. A. I. Kassis, The MIRD approach: remembering the limitations. *J Nucl Med* **33**, 781-782 (1992).
139. P. L. Roberson, D. J. Buchsbaum, D. B. Heidorn and R. K. Ten Haken, Three-dimensional tumor dosimetry for radioimmunotherapy using serial autoradiography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **24**, 329-334 (1992).
140. L. G. Bouchet, W. E. Bolch, H. P. Blanco, B. W. Wessels, J. A. Siegel, D. A. Rajon, I. Clairand and G. Sgouros, MIRD Pamphlet No 19: absorbed fractions and radionuclide S values for six age-dependent multiregion models of the kidney. *J Nucl Med* **44**, 1113-1147 (2003).
141. M. Konijnenberg, M. Melis, R. Valkema, E. Krenning and M. de Jong, Radiation dose distribution in human kidneys by octreotides in peptide receptor radionuclide therapy. *J Nucl Med* **48**, 134-142 (2007).
142. D. V. Rao, G. F. Govelitz and K. S. Sastry, Radiotoxicity of thallium-201 in mouse testes: inadequacy of conventional dosimetry. *J Nucl Med* **24**, 145-153 (1983).
143. J. L. Humm, R. M. Macklis, K. Bump, L. M. Cobb and L. M. Chin, Internal dosimetry using data derived from autoradiographs. *J Nucl Med* **34**, 1811-1817 (1993).
144. J. L. Humm, R. M. Macklis, Y. Yang, K. Bump and L. M. Chin, Image analysis for the study of radionuclide distribution in tissue sections. *J Nucl Med* **35**, 1217-1225 (1994).
145. J. L. Humm, R. M. Macklis, X. Q. Lu, Y. Yang, K. Bump, B. Beresford and L. M. Chin, The spatial accuracy of cellular dose estimates obtained from 3D reconstructed serial tissue autoradiographs. *Phys Med Biol* **40**, 163-180 (1995).
146. G. Akabani, S. J. Kennel and M. R. Zalutsky, Microdosimetric analysis of alpha-particle-emitting targeted radiotherapeutics using histological images. *J Nucl Med* **44**, 792-805 (2003).
147. G. D. Flux, M. J. Guy, R. Beddows, M. Pryor and M. A. Flower, Estimation and implications of random errors in whole-body dosimetry for targeted radionuclide therapy. *Phys Med Biol* **47**, 3211-3223 (2002).
148. O. W. Press, J. F. Eary, F. R. Appelbaum, P. J. Martin, C. C. Badger, W. B. Nelp, S. Glenn, G. Butchko, D. Fisher, *et al.*, Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med* **329**, 1219-1224 (1993).
149. G. Sgouros, I. M. Jureidini, A. M. Scott, M. C. Graham, S. M. Larson and D. A. Scheinberg, Bone marrow dosimetry: regional variability of marrow-localizing antibody. *J Nucl Med* **37**, 695-698 (1996).
150. M. S. Kaminski, K. R. Zasadny, I. R. Francis, M. C. Fenner, C. W. Ross, A. W. Milik, J. Estes, M. Tuck, D. Regan, *et al.*, Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell

- lymphoma. *J Clin Oncol* **14**, 1974-1981 (1996).
151. R. W. Howell, B. W. Wessels, R. Loevinger, E. E. Watson, W. E. Bolch, A. B. Brill, N. D. Charkes, D. R. Fisher, M. T. Hays, et al., The MIRD perspective 1999. Medical Internal Radiation Dose Committee. *J Nucl Med* **40**, 3S-10S (1999).
152. J. F. Fowler, Radiobiological aspects of low dose rates in radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **18**, 1261-1269 (1990).
153. R. W. Howell, S. M. Goddu and D. V. Rao, Proliferation and the advantage of longer-lived radionuclides in radioimmunotherapy. *Med Phys* **25**, 37-42 (1998).
154. R. B. Wilder, G. L. DeNardo, S. Sheri, J. F. Fowler, B. W. Wessels and S. J. DeNardo, Application of the linear-quadratic model to myelotoxicity associated with radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med* **23**, 953-957 (1996).
155. A. R. Prideaux, H. Song, R. F. Hobbs, B. He, E. C. Frey, P. W. Ladenson, R. L. Wahl and G. Sgouros, Three-dimensional radiobiologic dosimetry: application of radiobiologic modeling to patient-specific 3-dimensional imaging-based internal dosimetry. *J Nucl Med* **48**, 1008-1016 (2007).
156. K. Sjogreen, M. Ljungberg, K. Wingardh, D. Minarik and S. E. Strand, The LundADose method for planar image activity quantification and absorbed-dose assessment in radionuclide therapy. *Cancer Biother Radiopharm* **20**, 92-97 (2005).
157. S. Chiavassa, I. Aubineau-Laniece, A. Bitar, A. Lisbona, J. Barbet, D. Franck, J. R. Jourdain and M. Bardies, Validation of a personalized dosimetric evaluation tool (Oedipe) for targeted radiotherapy based on the Monte Carlo MCNPX code. *Phys Med Biol* **51**, 601-616 (2006).
158. S. Chiavassa, M. Bardies, F. Guiraud-Vitoux, D. Bruel, J. R. Jourdain, D. Franck and I. Aubineau-Laniece, OEDIPE: a personalized dosimetric tool associating voxel-based models with MCNPX. *Cancer Biother Radiopharm* **20**, 325-332 (2005).
159. T. E. Wheldon and J. A. O'Donoghue, The radiobiology of targeted radiotherapy. *Int J Radiat Biol* **58**, 1-21 (1990).
160. S. P. Lee, M. Y. Leu, J. B. Smathers, W. H. McBride, R. G. Parker and H. R. Withers, Biologically effective dose distribution based on the linear quadratic model and its clinical relevance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **33**, 375-389 (1995).
161. R. G. Dale, Dose-rate effects in targeted radiotherapy. *Phys Med Biol* **41**, 1871-1884 (1996).
162. L. S. Lashford, I. J. Lewis, S. L. Fielding, M. A. Flower, S. Meller, J. T. Kemshead and D. Ackery, Phase I/II study of iodine 131 metaiodobenzylguanidine in chemoresistant neuroblastoma: a United Kingdom Children's Cancer Study Group investigation. *J Clin Oncol* **10**, 1889-1896 (1992).
163. M. N. Gaze, Y. C. Chang, G. D. Flux, R. J. Mairs, F. H. Saran and S. T. Meller, Feasibility of dosimetry-based high-dose 131I-meta-iodobenzylguanidine with topotecan as a radiosensitizer in children with metastatic neuroblastoma. *Cancer Biother Radiopharm* **20**, 195-199 (2005).
164. G. Akabani, I. Cokgor, R. E. Coleman, D. Gonzalez Trotter, T. Z. Wong, H. S. Friedman, A. H. Friedman, A. Garcia-Turner, J. E. Herndon, et al., Dosimetry and dose-response relationships in newly diagnosed patients with malignant gliomas treated with iodine-131-labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6 therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **46**, 947-958 (2000).
165. R. Barone, F. Borson-Chazot, R. Valkema, S. Walrand, F. Chauvin, L. Gogou, L. K. Kvols, E. P. Krenning, F. Jamar and S. Pauwels, Patient-specific dosimetry in predicting renal toxicity with (90)Y-DOTATOC: relevance of kidney volume and dose rate in finding a dose-effect relationship. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**, 99S-106S (2005).
166. W.P. Segars, Development and application of the new dynamic NURBS-based

cardiac-torso (NCAT) phantom, Biomedical Engineering. University of North Carolina: Chapel Hill, NC (2001).

**Chapitre II : Interactions
Rayonnements/matière et
Microdosimétrie des particules α .**

1 La radioactivité alpha :

La radioactivité alpha est une forme de désintégration radioactive où un noyau atomique éjecte une particule α et se transforme en un noyau de nombre de masse diminué de 4 et de numéro atomique diminué de 2.



Lors de la désintégration, une partie de l'énergie produite va être communiquée au noyau sous la forme d'une énergie de recul.

2 Les interactions rayonnements/matière :

Ce travail de thèse porte sur la dosimétrie des particules α dans le cadre de la RIT. Seules les interactions particules α /matière seront détaillées ici. Les électrons secondaires mis en mouvement à la suite des ionisations provoquées par le passage des particules α dans le matériau, ainsi que les particules β et γ émises par les émetteurs α d'intérêt en RIT vont également déposer de l'énergie lors d'interactions avec la matière. Ces interactions ne seront évoquées qu'à travers les hypothèses physiques des codes Monte-Carlo utilisés dans cette étude.

2.1 Les particules chargées :

La particule α est un noyau d'hélium composé de deux protons et deux neutrons. Il s'agit donc d'une particule chargée positivement. Les particules chargées lourdes, notamment les particules α , interagissent avec la matière essentiellement par la force de Coulomb.

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{qq'}{x^2} \quad (2-2)$$

F : force coulombienne

ϵ_0 : constante diélectrique

q : charge de la particule incidente

q' : charge de la particule cible

x : distance entre les deux particules

2.2 Les différentes interactions :

Une particule chargée passant au voisinage d'un atome peut interagir avec un des électrons ou avec le noyau de l'atome.

L'interaction des particules α avec les électrons peut être divisée en 2 classes :

- diffusions élastiques avec des électrons de l'atome (Figure 8),
- diffusions inélastiques avec des électrons de l'atome (Figure 9).

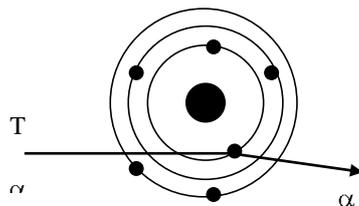


Figure 8: Diffusion élastique de la particule α .

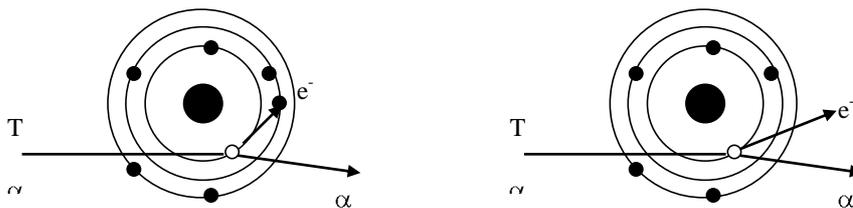


Figure 9: Diffusion inélastique : excitation (gauche) - Diffusion inélastique : ionisation (droite)

Dans le cas où la perte d'énergie est nulle et que la particule est simplement légèrement déviée, on parle de diffusion élastique. Si l'électron subit une perte d'énergie au cours de l'interaction, on parle de diffusion inélastique. L'énergie perdue est alors cédée à un électron du milieu. L'atome se retrouve dans un état excité ou ionisé.

Les interactions des particules α avec les noyaux des atomes peuvent être divisées selon les deux mêmes classes :

- diffusions élastiques avec les noyaux,
- diffusions inélastiques avec les noyaux.

Ces deux phénomènes sont relativement rares et l'énergie perdue par la particule α , le long de son parcours, en raison de ces deux interactions est très faible.

2.3 Pouvoir d'arrêt:

Le pouvoir d'arrêt d'un matériau est défini comme la perte moyenne d'énergie d'une particule chargée par unité de longueur quand cette particule traverse un matériau. Cette perte d'énergie est le résultat des interactions coulombiennes avec les électrons et les noyaux atomiques.

Pour les particules α , la contribution principale au pouvoir d'arrêt est le pouvoir d'arrêt électronique ou pouvoir d'arrêt par collision, noté S_{coll} , dû aux collisions inélastiques avec les électrons. Une contribution plus faible vient du pouvoir d'arrêt nucléaire, noté S_{nuc} , et qui est dû aux collisions élastiques coulombiennes au cours desquelles une énergie de recul est impartie aux noyaux. Le pouvoir d'arrêt nucléaire n'est important que pour des faibles énergies. Il contribue à plus de 1% du pouvoir d'arrêt total seulement pour des énergies inférieures à 150 keV pour des particules α . Le pouvoir d'arrêt radiatif, qui est important pour les électrons, est ici négligeable pour les particules α .

Dans le cadre de ce travail, on considèrera donc que le pouvoir d'arrêt total vaut donc :

$$S_{tot} = S_{coll} + S_{nuc} \quad (2-3)$$

2.3.1 Pouvoir d'arrêt électronique :

La formule du pouvoir d'arrêt électronique est issue des travaux de Bethe [1]. Pour une particule chargée lourde, le pouvoir d'arrêt électronique sera exprimé ainsi :

$$\frac{1}{\rho} S_{coll} = - \left(\frac{1}{\rho} \right) \left(\frac{dE}{dx} \right)_{el} = \frac{4\pi r_e^2 m c^2}{\beta^2} \frac{1}{u} \frac{Z}{A} z^2 L(\beta) \quad (2-4)$$

où,

r_e : rayon classique d'un électron

$m_e c^2$: énergie de l'électron

u : unité de masse atomique (1/12 de la masse de l'atome ^{12}C)

β : vitesse de l'électron divisée par la vitesse de la lumière

Z : numéro atomique

A : nombre de masse

z : nombre de charges de la particule.

La quantité L est appelée « nombre d'arrêt ». Les facteurs qui précèdent L dans l'équation décrivent les caractéristiques générales du processus de perte d'énergie. Le nombre d'arrêt, en revanche, prend en compte les détails plus fins. Ce terme peut être exprimé sous la forme d'une somme de trois facteurs :

$$L(\beta) = L_0(\beta) + zL_1(\beta) + z^2L_2(\beta) \quad (2-5)$$

Le premier terme correspond à :

$$L_0(\beta) = \frac{1}{2} \ln \left(\frac{2mc^2 \beta^2 W_m}{1 - \beta^2} \right) - \beta^2 - \ln I - \frac{C}{Z} - \frac{\delta}{2} \quad (2-6)$$

où I est le potentiel moyen d'excitation par atome, C est un terme de correction qui dépend de l'énergie et de Z lorsque l'on tient compte de la structure complète des noyaux (modèle en couche) de la matière, $\frac{\delta}{2}$ correspond à une correction due à l'effet de densité. W_m est la perte d'énergie maximale possible lors d'une collision avec un électron libre et est donnée par :

$$W_m = \frac{2mc^2\beta^2}{1-\beta^2} * \left[1 + 2(m/M)(1-\beta^2)^{-1/2} + (m/M)^2 \right]^1 \quad (2-7)$$

où m/M est le rapport de la masse de l'électron sur la masse de la particule incidente et mc^2 est l'énergie de l'électron au repos.

La théorie de Bloch a été développée sur la base de l'approximation de premier ordre de Born. Les termes zL_1 (correction de Barkas) et z^2L_2 (correction de Bloch) prennent en compte les écarts par rapport à cette approximation et sont importants pour les particules de faible vitesse.

Le terme z^2L_2 correspond à [1]:

$$z^2L_2(\beta) = -y^2 \sum_{n=1}^{\infty} [n(n^2 + y^2)]^{-1} \quad \text{avec } y = z\alpha/\beta \quad (2-8)$$

et $\alpha=1/137,036$, qui est la constante de structure fine.

La correction de Barkas [1] tient compte du fait que le pouvoir d'arrêt électronique dépend du signe de la charge de la particule.

Le terme L_1 est de la forme suivante :

$$L_1(\beta) = \frac{\gamma F_{ARB}(b/x^{1/2})}{Z^{1/2} x^{3/2}} \quad (2-9)$$

où

$$x = \frac{1}{Z} (\beta/\alpha)^2 \quad (2-10)$$

Le facteur γ provient de l'utilisation d'un modèle gazeux d'électron libre et est approximativement égal à $\sqrt{2}$. La quantité b est un paramètre normalisé d'impact minimal et sa valeur est traditionnellement comprise entre 1 et 2. Des tables de la fonction F_{ARB} peuvent être trouvées dans l'article d'Ashley *et al.* [2].

2.3.1.1 Correction des orbitales, C :

La formule du pouvoir d'arrêt de Bethe a été déduite en supposant que la vitesse du projectile est grande devant les vitesses des électrons de l'atome cible. Lorsque la vitesse du projectile diminue, la contribution du pouvoir d'arrêt qui provient des interactions avec les électrons de la couche K diminue fortement et à des vitesses encore plus faibles, les contributions des orbitales L et des orbitales plus externes sont réduites.

L'ICRU [1] considère une correction d'orbitales basée sur le travail de Bischel.

2.3.1.2 Potentiel moyen d'excitation, I :

Le potentiel d'excitation moyen est un paramètre qui ne dépend que des propriétés du milieu. Ces valeurs sont obtenues par des mesures expérimentales du pouvoir d'arrêt de certaines particules dans des matériaux. Pour des matériaux composés de plusieurs éléments, la loi d'additivité de Bragg [1] est utilisée pour déterminer I.

2.3.1.3 Correction due à l'effet de densité :

Le passage d'un projectile dans un milieu polarise ce dernier. La correction due à l'effet de densité prend en compte la réduction du pouvoir d'arrêt dû à cette polarisation. Cette correction est importante quand l'énergie cinétique de la particule est proche ou supérieure à l'énergie au repos.

2.3.2 Pouvoir d'arrêt nucléaire :

Le pouvoir d'arrêt massique nucléaire est obtenu en intégrant de façon pondérée les sections efficaces différentielles de diffusion élastique.

$$\frac{1}{\rho} S_{nuc}(T) = -2\pi N \int_0^{\infty} p \frac{dp}{d\theta} W(\theta, T) dp \quad (2-11)$$

où θ est l'angle de diffusion de la particule, N est le nombre d'atomes par gramme de matériau, p est le paramètre d'impact et l'énergie de transfert de recul de l'atome $W(\theta, T)$ est donnée par :

$$W(\theta, T) = W_M \sin^2(\theta/2) \quad (2-12)$$

et

$$W_M = 4T \frac{M_i M}{(M_i + M)^2} \quad (2-13)$$

est l'énergie de transfert maximale possible dans une collision élastique.

2.4 Parcours et pic de Bragg :

Si l'on considère que le pouvoir d'arrêt nucléaire est négligeable par rapport au pouvoir d'arrêt électronique, on peut, à partir de l'équation 2-4, représenter l'évolution du pouvoir d'arrêt total de la particule α en fonction de son énergie (Figure 10).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (Uncompressed)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 10 : Pouvoir d'arrêt total en fonction de l'énergie de la particule α .

Pour des énergies comprises entre $500 \cdot I$ (i.e. environ 1 MeV dans l'eau) et $3mc^2$ (environ 11 GeV pour une particule α), c'est le terme en $1/\beta^2$, modulé par le premier facteur logarithmique à variation relativement plus faible $\left(\frac{1}{2} \ln \left(\frac{2mc^2 \beta^2 W_m}{1 - \beta^2} \right) - \ln I\right)$, qui donne la

dépendance de $-dE/dx$ en fonction de l'énergie: une particule donnée perdra plus d'énergie par unité de longueur à faible qu'à grande vitesse.

La formule initiale de Bethe n'est plus valable lorsque la vitesse de la particule est comparable à la vitesse des électrons des atomes de l'absorbeur ($E = 500 \cdot I$). Il faut alors tenir compte des termes correctifs ajoutés à cette formule (notamment la correction d'orbitales). En outre, le pouvoir d'arrêt nucléaire n'est plus négligeable. Le pouvoir d'arrêt total diminue alors, lorsque l'énergie de la particule diminue. Finalement, la particule α capture deux électrons devient ainsi un atome neutre: le processus de perte d'énergie est alors achevé.

Le parcours de la particule α dans la matière est donc caractérisé par un pic de dépôt d'énergie vers la fin de celui-ci (Figure 11). Ce pic est appelé pic de Bragg. Son TEL passe, en effet, de 60 keV/ μm au début de son parcours à 240 keV/ μm au niveau du pic.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 11: Pouvoir d'arrêt de la particule α en fonction de la distance de pénétration dans la matière.

Les particules chargées lourdes ont, dans la matière, une trajectoire pratiquement rectiligne. On appelle parcours R la longueur de cette trajectoire. La relation entre le parcours et le pouvoir d'arrêt est donnée par :

$$R = \int_{E_{\text{ion}}}^0 dx = \int_0^{E_{\text{ion}}} \frac{dE}{(-dE/dx)} \quad (2-14)$$

La densité d'ionisation étant très élevée sur le parcours d'une particule α , celle-ci perdra très vite son énergie et aura donc un parcours restreint dans la matière. Les particules α émises par l' ^{211}At (7450 et 5867 keV) parcourront ainsi respectivement 70 et 48 μm dans l'eau.

Toutes les particules ne sont pas toutes arrêtées par une même épaisseur de matière : il y a une certaine variation de la longueur des parcours, due au processus aléatoire du ralentissement. Cette fluctuation statistique des pertes d'énergie de la particule chargée est couramment appelée straggling. Bien qu'il s'agisse d'un anglicisme, nous utiliserons ce mot par la suite.

3 La dosimétrie des particules alpha :

3.1 Utilisation des pouvoirs d'arrêt

Pour calculer la pénétration, la diffusion et le ralentissement des particules chargées dans la matière, on doit normalement utiliser l'ensemble des sections efficaces des pertes d'énergie et des déflections angulaires correspondant aux collisions élastiques et inélastiques coulombiennes. Dans le domaine de la dosimétrie des protons et des particules α , il est toutefois possible d'obtenir des résultats pertinents en utilisant seulement les pouvoirs d'arrêt et les parcours. C'est particulièrement le cas quand les approximations du ralentissement continu (CSDA) et du parcours rectiligne peuvent être appliquées.

Dans le cadre de l'hypothèse du CSDA, on néglige les fluctuations statistiques des pertes d'énergie de la particule chargée. On suppose au contraire que cette perte est continue le long de son parcours et est définie par un taux donné par le pouvoir d'arrêt.

Dans le cadre de l'approximation du parcours rectiligne, les déflexions angulaires dues aux multiples diffusions élastiques subies par la particule sont négligées. Il s'agit d'une bonne approximation pour les particules α (Figure 12), à l'exception de sa toute fin de parcours.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 12: Parcours de particules α de 4 MeV dans l'eau (Simulation Geant4). Les traces bleues correspondent aux particules α . Les traces rouges correspondant aux électrons secondaires mis en mouvement.

Il existe plusieurs sources de pouvoir d'arrêt des particules α dans de très nombreux matériaux. Différentes tables ont été publiées par Palmer [3], Kaplan [4], Ziegler [5] et l'ICRU [6]. Pour ce travail, nous avons choisi de nous servir des tables de l'ICRU, largement adoptées dernièrement. Des comparaisons de facteurs S ont été réalisées pour des tailles de cellules différentes entre ces quatre sources de pouvoir d'arrêt [7]. Des différences importantes, qui peuvent atteindre 40% ont été observées entre les facteurs S calculés avec les pouvoirs d'arrêt de l'ICRU et ceux de Kaplan. Les différences sont moins importantes entre les pouvoirs d'arrêt de Ziegler, Palmer et ceux de l'ICRU.

Il faut toutefois rappeler ici que les pouvoirs d'arrêt se réfèrent à la perte d'énergie incidente de la particule et non pas aux dépôts d'énergie dans la matière par cette même particule. Ces deux quantités seront différentes puisqu'une partie importante de l'énergie perdue est convertie en énergie cinétique communiquée à des électrons secondaires (delta rays). Le transport subséquent de ces électrons à travers la matière influencera donc les caractéristiques

spatiales des dépôts d'énergie.

En 1975, Kellerer [7] a montré que l'approximation qui consiste à ignorer la production d'électrons secondaires était acceptable dans le cadre de la dosimétrie des particules α .

3.2 Critères de l'applicabilité du TEL [7] :

Kellerer [7] s'est intéressé à la dosimétrie des particules chargées, et notamment des particules α , dans des régions microscopiques. La quantité d'énergie déposée par cette particule est une variable statistique et les différents facteurs mentionnés ci-dessous vont déterminer la densité de probabilité de cette distribution :

- le transfert d'énergie linéique ou TEL (analogue au pouvoir d'arrêt),
- le parcours des particules chargées,
- le straggling,
- la dissipation de l'énergie par les rayons delta ou électrons secondaires.

Le TEL n'est qu'une moyenne statistique des dépôts d'énergie par unité de longueur du parcours de la particule. Une analyse rigoureuse des dépôts d'énergie doit être basée sur les quantités microdosimétriques qui tiennent compte des processus stochastiques sous-tendant les dépôts d'énergie (straggling, delta rays).

Dans son étude, Kellerer a considéré la situation dans laquelle une particule α traverse un site sphérique de diamètre d . La quantité d'énergie déposée par cette particule est une variable statistique et les différents facteurs mentionnés ci-dessus vont déterminer la densité de probabilité de cette distribution. Kellerer a estimé l'impact de ces différents facteurs sur la variance de l'énergie impartie à la région cible. Il a ensuite délimité les régions relatives à la taille de la cible et à l'énergie des particules pour lesquelles l'utilisation du seul TEL est suffisante pour avoir une évaluation précise des dépôts d'énergie dans la cible (Figure 13).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 13: Régions de diamètre de site et d'énergie de particule dans lesquelles les dépôts d'énergie des événements individuels sont fortement influencés par le parcours (R), le straggling (S) et les rayonnements delta (δ). Dans la région II, les dépôts d'énergie sont approximativement proportionnels au TEL (d'après [7]).

On voit que pour une particule α d'énergie inférieure à 10 MeV, intervalle comprenant les particules α utilisées en médecine nucléaire, les dépôts d'énergie peuvent être déterminés précisément dans des cibles sphériques de diamètre supérieur à 1 μm en ne considérant que le TEL et le fait que les particules α ont un parcours fini. Ce résultat est extrêmement important pour la dosimétrie cellulaire des particules α et, combiné avec l'approximation du parcours rectiligne, permet l'utilisation de calculs analytiques pour la dosimétrie des particules α .

Au début de ce paragraphe, nous avons caractérisé la quantité d'énergie déposée par une particule α dans une région microscopique comme une variable statistique. Cette considération est l'objet de la microdosimétrie.

4 La microdosimétrie :

« Une des caractéristiques des radiations ionisantes est leur interaction discontinue avec la matière. La dose absorbée et le débit de dose absorbée sont définis comme des moyennes statistiques qui ne tiennent pas compte de ces fluctuations aléatoires. Pour la plupart des considérations radiobiologiques, ces quantités perdent donc toute signification propre [...] Cette variabilité est particulièrement conséquente pour des petits volumes, des doses faibles et pour des rayonnements très ionisants ; dans de nombreux cas, l'énergie déposée (à une certaine valeur de dose déposée) peut être nulle ou dépasser la valeur moyenne de plusieurs ordres de grandeur. On a donc besoin de concepts et de quantités pour spécifier les dépôts d'énergie dans les régions microscopiques. C'est le sujet et l'objectif de la microdosimétrie. » [8].

La microdosimétrie correspond à l'analyse systématique de la distribution microscopique des dépôts d'énergie dans la matière irradiée [9]. La microdosimétrie nous fournit des informations beaucoup plus complètes sur l'irradiation d'une structure biologique microscopique et semble donc plus appropriée pour étudier la réponse cellulaire aux particules α . L'énergie moyenne déposée par unité de masse (i.e. la dose absorbée) n'est pas le seul paramètre qui influence les effets des rayonnements sur les structures biologiques. Il semble que le nombre de dépôts d'énergie, leur amplitude ainsi que leur distribution spatiale soient également déterminants. On peut donc penser que les rayonnements qui diffèrent dans le nombre, la taille et la distribution des dépôts d'énergie provoquent des effets variables pour la même dose absorbée. Ceci a été observé expérimentalement et a été quantifié sous la forme du paramètre appelé efficacité biologique relative (EBR) caractéristique d'un type de rayonnement. Pour comprendre ces différences, il faut décrire avec la précision nécessaire la manière dont l'énergie est initialement déposée. Cette description requiert des informations détaillées sur la structure des traces générées dans un milieu irradié.

Dans le cadre de la microdosimétrie, des concepts ont été développés qui relient les principales caractéristiques de l'absorption des rayonnements dans la matière à la taille et à la nature des structures qui sont affectées.

Le terme microdosimétrie inventé par Rossi [10, 11] regroupe un cadre de travail conceptuel et les méthodes expérimentales correspondantes visant à l'analyse systématique de la distribution microscopique des dépôts d'énergie dans la matière irradiée. Des grandeurs stochastiques telles que l'énergie spécifique, z , (l'analogue microdosimétrique de la dose absorbée) et l'énergie linéale, y , (qui correspond au quotient de l'énergie impartie à un volume de matière par un seul événement de dépôt d'énergie sur la longueur de corde moyenne dans ce volume) ont été définies et mesurées. Ces quantités décrivent les événements de dépôt d'énergie dans des structures microscopiques, par exemple des petits

volumes sphériques. Ces quantités et leur densité de probabilité sont des concepts clé en microdosimétrie [9].

Nous ferons, dans ce travail, une distinction nette entre la microdosimétrie et l'analyse de traces [12, 13].

L'analyse de traces consiste à étudier la trace de la particule point par point d'interaction et analyser chaque dépôt d'énergie distinctement. Elle a connu un grand essor dans les années 90, lié au développement de la méthode Monte-Carlo et à la puissance croissante des moyens de calcul permettant de simuler les processus physiques élémentaires moyennant la connaissance des paramètres d'interaction dans le milieu considéré. De par son principe, l'analyse de traces permet d'examiner distinctement tous les processus impliqués, ionisations et excitations en particulier, et apporte des données d'entrée permettant d'évaluer plus avant le comportement temporel des espèces physiques et chimiques créées, voire des phénomènes biochimiques radioinduits. Les quelques modèles d'analyse de traces développés (CPA100 [14], MOCA14 [15], PARTRACK [16], PITS [17]) permettent de modéliser les effets des interactions rayonnement/matière à une résolution que la biologie en général n'atteint pas. Il s'agit d'outils de recherche fondamentale pour lesquels les validations expérimentales sont peu nombreuses.

Dans le contexte d'une équipe de recherche appliquée, nous nous sommes avant tout intéressés à la microdosimétrie.

4.1 Quelques définitions et grandeurs de la microdosimétrie :

À ce point de l'étude, il semble important de définir précisément quelques paramètres clé utilisés dans le domaine de la microdosimétrie. Ces définitions sont issues du rapport 36 de l'ICRU [9].

Un dépôt d'énergie ε_i est l'énergie déposée lors d'une seule interaction i et est égal à :

$$\varepsilon_i = T_{in} - T_{out} + Q_{\Delta m} \quad (2-15)$$

T_{in} est l'énergie de la particule incidente,

T_{out} est la somme des énergies de toutes les particules ionisantes quittant l'interaction (particule primaire + particules mises en mouvement lors de l'interaction),

$Q_{\Delta m}$ correspond aux modifications de la masse au repos de l'atome et de toutes les particules impliquées dans l'interaction ($Q_{\Delta m} > 0$: diminution de la masse au repos ; $Q_{\Delta m} < 0$: augmentation de la masse au repos).

ε_i est une grandeur stochastique et peut être considéré comme l'énergie déposée au point d'interaction (aussi appelé point de transfert).

Une trace représente l'intégralité des points de transferts d'énergie T_i et des transferts d'énergie ε_i dans un milieu dû au passage d'une particule et aux particules secondaires mises en mouvement par cette particule primaire.

Un événement est défini en microdosimétrie comme un dépôt d'énergie dans une région dû à une particule primaire et aux particules secondaires mises en mouvement lors des interactions de cette particule primaire.

L'énergie, ε , impartie à la matière dans un volume est :

$$\varepsilon = \sum_i \varepsilon_i \quad (2-16)$$

où la somme est réalisée sur l'ensemble des dépôts d'énergie dans ce volume. ε est aussi une grandeur stochastique. Les dépôts d'énergie pris en compte peuvent être le résultat d'un ou

plusieurs évènements de dépôt d'énergie, c'est-à-dire dûs à une ou plusieurs traces, statistiquement indépendantes.

L'énergie spécifique, z , est le quotient de ε sur m , où ε est l'énergie impartie par les rayonnements ionisants à une masse m de matière :

$$z = \frac{\varepsilon}{m} \quad (2-17)$$

z est une grandeur stochastique.

De manière rigoureuse, on devrait utiliser le terme d'énergie massique en français pour z . Nous choisirons ici d'utiliser le terme d'énergie spécifique par analogie avec l'anglais.

On considère souvent la distribution de probabilité de z . La valeur de cette fonction de distribution, $F(z)$, est la probabilité que l'énergie spécifique soit égale ou inférieure à z . La densité de probabilité, $f(z)$, est la dérivée de $F(z)$ selon z :

$$f(z) = \frac{dF(z)}{dz} \quad (2-18)$$

La densité de probabilité $f(z)$ comprend une composante discrète (une fonction Dirac) à $z=0$ pour la probabilité d'absence de dépôt d'énergie. La valeur moyenne:

$$\bar{z} = \int_0^{\infty} z f(z) dz \quad (2-19)$$

est appelée énergie spécifique moyenne. \bar{z} est une quantité non-stochastique.

L'énergie spécifique peut être déposée lors d'un ou plusieurs événements. La fonction de distribution de l'énergie spécifique déposée lors d'un seul événement, $F_1(z)$, est la probabilité conditionnelle qu'une énergie spécifique inférieure ou égale à z soit déposée si un événement a eu lieu. La densité de probabilité, $f_1(z)$ est la dérivée de $F_1(z)$ en fonction de z :

$$f_1(z) = \frac{dF_1(z)}{dz} \quad (2-20)$$

Cette distribution est aussi appelée distribution « simple-coup » (« single-hit ») de z .

La valeur moyenne,

$$\bar{z}_F = \int_0^{\infty} z f_1(z) dz \quad (2-21)$$

est appelée moyenne fréquentielle (« frequency-mean ») de l'énergie spécifique par événement.

Le nombre, n , d'évènements de dépôt d'énergie qui ont contribué à une énergie spécifique, z , est, en général, distribué au hasard et peut être décrit par une distribution de Poisson. Le nombre moyen d'évènements, \bar{n} , est le quotient de l'énergie moyenne spécifique, \bar{z} , sur la moyenne fréquentielle de l'énergie spécifique par événement, \bar{z}_F .

$$\bar{n} = \frac{\bar{z}}{\bar{z}_F} \quad (2-22)$$

L'énergie linéale, y , est le quotient de ε par \bar{l} , où ε est l'énergie impartie à un volume de matière par un seul événement de dépôt d'énergie et \bar{l} est la longueur de corde moyenne dans ce volume :

$$y = \frac{\varepsilon}{\bar{l}} \quad (2-23)$$

La longueur de corde moyenne dans un volume est la longueur moyenne des cordes orientées de façon aléatoire dans ce volume.

L'énergie linéale est une grandeur stochastique. Il est utile de considérer la fonction de distribution de y . La valeur de la fonction de distribution, $F(y)$, est la probabilité que l'énergie linéale soit égale ou inférieure à y . La densité de probabilité $f(y)$ est la dérivée de $F(y)$ selon y :

$$f(y) = \frac{dF(y)}{dz} \quad (2-24)$$

On l'appelle aussi distribution d'énergie linéale. Il faut garder à l'esprit que y est défini pour des événements simples seulement. La distribution d'énergie linéale est indépendante de la dose absorbée ou du débit de dose.

La valeur moyenne:

$$\bar{y}_F = \int_0^{\infty} y f(y) dz \quad (2-25)$$

est appelée moyenne fréquentielle de l'énergie linéale.

4.2 Méthodes de calcul:

Il existe deux types de méthodes de calcul utilisées en microdosimétrie :

- les méthodes dites analytiques,
- les méthodes Monte-Carlo.

Les deux méthodes utilisent les mêmes données en entrée. Il s'agit des sections efficaces d'interactions ou des pouvoirs d'arrêt qui permettent de calculer les événements de dépôts d'énergie. Le premier objectif de ces deux méthodes est de déterminer la fonction $f_1(\varepsilon)$ ou son équivalent $f_1(z)$, qui correspondent à la densité de probabilité de l'énergie impartie (ou de l'énergie spécifique) pour un événement simple ayant lieu dans un volume d'intérêt (souvent une sphère).

À partir du spectre $f_1(z)$, il est possible de déterminer le spectre d'énergie spécifique en fonction de la dose absorbée $f(z; D)$. Pour des raisons de simplification, nous noterons par la suite ce spectre $f(z)$. Il correspond à la prise en compte de l'accumulation d'événements multiples dans un volume lorsque la dose absorbée augmente.

4.2.1 Méthodes analytiques :

Une des hypothèses de base de ces méthodes est que l'équilibre des particules chargées est établi, c'est-à-dire que les particules chargées secondaires sont produites de façon uniforme

dans un volume à partir duquel elles peuvent atteindre le volume d'intérêt. La seconde hypothèse, très souvent retenue, est l'approximation du ralentissement continu des particules chargées (CSDA en anglais). On suppose alors que l'énergie cinétique varie d'une manière non-stochastique le long du parcours de la particule, tel qu'il y ait une relation unique qui lie la distance parcourue et l'énergie résiduelle de la particule. Le débit de perte d'énergie le long de la trace correspond à la perte d'énergie moyenne par unité de distance, c'est-à-dire le pouvoir d'arrêt linéaire de collision. L'approximation du parcours rectiligne du parcours des particules α est également adoptée.

4.2.2 Méthodes Monte-Carlo :

Dans un calcul Monte-Carlo, une particule primaire et les particules secondaires qui lui sont associées sont suivies dans la matière en considérant toutes leurs interactions jusqu'à ce que leur énergie cinétique soit nulle ou que les interactions suivantes puissent être négligées. Comme défini dans le chapitre I, la caractéristique principale des calculs MC est que chaque processus individuel d'interaction est obtenu à partir d'une série de nombres aléatoires créés par un générateur. Pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, il convient souvent de simuler un nombre important (plusieurs millions) de particules. Le générateur de nombres aléatoires est, par conséquent, un élément critique de la méthode MC.

4.2.3 Choix d'une méthode de calcul:

La méthode MC permet d'inclure dans le calcul la quasi-totalité des effets physiques (straggling du dépôt d'énergie, production des rayonnements delta, diffusion des particules). Avec cette méthode, il n'est également pas indispensable de supposer l'équilibre des rayonnements comme dans le calcul analytique. Le calcul MC fournit donc *a priori* des résultats plus précis, plus proches des résultats observés expérimentalement. Toutefois, dans le cadre de la méthode MC, les temps de calculs peuvent s'avérer très importants.

Le choix de la méthode de calcul réside donc dans un équilibre entre précision et temps de calcul. Ce choix sera également dépendant des particules primaires utilisées. Les approximations des méthodes analytiques sont par exemple beaucoup moins préjudiciables pour la précision du résultat lorsque l'on étudie des particules α par rapport à des électrons.

4.2.4 Calcul de $f(z)$:

Le nombre moyen d'évènements de dépôts d'énergie dans un volume, \bar{n} , est donné par l'équation 2-22.

Il est traditionnellement admis que le nombre d'évènements de dépôts d'énergie, n , est distribué de façon aléatoire et que sa fonction de distribution, $p(n)$ est représentée par une distribution de Poisson :

$$p(n) = \frac{\bar{n}^n}{n!} e^{-\bar{n}} \quad (2-26)$$

Le spectre $f(z)$ peut être calculé en sommant tous les évènements n et les distributions $f_n(z)$ correspondantes, pour exactement n évènements de dépôts d'énergie :

$$f(z) = \sum_n p(n) f_n(z) \quad (2-27)$$

La densité de probabilité de z pour exactement n évènements de dépôts d'énergie, $f_n(z)$ peut être déduite par une convolution itérative de $f_1(z)$:

$$f_n(z) = \int_0^z f_{n-1}(s) f_1(z-s) ds \quad (2-28)$$

Considérant que $p(n)$ suit une distribution de Poisson, on a donc :

$$f(z) = \sum_{n=0}^{+\infty} \left\{ [f_1(z)]^{*n} \times \frac{e^{-\bar{n}}}{n!} \bar{n}^n \right\} \quad (2-29)$$

Le signe « * » désigne la convolution des distributions $f_1(z)$.

Lorsque le nombre d'évènements devient trop important, le calcul de convolution devient difficile. Ce problème peut être résolu en utilisant le théorème de convolution discrète et la technique de la transformée de Fourier [18, 19].

On peut alors écrire :

$$F\{f(z)\} = F \left\{ \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{\bar{n}^n}{n!} e^{-\bar{n}} f_n(z) \right) \right\} = \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{\bar{n}^n}{n!} e^{-\bar{n}} [F\{f_1(z)\}]^n \right) \quad (2-30)$$

Après avoir rappelé que le développement limité de la fonction exponentielle est :

$$e(x) = \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{x^n}{n!}, \quad (2-31)$$

on a donc :

$$F\{f(z)\} = \exp[-\bar{n}(1 - F\{f_1(z)\})] \quad [27] \quad (2-32)$$

En adoptant les notations qui identifient T et T_1 aux transformées de Fourier ou Laplace de $f(z)$ et $f_1(z)$, on a donc :

$$T = \exp[-\bar{n}(1 - T_1)] \quad (2-33)$$

Cette équation est l'équation fondamentale de la microdosimétrie.

4.3 Critères d'applicabilité de la microdosimétrie :

Le calcul dosimétrique est plus exigeant d'un point de vue de son implémentation et des temps de calculs qu'un calcul macrodosimétrique. Il convient donc de déterminer dans quelles situations, on doit utiliser une approche microdosimétrique. Une réponse directe à cette question consiste à dire qu'un calcul microdosimétrique est indispensable lorsque les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie au sein d'une cible sont grandes et ne peuvent pas être négligées. Un critère plus quantitatif a été établi par Kellerer [20] et a été repris dans le rapport 36 de l'ICRU [9]. Ce critère repose sur la définition de doses faible et élevée à partir de grandeurs microdosimétriques telles que l'énergie spécifique ou la moyenne

fréquentielle de l'énergie spécifique par événement, \bar{z}_F . Ces grandeurs sont associées à un volume spécifique de dimensions microscopiques. Pour des volumes de dimensions aussi faibles, l'énergie spécifique dans les volumes affectés (i.e. les volumes qui reçoivent au moins un événement de dépôt d'énergie) \bar{z}^\perp n'est pas nécessairement égal à la dose D.

La relation liant \bar{z}^\perp à D est de la forme :

$$\bar{z}^\perp = \frac{D}{1 - e^{-D/\bar{z}_F}} = \frac{D}{1 - e^{-\bar{n}}} \quad (2-34)$$

On le voit \bar{z}^\perp sera considéré égal à D si \bar{n} est suffisamment grand. Pour des valeurs de dose absorbée plus faibles, on aura $\bar{z}^\perp > D$ et si le nombre moyen d'événements de dépôts d'énergie est beaucoup plus petit que 1, on aura $\bar{z}^\perp = \bar{z}_F$, la moyenne fréquentielle de l'énergie spécifique par événement. Par conséquent, on peut utiliser le nombre d'événements de dépôts d'énergie dans un volume pour une dose absorbée donnée et la relation correspondante entre \bar{z}_F et D pour préciser la notion de doses faible et élevée.

On parle de dose faible si la dose absorbée est inférieure à 20% de \bar{z}_F . Dans ce cas moins de 18% du volume sensible est touché par un événement de dépôts d'énergie et moins de 2% est touché par plus d'un événement de dépôts d'énergie. Dans cette région de faibles doses, on le voit, les valeurs d'énergies spécifiques dans les volumes affectés sont indépendants de la dose absorbée. Ce qui varie avec la dose absorbée est le nombre de volumes affectés. La dose absorbée peut être qualifiée d'élevée quand l'écart type relatif de la distribution de l'énergie spécifique est inférieur à 20%. Cette région de doses élevées est la région dans laquelle les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie sont relativement insignifiants.

La région de doses comprise entre les doses faibles et les doses élevées est appelée région des doses moyennes. La limite entre les régions de faibles doses et de doses moyennes marque la différence entre des effets dûs à un événement simple et les effets dûs à des événements multiples. La limite entre les régions de doses moyennes et de doses élevées délimite les zones d'utilisation de la microdosimétrie et de la macrodosimétrie. La position de ces deux frontières va dépendre de la qualité du rayonnement et de la taille du volume d'intérêt.

Humm [21] rappelle que la grandeur et l'importance des fluctuations stochastiques dans les volumes cibles dépendent principalement :

- de la taille de la cible,
- de l'énergie et du LET des particules
- du nombre relatif de particules traversant la cible.

Dans le cadre d'études dosimétriques cellulaires avec des particules α , les fluctuations stochastiques des dépôts d'énergie seront donc importantes puisque :

- le diamètre de la cible est inférieur de 15 μm ,
- le TEL moyen des particules est environ égal à 100 keV/ μm ,
- seules deux particules α sont nécessaires, parfois, pour tuer une cellule [22].

Dans le cadre d'analyse d'expériences d'irradiation cellulaire par des particules α , il est donc indispensable de posséder un modèle microdosimétrique.

4.4 Modèles et méthodes existant pour la microdosimétrie des particules α :

Les premiers travaux portant sur la microdosimétrie des particules α ont été réalisés par Roesch en 1977 [19]. Il est le premier à définir le concept de microdosimétrie interne, par

lequel il décrit des méthodes microdosimétriques qui ne considèrent plus des faisceaux larges d'irradiation où l'équilibre des rayonnements existe mais des distributions non-uniformes de radioéléments dans la matière irradiée. Les sources radioactives considérées dans ce modèle sont des agrégats d'atomes radioactifs (particulates en anglais). Des spectres microdosimétriques sont calculés pour différentes géométries et énergies de particules α .

En 1986, Fisher présente au 4^e Symposium international de dosimétrie des radiopharmaceutiques un modèle permettant de calculer les spectres microdosimétriques résultant d'irradiations α pour un très grand nombre de géométries. Les calculs reposent sur une méthode analytique. En 1987, Humm [23] utilise une méthode Monte-Carlo pour établir les distributions d'énergie spécifique dans les noyaux de cellules tumorales irradiées par des anticorps radiomarqués circulant dans un capillaire au cœur de la tumeur ou par des anticorps radiomarqués distribués de façon uniforme dans la tumeur. En 1992, Stinchcomb et Roeske [24] reprennent l'article initial de Roesch et adaptent les méthodes de calcul microdosimétrique décrites à l'utilisation d'anticorps radiomarqués. Les résultats d'un modèle basé sur une méthode analytique sont comparés à ceux fournis par une méthode Monte-Carlo. Un très bon accord est observé pour l'ensemble des géométries d'irradiation étudiées. Depuis de très nombreux modèles ont été développés à travers le monde reposant sur des calculs analytiques [25] ou Monte-Carlo [26, 27, 28, 29]. Récemment, ces modèles ont été complexifiés afin d'inclure, par exemple, la prise en compte de la diffusion de radioéléments fils lors d'une chaîne de désintégrations [30] ou les distributions de rayons cellulaires et nucléaires ainsi que les distributions d'activité fixée par les cellules au sein d'une population cellulaire [31].

Il n'existe qu'un seul modèle commercialement disponible sous la forme d'une feuille Excel développée par Roeske [32]. Celle-ci ne permet pas de prendre en compte l'impact du feu croisé sur les distributions d'énergie spécifique reçues par les cellules et ne s'applique donc qu'à des géométries cellulaires simples (cellule isolée).

4.5 Conclusion

Les particules α sont émises lors de la désintégration de radioéléments possédant un numéro atomique élevé. Les particules α sont en fait des noyaux d'hélium composés de deux neutrons et deux protons. Il s'agit donc de particules chargées qui vont perdre leur énergie le long de leur parcours lors de collisions avec des électrons du milieu. La perte d'énergie des particules α par unité de longueur de parcours est donnée par le pouvoir d'arrêt calculé par la formule de Bethe-Bloch. Ces pertes d'énergie sont caractérisées par un pic, appelé pic de Bragg, vers la fin du parcours.

La dosimétrie des particules α à l'échelle des cellules peut être réalisée en utilisant seulement leur pouvoir d'arrêt. Kellerer a en effet montré que l'impact de la production des électrons secondaires et du straggling le long du parcours des particules α sur les dépôts d'énergie dans un volume de dimensions micrométriques pouvait être négligé. L'approximation du ralentissement continu pourra donc être appliquée. On peut également faire l'approximation que les particules α ont un parcours rectiligne. Ces considérations permettent de réaliser la dosimétrie des particules α à l'aide d'un calcul analytique.

La quantité d'énergie déposée par une particule α dans une cible de dimensions micrométriques est une variable statistique dont les fluctuations sont significatives. La microdosimétrie permet de prendre en compte ces fluctuations.

La microdosimétrie correspond, en effet, à l'analyse systématique de la distribution microscopique des dépôts d'énergie dans la matière irradiée. Cette approche nous fournit des informations beaucoup plus complètes sur l'irradiation d'une structure biologique microscopique et semble donc appropriée pour étudier la réponse cellulaire aux particules α . L'emploi de la microdosimétrie est particulièrement recommandé dans le cadre d'études d'irradiations cellulaires par des particules α .

La microdosimétrie, telle que nous l'avons définie, par opposition avec l'analyse de traces, n'est pas une méthode mécanistique qui vise à expliquer les mécanismes biochimiques et biophysiques qui produisent les dommages cellulaires. Il s'agit, au contraire, d'un outil phénoménologique qui semble approprié pour étudier les effets des rayonnements dans le cadre d'applications pré-cliniques ou cliniques.

L'objectif de notre travail de thèse a été de développer un modèle extrêmement complet permettant de simuler toutes les situations expérimentales rencontrées lors d'irradiations cellulaires *in vitro* et de calculer les spectres microdosimétriques correspondants.

Le modèle implémenté repose sur une méthode de calcul analytique afin de réduire les temps de calculs.

L'intérêt de la méthode microdosimétrique dans la prédiction de la toxicité d'une irradiation α a été évalué. Le modèle développé a ensuite été appliqué à l'analyse de données expérimentales. Une étude de faisabilité de la modélisation d'un traitement de RIT- α a enfin été réalisée.

Bibliographie

1. ICRU Report 37, Stopping powers for electrons and positrons. Bethesda, MD, USA (1984).
2. J. C. Ashley, V. E. Anderson, R. H. Ritchie and W. Brandt, Z_1^3 effects in the stopping power of matter for charged particles : tables of functions. Document No. 021195, National Auxiliary Publication Service, New York (1974).
3. R. B. J. Palmer and A. Akhavan-Rezayat, The stopping power of water, water vapour and aqueous tissue equivalent solution for alpha particles over the energy range 0.5-8 MeV. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **11**, 605-616 (1978).
4. I. Kaplan, Nuclear physics. Reading: Addison-Wesley, (1963).
5. J. F. Ziegler, Helium stopping powers and ranges in all elemental matter. Pergamon, New York (1977).
6. ICRU Report 49, Stopping Powers and Ranges for Protons and Alpha Particles. Bethesda, MD, USA (1993).
7. A. M. Kellerer and D. Chmelevsky, Criteria for the applicability of LET. *Radiat Res* **63**, 226-234 (1975).
8. A. M. Kellerer, Fundamentals of microdosimetry. In: The dosimetry of ionizing radiation, vol I. KR Kase (ed.) Academic Press, New York, 123-140 (1985).
9. ICRU Report 36, Microdosimetry. Bethesda, MD, USA (1983).
10. H. H. Rossi and W. Rosenzweig, A device for the measurement of dose as a function of specific ionization. *Radiology* **64**, 404-411 (1955).
11. H. H. Rossi, Specification of radiation quality. *Radiat Res* **10**, 522-531 (1959).
12. D. T. Goodhead DT Relationship of microdosimetric techniques to applications in biological systems. In: The dosimetry of ionizing radiation, vol II. KR Kase (ed.) Academic Press, Orlando (1987).
13. H. Nikjoo, S. Uehara, W. E. Wilson, M. Hoshi and D. T. Goodhead, Track structure in radiation biology: theory and applications. *Int J Radiat Biol* **73**, 355-364 (1998).
14. M. Terrissol, S. Edel and E. Pomplun, Computer evaluation of direct and indirect damage induced by free and DNA-bound iodine-125 in the chromatin fibre. *Int J Radiat Biol* **80**, 905-908 (2004).
15. W. E. Wilson, H. G. Paretzke, Calculation of distribution of energy imparted and ionisations by fast protons in nanometer sites. *Radiat Res* **81**, 521-537 (1981).
16. M. Dingfelder, D. Hantke, M. Inokuti, H. G. Paretzke, Electron inelastic-scattering cross sections in liquid water. *Radiat Phys Chem* **53**, 1-18 (1998).
17. W. E. Wilson, H. Nikjoo, A Monte Carlo code for Positive Ions Track Simulation. *Radiat Environm Biophys* **38**, 97-104 (2000).
18. A. M. Kellerer, W. Bell, Theory of microdosimetry. In: Annual Report on Research Project, USAEC, NYO-2740-7, 73-90 (1970).
19. W. C. Roesch, Microdosimetry of internal sources. *Radiat Res* **70**, 494-510 (1977).
20. A. M. Kellerer and D. Chmelevsky, Concepts of microdosimetry. III. Mean values of the microdosimetric distributions. *Radiat Environ Biophys* **12**, 321-335 (1975).
21. J. L. Humm, J. C. Roeske, D. R. Fisher and G. T. Chen, Microdosimetric concepts in radioimmunotherapy. *Med Phys* **20**, 535-541 (1993).
22. E. L. Lloyd, M. A. Gemmell, C. B. Henning, D. S. Gemmell and B. J. Zabransky, Transformation of mammalian cells by alpha particles. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **36**, 467-478 (1979).
23. J. L. Humm, A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **13**, 1767-1773 (1987).
24. T. G. Stinchcomb and J. C. Roeske, Analytic microdosimetry for radioimmunotherapeutic alpha emitters. *Med Phys* **19**, 1385-1393 (1992).

25. D. E. Charlton and R. Sephton, A relationship between microdosimetric spectra and cell survival for high-LET irradiation. *Int J Radiat Biol* **59**, 447-457 (1991).
26. W. B. Li and W. Z. Zheng, Microdosimetry Computation Code for Internal Sources. *Radiat. Prot. Dosim.* **67**, 215-220 (1996).
27. R. H. Larsen, G. Akabani, P. Welsh and M. R. Zalutsky, The cytotoxicity and microdosimetry of astatine-211-labeled chimeric monoclonal antibodies in human glioma and melanoma cells in vitro. *Radiat Res* **149**, 155-162 (1998).
28. E. Aurlien, R. H. Larsen, G. Akabani, D. R. Olsen, M. R. Zalutsky and O. S. Bruland, Exposure of human osteosarcoma and bone marrow cells to tumour-targeted alpha-particles and gamma-irradiation: analysis of cell survival and microdosimetry. *Int J Radiat Biol* **76**, 1129-1141 (2000).
29. D. E. Charlton, Radiation effects in spheroids of cells exposed to alpha emitters. *Int J Radiat Biol* **76**, 1555-1564 (2000).
30. S. Palm, J. L. Humm, R. Rundqvist and L. Jacobsson, Microdosimetry of astatine-211 single-cell irradiation: role of daughter polonium-211 diffusion. *Med Phys* **31**, 218-225 (2004).
31. Y. Kvinnsland, T. Stokke and E. Aurlien, Radioimmunotherapy with alpha-particle emitters: microdosimetry of cells with a heterogeneous antigen expression and with various diameters of cells and nuclei. *Radiat Res* **155**, 288-296 (2001).
32. J. C. Roeske and M. Hoggarth, Alpha-particle Monte Carlo simulation for microdosimetric calculations using a commercial spreadsheet. *Phys Med Biol* **52**, 1909-1922 (2007).

Chapitre III : Modèle implémenté et validations

Nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il n'existe actuellement qu'un seul modèle microdosimétrique disponible commercialement. Ce modèle est incomplet puisqu'il ne permet pas, entre autres, de simuler des géométries complexes. Ces géométries pour lesquelles les cellules sont regroupées en monocouche ou sous la forme de sphéroïde sont très souvent rencontrées lors d'expériences *in vitro*. Notre modèle a été initialement développé pour analyser les résultats des expériences *in vitro* menées par les biologistes du groupe « RIT- α » de l'Inserm U892. Ces données étaient très nombreuses, il nous fallait donc une méthode de calcul rapide pour les exploiter. L'idée de développer un modèle pseudo-analytique s'est très vite imposée. Ce modèle a été complété au fil des échanges avec les biologistes afin de mieux prendre en compte les interactions entre les anticorps et les cellules ainsi que les conditions expérimentales particulières.

Les méthodes de calcul et fonctionnalités du logiciel développé seront présentées dans la première partie.

L'implémentation de l'algorithme de ce modèle a été validée par une étude comparative avec deux codes Monte-Carlo. L'impact des hypothèses simplificatrices faites pour la géométrie des cellules a également été évalué. Ces résultats seront détaillés dans la seconde partie de ce chapitre.

1 Présentation générale du modèle

1.1 Objectifs du modèle :

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle basé sur une méthode de calcul microdosimétrique. Ce modèle a pour finalité de déterminer les distributions d'énergie spécifique ($f_1(z)$ et $f(z)$) dans les structures cellulaires ou subcellulaires d'intérêt (noyau, cytoplasme ou cellule entière). Il permet également de déterminer l'ensemble des données macrodosimétriques pertinentes : dose moyenne absorbée, nombre moyen de coups reçus par la cible considérée, probabilité pour la cible de ne pas être touchée, origine de la dose (part de la dose auto-absorbée, self-dose, de la dose provenant du feu croisé, cross-dose, ou de la dose provenant du milieu dans la dose totale). Enfin, pour des structures géométriques complexes (cluster de cellules), le programme fournit une image de la géométrie en format Pov-Ray (Persistence of Vision Pty. Ltd., Williamstown, Victoria, Australia. <http://www.povray.org/>). Les différents paramètres macrodosimétriques mentionnés ci-dessus peuvent alors être représentés par un code couleur.

Le modèle a été développé pour analyser des données d'expériences *in vitro*, mais une adaptation de ce code pour une utilisation *in vivo* est aisément réalisable. L'idée au cours de sa conception a été de développer un outil très complet :

- Toutes les géométries rencontrées au cours des expériences *in vitro* peuvent être implémentées dans le modèle (cellule isolée, monocouche de cellules, cluster de cellules).
- Une modification des conditions d'irradiation au cours de l'expérience peut être prise en compte (e.g. irradiation de cellules isolées qui sédiment et se regroupent au fond d'un puits de culture sous la forme d'une monocouche).
- Toutes les distributions de sources à l'intérieur des différents compartiments cellulaires (noyau, cytoplasme, surface de la cellule ou cellule entière) sont envisageables. Les désintégrations ayant lieu dans le surnageant autour des cellules sont également prises en compte.

- Il est possible de considérer une distribution de rayons cellulaires ou une distribution de l'activité fixée par les cellules au sein d'une population cellulaire.
- Un modèle simple de la fixation des anticorps radiomarqués est également disponible afin de faciliter la saisie des données d'entrée par l'utilisateur.
- Un module permet le calcul de la survie des cellules irradiées à partir des spectres microdosimétriques calculés.

Ce logiciel est très modulable. Son architecture algorithmique en langage orienté objet (C++) permet d'ajouter facilement de nouveaux modules susceptibles d'affiner ou de compléter le modèle.

Le grand atout de ce modèle est qu'il repose sur un calcul pseudo-analytique. Les temps de calcul sont donc peu importants par comparaison avec des modèles utilisant une méthode Monte-Carlo.

1.2 Hypothèses du modèle :

1.2.1 Définition de la géométrie:

Ce modèle vise à calculer le spectre des dépôts d'énergie au sein d'une cellule cible considérée, et ce, pour des distributions de sources et de cellules cibles variables.

La première hypothèse concerne la forme des cellules et de leur noyau. Les cellules et leur noyau sont représentés sous la forme de deux sphères concentriques homogènes de densité 1 g.cm^{-3} .

La seconde hypothèse s'applique aux distributions de sources. On peut considérer quatre types de distributions :

- distribution d'activité volumique (solution radioactive baignant les cellules cibles),
- distribution d'activité dans le noyau des cellules
- distribution d'activité dans le cytoplasme des cellules
- distribution d'activité à la surface des cellules

En combinant ces différentes distributions, il est possible de se placer dans un grand nombre de cas pratiques.

On peut également utiliser trois types de géométries des cellules irradiées (Figure 14):

- cellule isolée,
- monocouche de cellules (au fond d'un puits de culture)
- cluster ou amas cellulaire (régulier ou aléatoire).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 14: Géométries cellulaires simulables par le modèle.

La modification des conditions de l'irradiation au cours de l'expérience peut être modélisée. L'utilisateur peut ainsi préciser les différentes étapes de l'expérience et les temps correspondants. On peut, par exemple, envisager que pendant les 10 premières minutes de l'expérience, les cellules sont en suspension dans le puits de culture. Elles ne sont irradiées que par les anticorps radiomarqués qui sont fixés à leur membrane et les anticorps radiomarqués libres dans le surnageant. Puis elles se déposent au fond du puits de culture où elles se regroupent pour former une monocouche jusqu'à la fin de l'expérience. Aux deux sources d'irradiation déjà citées, il faudra ajouter le feu croisé provenant des cellules voisines de la cellule cible.

Création des clusters :

Les clusters représentent des amas cellulaires aléatoires ou ordonnés. Ils servent à modéliser les sphéroïdes de cellules utilisés régulièrement *in vitro* [1, 2, 3, 4, 5, 6] mais aussi les micrométastases rencontrées *in vivo*. Ces sphéroïdes de cellules sont caractérisés par des tailles et des compacités (i.e. rapport du volume occupé par les cellules sur le volume total du sphéroïde) variables.

Le logiciel crée les clusters automatiquement à partir de la taille des cellules ou d'une distribution de rayons cellulaires, de la taille du cluster (qui peut varier entre quelques dizaines de micromètres et quelques centaines de micromètres de diamètre) et de la compacité de ce dernier (compris entre 0 et 0,74) spécifiées par l'utilisateur.

Une compacité de 0,74 correspond à la compacité maximale que l'on peut atteindre lorsque on souhaite placer des sphères dans une sphère plus grosse [7]. Dans ce cas, les cellules sont ordonnées selon un arrangement hexagonal compact (Figure 15).

QuickTime™ et un
décodeur sont requis pour visionner cette image.

Figure 15: Cluster de 13 cellules de compacité 0,74.

Si la compacité choisie est inférieure à 0,74, on distingue les cas où les rayons cellulaires sont fixes et les cas où les rayons cellulaires sont distribués de façon normale.

Pour des clusters dont les rayons des cellules sont constants, si la compacité est inférieure à 0,4, on génère les coordonnées du centre de la cellule de façon aléatoire grâce à un générateur de nombres aléatoire. Pour chaque nouvelle cellule ajoutée, on vérifie qu'elle ne chevauche

pas une cellule déjà placée. Si compacité est comprise entre 0,4 et 0,74, la méthode précédente ne fonctionne pas. On part donc d'un cluster de compacité 0,74 et l'on retire au hasard le nombre de cellules souhaitées.

Cette méthode permet de contourner le problème rencontré par Charlton [8]. Pour l'étude dosimétrique de clusters de compacité supérieure à 0,4, Charlton avait, en effet, dû créer des clusters pour lesquels les cellules se chevauchaient.

Pour des clusters avec des cellules dont les rayons varient, on définit une distribution du rayon cellulaire (gaussienne tronquée dont on spécifie la moyenne et l'écart type) et l'on considère un rapport nucléo cytoplasmique constant. Ensuite, on sélectionne de manière aléatoire un rayon dans cette distribution et l'on choisit au hasard une position dans l'espace. Si la cellule ainsi placée ne se superpose pas à une autre déjà en place, on la laisse ainsi. Sinon, on garde le rayon cellulaire et l'on tire au sort une autre position. La compacité maximale atteinte n'est pas très élevée : environ 0,4 (Figure 16).

QuickTime™ et un décodeur PDF sont requis pour visionner cette image.

Figure 16: Cluster cellulaire de rayon 100 μm . Chaque couleur représente un rayon cellulaire différent (6 μm ; 7 μm ; 8 μm ou 9 μm).

1.2.2 Modélisation de la physique:

1.2.2.1 Radioéléments:

Une classe du programme contient différents radioéléments dont les caractéristiques de désintégration ont été pré-enregistrées (^{213}Bi , ^{211}At , ^{149}Tb , ^{212}Bi , ^{210}Po). L'utilisateur du logiciel peut également entrer les caractéristiques d'autres radioéléments ou choisir de considérer une émission monoénergétique dont il aura choisi l'énergie incidente des particules. Seules les particules α sont simulées dans le modèle.

Les chaînes de désintégrations des radioéléments et les énergies des particules α émises sont issues du rapport 38 de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) [9].

1.2.2.2 Dépôts d'énergie :

Les dépôts d'énergie des particules α dans la matière sont calculés selon les hypothèses de l'approximation du ralentissement continu ou CSDA (Continuous Slowing Down Approximation) et l'approximation du parcours rectiligne des particules des particules α , valable pour des particules α de moins de 10 MeV [10].

Nous avons utilisé des valeurs des pouvoirs d'arrêt et des parcours fournies par les tables publiées dans le rapport 49 de l'ICRU [11]. Celles-ci font référence dans le domaine de la microdosimétrie des particules α .

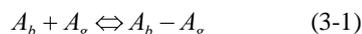
Le straggling de la perte d'énergie des particules α le long de leur parcours ainsi que la production d'électrons secondaires n'ont pas été pris en compte dans le calcul. Selon les travaux de Kellerer, décrits dans le chapitre II, cette approximation est pertinente dans le cas de cibles de taille supérieure à 1 μm et d'énergie incidente inférieure à 10 MeV.

1.3 Modèle de fixation des anticorps :

Le nombre d'anticorps radiomarqués fixés aux cellules est un paramètre essentiel de la RIT- α . Il va déterminer la spécificité de l'irradiation. Ce paramètre dépend de quatre facteurs :

- le nombre de récepteurs présents à la surface des cellules,
- la concentration d'anticorps radiomarqués dans la solution entourant les cellules,
- l'affinité de l'anticorps,
- l'activité spécifique de l'anticorps radiomarqué (qui est équivalent au nombre d'anticorps radiomarqués sur le nombre total d'anticorps).

Le nombre d'anticorps radiomarqués fixés aux cellules est évalué à partir de la relation Ligand-Récepteur. On considère très souvent que la fixation de l'anticorps à son récepteur suit la loi d'action de masse (ou loi de Guldberg et Waage):



avec A_b : anticorps,

A_g : antigène libre,

$A_b - A_g$: complexe anticorps-antigène.

À l'équilibre, selon la loi d'action de masse, les vitesses d'association et de dissociation sont égales et la constante de dissociation (Kd) vaut:

$$Kd = \frac{[A_b] * [A_g]}{[A_b - A_g]} \quad (3-2)$$

Les crochets signifient que l'on considère la concentration des éléments A_b , A_g et $A_b - A_g$.

Les valeurs du Kd de l'anticorps et du nombre de sites antigéniques par cellule B_{max} (à partir duquel on peut calculer la concentration d'antigènes libres) peuvent être déterminées expérimentalement pour chaque lignée cellulaire par la méthode Scatchard (voir les annexes pour les détails de cette méthode). Il est ensuite relativement aisé d'en déduire le nombre d'anticorps fixés à chaque cellule et à l'aide de l'activité spécifique et du temps d'irradiation, le nombre de désintégrations ayant lieu à la surface de chaque cellule.

Ce calcul repose sur l'équilibre d'une réaction chimique où l'on considère que la concentration de complexes anticorps-antigènes est négligeable devant la concentration d'anticorps ajoutés. Ce n'est parfois pas le cas lors d'expériences *in vitro*, par exemple si l'on considère que 200 000 cellules sont présentes dans le puits de culture avec plus de $2 * 10^5$ sites antigéniques à la surface de chaque cellule. La concentration de complexes anticorps-antigène

est, dans ce cas, importante. Le déplacement de l'équilibre de la réaction est alors pris en compte dans le calcul du nombre d'anticorps fixés à la surface de chaque cellule.

La pénétration des anticorps radiomarqués dans des clusters est très souvent partielle. Cette caractéristique constitue une limitation de la RIT pour le traitement des tumeurs solides. On remarque souvent que les anticorps radiomarqués ne se fixent qu'aux cellules situées en périphérie d'une tumeur sphérique [2, 12]. Cette pénétration partielle peut être prise en compte dans le modèle. L'utilisateur peut choisir de limiter la fixation de l'anticorps à une couronne externe dont il peut fixer l'épaisseur (Figure 17). Pour représenter cette non-uniformité de la distribution de l'activité, il peut également choisir de ne « marquer » qu'un certain pourcentage du nombre de cellules totales. Les cellules marquées sont alors choisies de façon aléatoire par le programme.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 17: Distribution des anticorps radiomarqués à la périphérie d'un cluster. Cluster généré par le logiciel (gauche). D'après [1] (droite).

1.4 Modèle de survie cellulaire :

L'établissement de modèles radiobiologiques pertinents est actuellement un axe de recherche important dans le domaine de la radiothérapie interne. Ils sont un pré requis indispensable au développement de logiciels de plan de traitement (TPS), sur le modèle de ce qui existe en radiothérapie interne.

Il est montré depuis longtemps [13] que les courbes de survie cellulaire à la suite d'une irradiation α ont la forme d'une exponentielle décroissante sans épaulement si elles sont représentées en fonction de la dose absorbée par les cellules. La relation entre la survie et la dose est donc linéaire et, non pas linéaire-quadratique comme dans le cas des particules β .

Cette observation semble indiquer que la toxicité d'une irradiation α est reliée aux passages individuels de particules α dans le noyau et pas à la combinaison des effets de dommages sub-létaux induits par l'accumulation de passage de particules α dans le noyau. Il apparaît que les processus de réparation cellulaire sont inactifs à la suite d'une irradiation α . Une explication possible est que les cassures double-brin provoquées par le passage de particule α sont moins facilement réparables que ceux produits par les rayonnements de bas TEL [14]. Cette absence de dommages sub-létaux réparables peut également expliquer que les courbes dose/réponse observées lors des irradiations α ne sont pas sensibles au débit de dose. Enfin, le statut oxygène des cellules n'a que peu d'influence sur les dommages induits par les particules α .

Le modèle linéaire de survie des cellules après une irradiation α peut être aisément mis en équation:

$$S = e^{-D/D_0} \quad (3-3)$$

où D_0 représente la dose moyenne absorbée permettant de réduire à 37% la survie cellulaire. Il s'agit d'une description macrodosimétrique de la relation dose/survie. Celle-ci ne tient pas compte de la grande variabilité des doses reçues à l'intérieur d'une population cellulaire irradiée. Il semble évident que les cellules réagissent de manière indépendante (si l'on exclut le phénomène de l'effet Bystander) à l'irradiation qu'elles reçoivent et non pas à la dose moyenne reçue par une population cellulaire.

L'utilisation des spectres microdosimétriques pour évaluer la survie des cellules est donc relativement intuitive. Cette approche a été adoptée par de nombreux auteurs [15, 16, 17, 18]. Ils ont exprimé la survie cellulaire en fonction de l'intégrale sur la distribution d'énergie spécifique $f(z)$ pondérée par une fonction de survie exponentielle, $\exp(-z/z_0)$:

$$Survie = \int \exp(-z/z_0) \cdot f(z) \cdot dz = \exp[-\bar{n}(1 - T_1(z_0))] \quad (3-4)$$

où $f(z)dz$ est la fraction des noyaux qui ont reçu une énergie spécifique comprise entre z et $z+dz$. $T_1(z_0)$ représente la transformée de Laplace du spectre microdosimétrique $f_1(z)$ et \bar{n} est le nombre moyen de coups reçus par les cellules.

Le paramètre de sensibilité microdosimétrique z_0 correspond à l'énergie spécifique déposée dans un noyau pour laquelle une cellule individuelle a une probabilité moyenne de survie de 37%. C'est un bien meilleur indicateur de la sensibilité d'une cellule à un certain rayonnement que le paramètre D_0 . Le paramètre D_0 est un paramètre qui dépend en effet de la configuration sources cible lors de l'irradiation [17]. En revanche, z_0 ne va dépendre que de la radiosensibilité de la cellule et du TEL de l'irradiation. Un facteur correctif applicable aux termes z ou z_0 peut être d'ailleurs ajouté pour prendre en compte le TEL de l'irradiation.

L'utilisation du facteur, $\exp(-z/z_0)$, suppose implicitement que les cellules sont radiologiquement indépendantes, c'est-à-dire que les dommages provoqués sur une cellule n'ont pas d'effets sur les cellules voisines [18]. Les connaissances sur l'effet Bystander ne sont pas encore suffisantes pour pouvoir modifier ce modèle [19]. Les analyses microdosimétriques supposent également que le site critique pour la survie cellulaire est le noyau de la cellule. Ce choix est justifié par les travaux de Munro [20]. Toutefois, la distribution d'énergie spécifique peut être calculée pour une autre cible, notamment la cellule entière. Le modèle de survie s'appliquera alors de la même manière.

1.4.1 Détermination de la radiosensibilité d'une cellule à la suite d'une irradiation α :

Lors des expériences *in vitro* d'irradiation α , la survie cellulaire est mesurée et peut être représentée en fonction de l'activité ajoutée. Notre modèle microdosimétrique peut calculer les spectres d'énergie spécifique reçue par la cellule à partir de l'activité ajoutée. On peut donc en déduire la radiosensibilité microdosimétrique, z_0 , d'une cellule.

Le calcul de la valeur de z_0 est basé sur l'équation proposée par Stinchcomb [18]:

$$Survival = T = \exp[-\bar{n}(1 - T_1)] \quad (3-5)$$

où T et T_1 représentent, respectivement, les transformées de Laplace de $f(z)$ et $f_1(z)$.

Les deux côtés de l'équation 3-5 sont des fonctions de z_0 . Le but du calcul est donc de déterminer la valeur de z_0 qui permet cette égalité [18]. Pour chaque point expérimental, le rapport suivant est calculé :

$$\frac{-\ln(S)}{\bar{n}}$$

où S représente la survie cellulaire mesurée et \bar{n} le nombre moyen de coups au noyau de la cellule. La moyenne de toutes les valeurs obtenues est ensuite calculée. Cette moyenne détermine la valeur de $1-T_1$ si l'on suppose que T_1 est constante pour tous les points expérimentaux. Cette hypothèse est vraie dans le cas d'une irradiation non spécifique et est une bonne approximation dans le cas où le nombre d'anticorps radiomarqués à la surface des cellules est non nul. On obtient, enfin, z_0 à partir de la courbe représentant T_1 en fonction de z_0 (Figure 18).

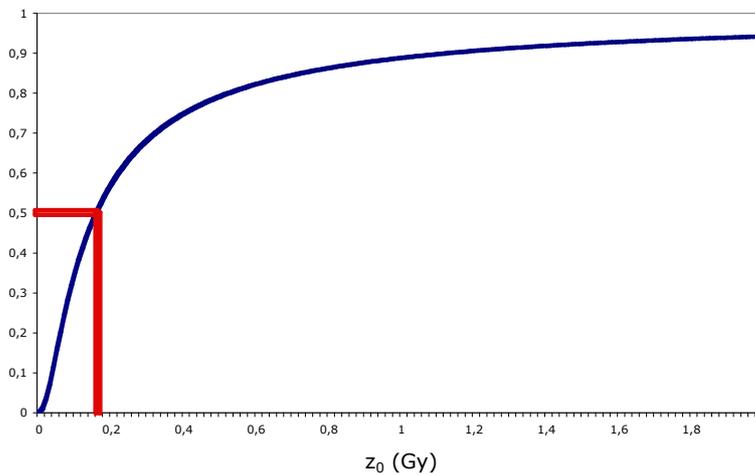


Figure 18: T_1 en fonction de z_0 . Les traits rouges indiquent la méthode graphique utilisée pour déterminer la valeur de z_0 .

1.5 Méthodes de calcul de \bar{n} , $f_1(z)$ et $f(z)$:

1.5.1 Détermination de f :

Stinchcomb et Roeske [21] ont montré que la distribution « multi-coups » $f(z)$ de l'énergie spécifique déposée dans la cible pouvait être déterminée grâce à la relation fondamentale suivante, si chacun des émetteurs émet exactement une particule :

$$F\{f(z)\} = \exp\left[-\bar{n}(1 - F\{f_1(z)\})\right] \quad (3-6)$$

où \bar{n} représente le nombre moyen de coups reçus par la cellule, $f_1(z)$ est la distribution « single hit » de l'énergie spécifique, et $F\{\}$ désigne la transformée de Fourier des expressions entre accolades.

L'obtention du spectre microdosimétrique $f(z)$ nécessite donc le calcul du nombre moyen de coups reçus par la cible biologique ainsi que la détermination du spectre $f_1(z)$. Trois types de cibles peuvent être choisis : le noyau ou le cytoplasme de la cellule ou la cellule entière. La transformée de Fourier et la transformée de Fourier inverse sont, dans le cadre de notre modèle, calculées grâce à l'algorithme de Fast Fourier Transform (FFT) en base 2 à entrelacement temporel [22].

1.5.2 Détermination de \bar{n} et $f_1(z)$:

Selon la méthode décrite par Stinchcomb et Roeske [21], on peut diviser l'espace des sources en sous-espaces à l'intérieur desquels la distribution des sources est considérée homogène. Le modèle développé considère cinq sous-espaces possibles pour les sources :

- à la surface de la cellule cible,
- dans le cytoplasme de la cellule cible,
- dans le noyau de la cellule cible,
- dans le milieu environnant les cellules,
- à la surface (ou dans le noyau ou le cytoplasme) des cellules voisines de la cellule cible.

La distribution $f_1(z)$ est, alors, de la forme suivante :

$$f_1(z) = \frac{1}{\sum_i \bar{n}_i} \left[\sum_i \bar{n}_i \cdot f_1^i(z) \right] \quad (3-7)$$

où \bar{n}_i représente le nombre moyen de particules provenant du sous-espace i ayant traversé la cible et $f_1^i(z)$ désigne la distribution « simple-coup » d'énergie spécifique provenant du sous-espace i .

Le nombre moyen total de coups à la cible est donné par :

$$\bar{n} = \sum_i \bar{n}_i \quad (3-8)$$

L'algorithme du modèle doit donc calculer pour chaque sous-espace les valeurs de $f_1(z)$ et de \bar{n} . Les paragraphes suivants détaillent les méthodes utilisées pour chaque sous-espace. A chaque fois, le calcul sera détaillé pour deux types de cible : le noyau et la cellule entière. Les notations $f_1^{sur}(z)$, $f_1^{vol}(z)$, $f_1^{oth}(z)$, \bar{n}_{sur} , \bar{n}_{vol} , et \bar{n}_{oth} désignent respectivement les distributions « simple-coup » d'énergie spécifique liées à un événement, provenant de la surface de la cellule cible, du volume entourant la cellule cible, de la surface (du noyau ou du cytoplasme) des cellules voisines de la cellule cible et le nombre moyen d'événements provenant des trois zones définies précédemment. Suivant la localisation des sources, $f_1^{sur}(z)$ peut être remplacé par $f_1^{nuc}(z)$ ou $f_1^{cyto}(z)$ qui désignent les distributions « simple-coup » d'énergie spécifique lorsque les sources sont situées dans le noyau ou le cytoplasme.

1.5.2.1 Anticorps radiomarqués à la surface de la cellule cible :

La probabilité qu'une particule émise à la surface de la cellule cible vienne frapper le noyau correspond au rapport de l'angle solide, sous lequel le noyau est vu à partir d'un point de la surface, sur 4π stéradians. Si la cible considérée est la cellule, cette probabilité vaut 0,5.

Pour obtenir le nombre moyen de coups, il suffit de multiplier la probabilité qu'une particule émise à la surface de la cellule vienne frapper la cible par le nombre de particules émises à partir de la surface.

Le calcul de la distribution $f_1(z)$ a été réalisé de la manière suivante. Pour une particule émise selon un certain angle θ par rapport à la droite reliant le centre de la cellule au point d'émission, les distances parcourues avant que la particule ne pénètre dans la cible et à l'intérieur de la cible ont été calculées. On suppose ici que les particules α ont un parcours rectiligne. En utilisant les tables du pouvoir d'arrêt des particules α dans l'eau de l'ICRU [11] et l'hypothèse du ralentissement continu, l'énergie spécifique déposée par la particule dans la cible est calculée de la manière suivante :

$$z = \frac{1}{m} \int_{t_1}^{t_2} (dE/dx) dx \quad (3-9)$$

où m représente la masse de la cible, dE/dx l'énergie déposée par unité de longueur et t_1 et t_2 les coordonnées des points d'entrée et de sortie de la particule dans la cible.

Pour chaque angle θ_i compris entre 0 et θ_{\max} (angle maximal pour lequel la particule frappe la cible), le calcul est répété. L'intervalle $[0 ; \theta_{\max}]$ a été divisé pour cela en 400 intervalles. En outre, pour chaque intervalle angulaire, la probabilité qu'une particule soit émise selon cet angle est calculée. La détermination du couple (énergie spécifique ; probabilité) pour chaque angle nous permet d'obtenir le spectre $f_1^{surf}(z)$.

1.5.2.2 Anticorps radiomarqués internalisés dans le noyau de la cellule cible :

Pour les sources présentes dans le noyau de la cellule cible, le nombre moyen de coups à la cible (noyau ou cellule) sera égal au nombre de particules émises. La distribution $f_1^{nuc}(z)$ est calculée de la manière suivante :

$$f_1^{nuc}(z) = \frac{\int_V d(s) \cdot f_1(z,s) \cdot dV}{\int_V d(s) \cdot dV} \quad (3-10)$$

où $d(s)$ représente la densité d'activité à la distance radiale s du centre de la cellule et V désigne le volume d'intérêt, i.e. la sphère représentant le noyau de la cellule ou la cellule entière. Pour chaque distance s et pour chaque angle θ_i (800 intervalles) compris entre 0 et 2π , le trajet parcouru par la particule avant de sortir de la cible ainsi que la probabilité qu'une particule soit émise selon cet angle sont calculés. Ces calculs permettent alors la détermination du spectre $f_1(z,s)$.

1.5.2.3 Anticorps radiomarqués libres dans le surnageant ou internalisés dans le cytoplasme:

Les distribution $f_1^{vol}(z)$, lorsque les sources sont localisées dans le surnageant, ou $f_1^{cyto}(z)$, lorsque les sources sont localisées dans le cytoplasme de la cellule sont calculées de la manière suivante :

$$f_1^{vol}(z) = \frac{\int_V d(s) \cdot f_1(z,s) \cdot dV}{\int_V d(s) \cdot dV} \quad (3-11)$$

où $d(s)$ représente la densité d'activité à la distance radiale s du centre de la cellule et V désigne le volume d'intérêt, i.e. le volume contenant toutes les particules susceptibles de frapper la cible.

La cellule est modélisée par une sphère. Le volume d'intérêt sera, dans le cas où l'irradiation provient du milieu extracellulaire, donc une sphère de rayon $R_0 + R_{noy}$ (où R_0 et R_{noy} représentent, respectivement, le parcours CSDA de la particule α dans l'eau et le rayon du noyau de la cellule) ou bien $R_0 + R_{cel}$ (R_{cel} représente le rayon de la cellule) si la cible considérée est la cellule.

Le calcul de $f_1(z,s)$ est réalisé à partir de la détermination de θ_{max} et de la longueur de corde dans le noyau de la cellule (Figure 19).

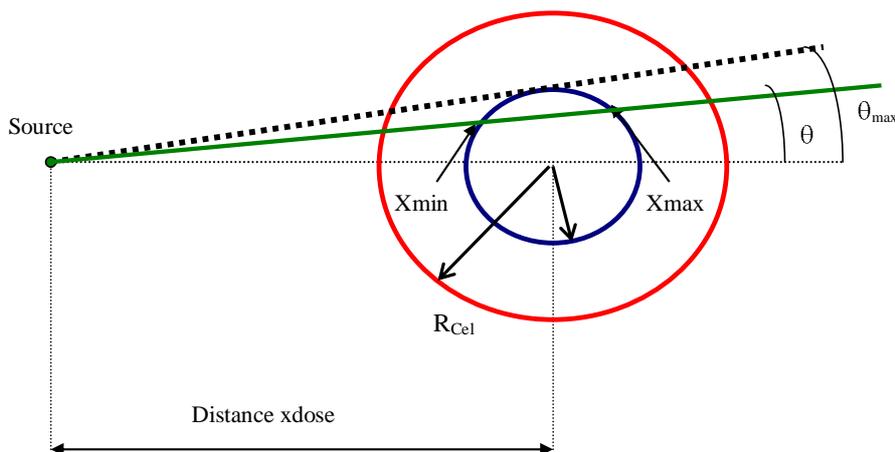


Figure 19: Schéma du modèle de calcul utilisé pour la distribution volumique.

Ces deux paramètres sont calculés selon les équations suivantes:

$$\theta_{max} = \arcsin\left(\frac{R_{noy}}{xdose}\right)$$

et

$$X_{min} = xdose * \cos\theta - \sqrt{R_{noy}^2 - xdose^2 \sin^2(\theta)}$$

$$X_{max} = xdose * \cos\theta + \sqrt{R_{noy}^2 - xdose^2 \sin^2(\theta)}$$

Le nombre moyen de coups à la cible est calculé d'une manière similaire :

$$\overline{n_{vol}} = \frac{\int_V d(s)\Omega(s)dV}{\int_V d(s)dV} \quad (3-12)$$

où $\Omega(s)$ est la probabilité qu'une particule émise à une distance s du centre de la cellule traverse la cible.

Le calcul pour des sources situées dans le cytoplasme de la cellule est effectué d'une manière similaire. Seul le volume d'intérêt considéré varie. Il s'agit, dans ce cas, du cytoplasme.

Dans le cas d'une monocouche de cellules située au fond d'un puits de culture, le volume d'intérêt considéré n'est plus qu'une demi sphère de rayon R_0+R_{noy} (ou R_0+R_{cel}). Pour cette géométrie et celle d'un cluster de cellules, le volume d'intérêt considéré est toujours corrigé du volume occupé par les cellules voisines de la cellule cible.

1.5.2.4 Anticorps radiomarqués fixés à la surface, dans le noyau ou dans le cytoplasme des cellules voisines:

Les méthodes de calcul de la distribution $f_1^{oth}(z)$ et de $\overline{n_{oth}}$ sont similaires aux méthodes décrites dans le paragraphe précédent. Toutefois, le volume d'intérêt considéré n'est constitué que de la fraction des cellules comprises dans la sphère d'intérêt de rayon R_0+R_{noy} (ou R_0+R_{cel}). Pour chaque élément infinitésimal de l'intégrale, on calculera l'intersection dans l'espace, d'une calotte sphérique d'épaisseur ds avec la surface des cellules entourant la cellule cible (ou avec le volume des noyaux ou cytoplasmes des cellules si les anticorps radiomarqués sont internalisés) (Figure 20). La densité d'activité à la distance s du centre de la cellule cible correspondra donc au rapport de la surface cellulaire interceptée sur la surface totale d'une cellule, multiplié par le nombre de désintégrations ayant lieu à la surface d'une cellule dans le cas où les anticorps radiomarqués fixés ne sont pas internalisés.

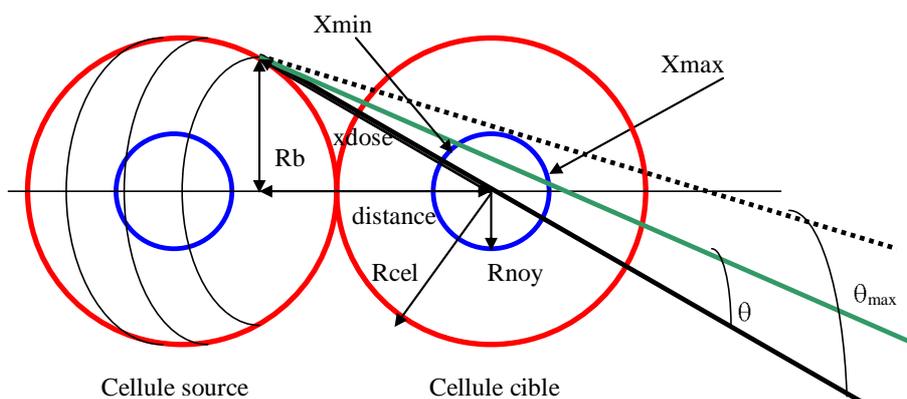


Figure 20: Schéma du modèle de calcul utilisé pour la cross-dose.

Le mode de calcul est similaire aux cas précédents.

On a toujours :

$$\theta_{\max} = \arcsin\left(\frac{R_{\text{noy}}}{x\text{dose}}\right)$$

et

$$X_{\min} = x\text{dose} * \cos\theta - \sqrt{R_{\text{noy}}^2 - x\text{dose}^2 \sin^2(\theta)}$$

$$X_{\max} = x\text{dose} * \cos\theta + \sqrt{R_{\text{noy}}^2 - x\text{dose}^2 \sin^2(\theta)}$$

Dans le cas où l'activité fixée est localisée dans le noyau ou le cytoplasme des cellules, la densité d'activité à la distance s du centre de la cellule cible correspondra au rapport du volume du noyau (ou du cytoplasme) intercepté, sur le volume total du noyau (ou du cytoplasme), multiplié par le nombre de désintégrations ayant lieu dans le noyau (ou le cytoplasme) d'une cellule.

1.5.2.5 *Prise en compte des variations intercellulaires des rayons cellulaires et nucléaires et de la fixation de l'activité:*

Une population cellulaire est constituée de cellules présentant des rayons variables. Il a par ailleurs été montré que l'activité fixée par des cellules exposées à la même concentration d'anticorps radiomarqués n'était pas uniforme [23]. À partir d'une mesure des distributions de rayons cellulaires et nucléaires et de l'activité fixée pour un échantillon de cellules représentatif, il est possible de calculer les spectres microdosimétriques correspondants [24]. Les spectres $f_1^i(z)$ correspondant à chaque sous-espace i seront calculés de la manière suivante :

$$f_1^i(z) = \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} p(a)p(R_{\text{cel}},R_{\text{noy}})f_1^i(z,R_{\text{cel}},R_{\text{noy}})da dR_{\text{cel}}dR_{\text{noy}} \quad (3-13)$$

où $p(R_{\text{cel}},R_{\text{noy}})$ est la fonction de densité de probabilité jointe de R_{cel} et R_{noy} (rayons cellulaire et nucléaire) et $p(a)$ est la distribution d'activité.

Les nombres moyens de coups à la cible \overline{n}_i seront obtenus par un calcul similaire :

$$\overline{n}_i = \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} p(a)p(R_{\text{cel}},R_{\text{noy}}) \overline{n}_i(R_{\text{cel}},R_{\text{noy}}) da dR_{\text{cel}}dR_{\text{noy}} \quad (3-14)$$

La distribution « multi-coups » $f(z)$ de l'énergie spécifique déposée dans la cible considérée sera toujours calculée selon l'équation 3-6.

1.6 Organigramme du programme

Données d'entrée:

- R_{cel}
- R_{noy}
- Radioélément émetteur α
- Géométrie cellulaire
- Paramètres de la fixation de l'anticorps (K_d , B_{max} , $C^{\circ}_{anticorps}$)
- Radiosensibilité des cellules (z_0)

Calcul du nombre d'anticorps radiomarqués fixés à chaque cellule

Création de la géométrie

Cellule isolée

Monocouche

Cluster

Calcul de $f_1^{sur}(z)$ et \bar{n}_{sur}

Calcul de $f_1^{vol}(z)$ et \bar{n}_{vol}

Calcul de $f_1^{sur}(z)$ et \bar{n}_{sur}

Calcul de $f_1^{vol}(z)$ et \bar{n}_{vol}

Calcul de $f_1^{oth}(z)$ et \bar{n}_{oth}

Calcul de $f_1^{sur}(z)$ et \bar{n}_{sur}

Calcul de $f_1^{vol}(z)$ et \bar{n}_{vol}

Calcul de $f_1^{oth}(z)$ et \bar{n}_{oth}

$$f_1(z) = \frac{\bar{n}_{sur} f_1^{sur}(z) + \bar{n}_{vol} f_1^{vol}(z)}{\bar{n}_{sur} + \bar{n}_{vol}}$$

$$f_1(z) = \frac{\bar{n}_{sur} f_1^{sur}(z) + \bar{n}_{vol} f_1^{vol}(z) + \bar{n}_{oth} f_1^{oth}(z)}{\bar{n}_{sur} + \bar{n}_{vol} + \bar{n}_{oth}}$$

$$f_1(z) = \frac{\bar{n}_{sur} f_1^{sur}(z) + \bar{n}_{vol} f_1^{vol}(z) + \bar{n}_{oth} f_1^{oth}(z)}{\bar{n}_{sur} + \bar{n}_{vol} + \bar{n}_{oth}}$$

Calcul de $F[f_1(z)]$

FFT

$$\exp[-\bar{n}(1 - F\{f_1(z)\})]$$

$$F^{-1}[\exp[-\bar{n}(1 - F\{f_1(z)\})]]$$

FFT inverse

$f(z)$

Survie cellulaire

2 Validation

Nous avons cherché à valider notre modèle microdosimétrique par comparaison avec un code Monte-Carlo. Les spectres microdosimétriques produits par notre modèle ont été comparés aux spectres calculés par deux codes Monte-Carlo : MCNPX et Geant4 pour un ensemble de géométries et de radioéléments. Ces deux codes comportent quelques différences entre eux et par rapport à notre modèle analytique dans le transport des particules α . Notre code ne simule ni les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie le long du parcours des particules α ni la production d'électrons secondaires. MCNPX, de son côté, permet de simuler le straggling en énergie mais ne prend pas en compte la production des électrons secondaires. Geant4 prend en compte ces deux paramètres. Cette étude comparative va donc nous permettre de valider notre algorithme de calcul mais aussi vérifier que les hypothèses physiques adoptées n'invalident pas nos résultats.

2.1 Matériel et méthodes:

2.1.1 MCNPX :

Le code MCNPX [25] (Hendricks, 2004) est un code Monte-Carlo généraliste. Il représente une extension du code MCNP [26], qui permet de suivre le transport de tout type de particules et notamment les particules alpha. Il permet de représenter simplement des géométries et des sources complexes. Concernant les hypothèses physiques, les particules α vont céder leur énergie au milieu le long de leur parcours lors d'interactions avec les électrons (ionisations). Les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie sont prises en compte par le modèle de Vavilov. La diffusion multiple des particules α est également implémentée. En revanche, la production d'électrons secondaires n'est pas simulée. Les particules α peuvent être suivies jusqu'à une énergie de 1 keV.

Le code MCNPX génère plusieurs fichiers de sortie dont le fichier Ptrac qui regroupe l'ensemble des données concernant le transport de chaque particule simulée. L'énergie et la direction des particules à chaque interface définie par l'utilisateur figurent notamment dans ce fichier. On peut donc déterminer le spectre $f_i(z)$ des dépôts d'énergie spécifique dans la cellule qui nous intéresse, si un nombre suffisant de particules est simulé. Le spectre $f(z)$ est alors déduit à partir de l'équation 3-6. Le nombre moyen de coups au noyau est calculé à partir de la probabilité qu'une particule traverse le noyau. Cette dernière est obtenue en faisant le rapport du nombre de particules simulées ayant traversé le noyau sur le nombre total de particules simulées.

2.1.2 Geant4 :

Geant4 [27] est un code Monte-Carlo généraliste implémenté par le CERN initialement pour la physique des particules de haute énergie mais qui a depuis été étendu aux énergies plus faibles. Il permet de simuler le transport d'un grand nombre de particules, dont les particules α . Geant4 offre plusieurs modèles physiques pour le transport des particules. Les pertes d'énergie continues le long du parcours de la particule α sont modélisées par l'équation de Bethe-Bloch. Les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie sont prises en compte au moyen d'une fonction de straggling qui approche une distribution gaussienne [28]. La

diffusion multiple des particules α et la production d'électrons secondaires sont également implémentées. Les particules α peuvent être suivies jusqu'à une énergie de 1 keV.

Au cours de la simulation, l'énergie déposée par chaque particule α incidente et les électrons secondaires produits par cette particule est enregistrée, si ces dépôts d'énergie ont lieu dans la cible considérée. Ces dépôts d'énergie sont regroupés sous la forme d'un histogramme, représentant la distribution $f_1(z)$, dans un fichier de sortie. Comme pour MCNPX, le spectre $f(z)$ est déduit à partir de l'équation 3-6. Le nombre moyen de coups au noyau est calculé à partir de la probabilité qu'une particule traverse le noyau. Cette dernière est obtenue en faisant le rapport du nombre de particules simulées ayant traversé le noyau sur le nombre total de particules simulées.

2.1.3 Calculs effectués :

Cette étude comparative avait pour but de contrôler l'implémentation de notre algorithme analytique et de vérifier que les hypothèses physiques adoptées étaient pertinentes. Chaque possibilité de calcul offerte par notre modèle a donc été testée.

Les comparaisons ont été effectuées en faisant varier les paramètres de simulation suivants:

- localisation des sources,
- géométrie de l'irradiation,
- radioélément utilisé.

Dans le détail, les spectres $f_1(z)$ et $f(z)$, ainsi que les valeurs macrodosimétriques : dose moyenne absorbée et nombre moyen de coups au noyau ont été calculés à l'aide du modèle analytique et des deux codes Monte-Carlo, MCNPX et Geant4, pour les cas suivants :

- cellule isolée : cinq désintégrations de ^{211}At
 - o dans le noyau
 - o dans le cytoplasme
 - o à la surface de la cellule
 - o dans la sphère utile entourant la cellule. On appelle sphère utile la sphère de rayon $R_{\text{noy}}+R_{0,\text{max}}$, où $R_{0,\text{max}}$ représente le parcours de la particule α la plus énergétique.
- monocouche de cellules : cinq désintégrations de ^{213}Bi à la surface de chaque cellule,
- cluster compact de 13 cellules : cinq désintégrations de ^{211}At sur chaque cellule entourant la cellule cible.

Les cellules simulées sont des cellules sphériques de rayon cellulaire 10 μm et de rayon nucléaire 5 μm .

Un autre calcul a été mené pour une cellule isolée marquée en surface par 5 atomes de ^{213}Bi . Pour ce calcul, on a considéré une distribution gaussienne du rayon cellulaire (rayon moyen = 10 μm , écart type : 1 μm) au lieu d'une valeur moyenne. Le rapport nucléo cytoplasmique a été considéré constant et égal à 0,5.

Pour l' ^{211}At , les deux particules α principales de la chaîne de désintégration ont été prises en compte, i.e. la particule α de 5,867 MeV (probabilité par désintégration: 42%) émise lors de la désintégration de l' ^{211}At et la particule α de 7,450 MeV (58%) produite lors de la désintégration du ^{211}Po .

Pour le ^{213}Bi , on a considéré que chaque désintégration conduisait à l'émission d'une particule α de 8,376 MeV.

L'obtention de spectres peu bruités avec une bonne résolution en énergie (pas d'échantillonnage en énergie: 1 keV) a nécessité la simulation de 10 millions de particules avec les code MCNPX et Geant4.

Pour les calculs comportant une distribution de rayons cellulaires, celles-ci ont été échantillonnées (9 valeurs pour la distribution de rayons) et le calcul avec MCNPX et Geant4 a été réalisé pour ces 9 valeurs de rayons. Dans ce cas, 90 millions de particules ont été simulées lors du calcul Monte-Carlo.

2.1.4 Résultats/Discussion :

Les études comparatives entre le modèle analytique et les codes MCNPX et Geant4 ont porté sur plus de dix configurations sources-cible différentes.

La figure 21 représente les spectres $f_1(z)$ et $f(z)$ obtenus par les deux méthodes de calcul dans le cas d'une cellule cible placée au centre d'un cluster de 13 cellules marquées en surface par 5 atomes de ^{211}At .

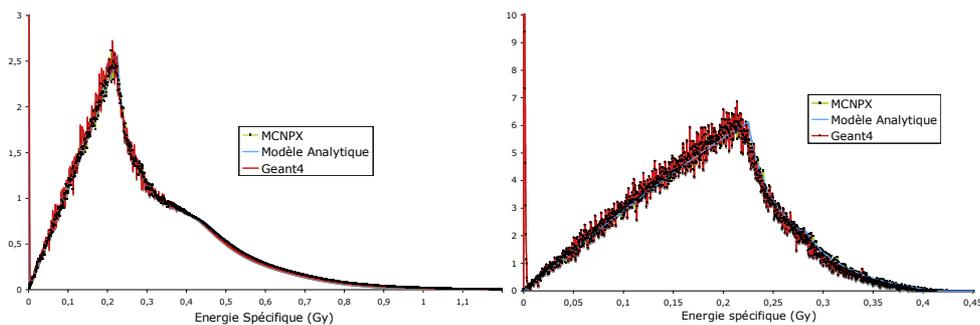


Figure 21: Distributions « simple-coup» (à gauche) et « multi-coups» (à droite) de l'énergie spécifique déposée dans le noyau d'une cellule située au centre d'un cluster de 13 cellules (de compacité 0,74) calculées par le modèle développé, par MCNPX et par Geant4. Les douze cellules entourant la cellule cible sont marquées par 5 atomes d' ^{211}At . 10^7 particules ont été simulées lors du calcul Monte Carlo.

On observe un bon accord entre les trois distributions. Les valeurs macrodosimétriques confirment cet accord. Le nombre de coups obtenu par le calcul MCNPX (1,07) et par le calcul Geant4 (1,07) sont proches du nombre moyen de coups obtenu par le calcul analytique (1,06).

Les spectres microdosimétriques calculés par Geant4 comportent, toutefois, une particularité par rapport aux spectres calculés par MCNPX et le code analytique. On peut, en effet, noter un pic important pour des valeurs très faibles d'énergie spécifique. Ce pic correspond à l'énergie déposée par des électrons secondaires mis en mouvement à l'extérieur de la cible.

La figure 22 représente le spectre $f_1(z)$ obtenu par le calcul MC et le calcul analytique pour une cellule isolée irradiée par des particules alpha provenant de la désintégration d'atomes de

^{213}Bi à sa surface. Ce calcul a été effectué pour une distribution gaussienne du rayon cellulaire ($R_{\text{cel}}^{\text{moyen}} = 10 \mu\text{m}$; écart type = $1 \mu\text{m}$).

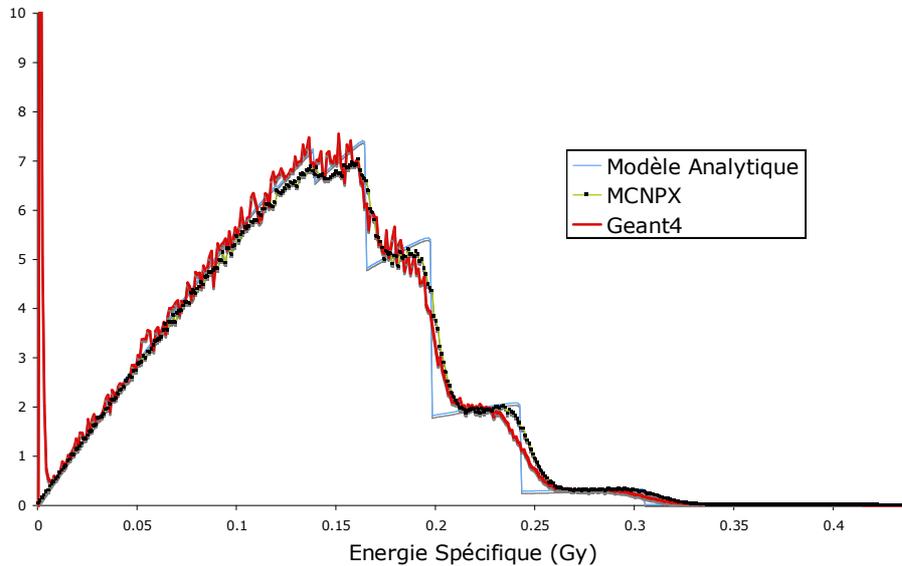


Figure 22: Distributions « simple-coup » de l'énergie spécifique déposée dans le noyau d'une cellule isolée calculées par le modèle développé, par MCNPX et par Geant4. La cellule est marquée par 5 atomes d' ^{213}Bi . Une distribution de rayons cellulaires a été prise en compte dans le calcul. $9 \cdot 10^7$ particules ont été simulées lors du calcul Monte Carlo.

Une bonne superposition des distributions $f_1(z)$ calculées par les deux codes MC et par notre algorithme peut encore être observée. Les nombres moyens de coups au noyau obtenus sont très proches pour les trois méthodes : 0,35 pour le code analytique et MCNPX, 0,36 pour Geant4.

Le tableau 2 permet de comparer les résultats fournis (Dose absorbée, nombre moyen de coups) par les trois méthodes de calcul pour les autres configurations sources-cible simulées. Les trois méthodes de calcul donnent des résultats similaires.

	Geant4		MCNPX		Model Analytique	
	Dose absorbée (Gy)	Nombre moyen de coups	Dose absorbée (Gy)	Nombre moyen de coups	Dose absorbée (Gy)	Nombre moyen de coups
Cellule isolée Activité dans le noyau	0,433	5,0	0,432	5,0	0,433	5,0
Cellule isolée Activité dans le cytoplasme	0,1	0,65	0,098	0,64	0,098	0,64
Cellule isolée Activité à la surface de la cellule	0,056	0,35	0,055	0,34	0,055	0,34
Cellule isolée Activité dans le milieu	0,003	0,013	0,003	0,012	0,003	0,013
Monocouche de cellules Activité à la surface de la cellule	0,261	1,53	0,261	1,53	0,259	1,51

Tableau 2: Dose absorbée et nombre moyen de coups reçus par le noyau de la cellule cible considérée dans cinq configurations distinctes calculées par Geant4, MCNPX et le modèle développé. Pour le cas des cellules isolées, cinq désintégrations d'²¹¹At ont été prises en compte. Pour la monocouche de cellules, le calcul a été effectué pour 5 désintégrations de ²¹³Bi à la surface de chaque cellule.

L'implémentation de l'algorithme de calcul des dépôts d'énergie au sein de la cible développé pour notre modèle microdosimétrique est donc validée. Les méthodes analytiques et Monte-Carlo fournissent des résultats similaires.

MCNPX et le code analytique, bien que reposant chacun sur des méthodes de calcul particulières, ne comportent que peu de différences dans le traitement physique du transport des particules α . Ainsi, les deux codes ne prennent pas en compte la création d'électrons secondaires sur le passage de la particule α . En revanche, MCNPX dispose pour le transport de ces particules d'un modèle d'énergie straggling et de diffusion multiple. Ces caractéristiques ne produisent pas d'effets significatifs sur les spectres microdosimétriques calculés si ce n'est l'apparition d'une légère queue (tail) sur les spectres $f_1(z)$ pour de fortes énergies spécifiques. Geant4 permet la prise en compte de la production des électrons secondaires. L'effet visible sur les spectres $f_1(z)$ et $f(z)$ est l'apparition d'un pic pour de très faibles énergies spécifiques. Ce pic correspond à l'énergie déposée par des électrons

secondaires mis en mouvement à l'extérieur de la cible mais n'aura pas d'effets significatifs sur le calcul de la survie cellulaire.

Au travers de cette étude, nous retrouvons les conclusions faites par Kellerer [10]. La dosimétrie cellulaire des particules α peut être réalisée avec une bonne précision en négligeant le straggling et la production d'électrons secondaires.

Il est intéressant de noter que les temps de calculs sont très différents. Pour les spectres $f_1(z)$ et $f(z)$, la taille de bin en énergie choisie est de 1 keV. Pour obtenir une distribution peu bruitée, dix millions de particules doivent être simulées avec MCNPX et Geant4. Dans le cas de l'exemple du cluster de 13 cellules (Figure 21), MCNPX requiert plus de 3 heures de calcul pour l'obtention du spectre $f(z)$. Le calcul réalisé avec Geant4 nécessite encore plus de temps. Le même calcul est effectué en moins d'une minute avec le programme analytique sur le même ordinateur (power Mac G5 2*2 GHz). Les temps de calcul sont encore plus rédhibitoires lorsque l'on simule une distribution de rayons cellulaires. Pour chaque échantillon de la distribution gaussienne correspondant à un couple particulier ($R_{noy}; R_{cel}$), le calcul devra être effectué en simulant 10 millions de particules avec MCNPX et Geant4 afin d'obtenir un spectre $f_1(z)$ peu bruité. Si l'on considère 9 échantillons (Figure 22) les temps de calculs seront évidemment multipliés par 9. Pour un couple ($R_{noy}; R_{cel}$), le temps de calculs est de 200 minutes (power Mac G5 2*2 GHz). Pour obtenir le spectre $f_1(z)$, les temps de calcul seront donc d'environ 1800 minutes soit 30 heures. Ce calcul est réalisé en quelques minutes par notre calcul analytique.

La durée des calculs avec des méthodes Monte-Carlo n'est pas prohibitive en soi. Toutefois, il faut considérer que l'analyse de données expérimentales va nécessiter le calcul de la distribution $f_1(z)$ pour chaque expérience (si la distribution des sources varie). Dans ce contexte, le temps de calculs de 3 heures devra être multiplié par le nombre de points expérimentaux.

2.2 Impact de la géométrie cellulaire:

Une méthode analytique, on l'a vu précédemment avec les hypothèses physiques, repose sur des simplifications. Les cellules biologiques présentent des formes et des tailles très variables *in vitro* et *in vivo*. Les cellules circulantes, cellules du sang notamment, ont généralement une forme plutôt sphérique, régulière. Les cellules épithéliales sont elles plus aplaties et ont souvent une forme ellipsoïdale.

Dans le modèle microdosimétrique développé, la cellule et son noyau sont représentés par deux sphères concentriques. Dans cette partie, l'impact de deux hypothèses sur les spectres microdosimétriques sera évalué en utilisant un calcul Monte-Carlo. Dans une première partie, le déplacement du noyau autour du centre de la cellule sera étudiée. La deuxième partie analysera l'hypothèse de la sphéricité des cellules.

2.2.1 Excentricité du noyau :

À l'intérieur d'une population cellulaire, les cellules et leur noyau sont très rarement concentriques.

Nous avons cherché à vérifier que ce déplacement du centre du noyau dans la cellule n'avait qu'un impact négligeable sur les spectres microdosimétriques calculés.

2.2.1.1 Matériel et méthodes :

Deux cas simples ont été simulés avec le code Monte-Carlo MCNPX :

- l'irradiation d'une cellule isolée à partir de désintégrations ayant lieu à sa surface. Pour cette étude et dans le reste du document, nous appellerons ce type d'irradiation : irradiation surfacique.
- l'irradiation d'une cellule isolée à partir de désintégrations ayant lieu dans le volume entourant cette cellule. Pour cette étude et dans le reste du document, nous appellerons ce type d'irradiation : irradiation volumique.

Dans les deux cas, deux calculs ont été réalisés : le premier pour lequel la cellule et son noyau sont représentés par deux sphères concentriques, le second pour lequel le centre du noyau n'est plus confondu avec le centre de la cellule. La cellule considérée a un rayon cellulaire de 10 μm et un rayon nucléaire de 5 μm . Dans le cadre du second calcul, le centre du noyau est déplacé de 4 μm par rapport au centre de la cellule (Figure 23).

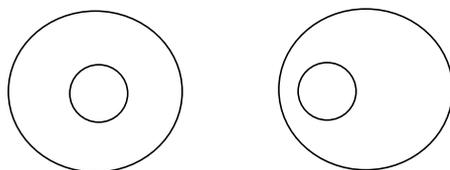


Figure 23: Schémas des cellules simulées dans le cadre de l'étude de l'influence de l'excentricité du noyau cellulaire sur les spectres microdosimétriques.

Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . 10 millions de particules ont été simulées pour chaque cas.

2.2.1.2 Résultats/Discussion :

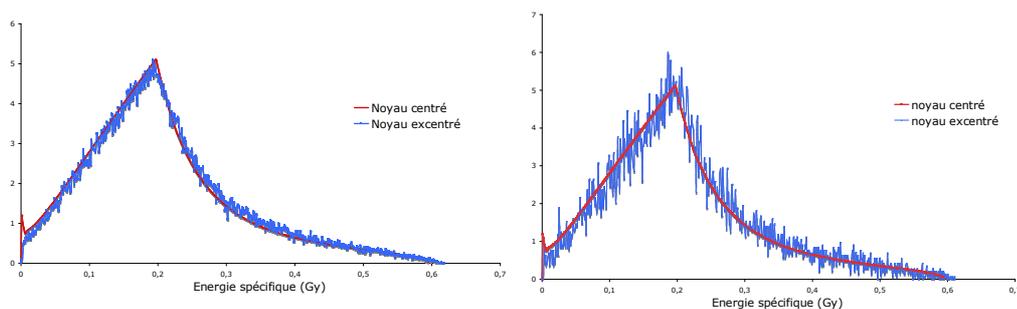


Figure 24: Distributions « simple-coup » de l'énergie spécifique déposée dans le noyau d'une cellule isolée lors d'une irradiation surfacique (gauche) et lors d'une irradiation volumique (droite). Les courbes rouges représentent le cas où le noyau est centré dans la cellule. Les courbes bleues représentent le cas où le noyau est excentré dans la cellule. Les calculs ont été réalisés avec le code MCNPX. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

Les spectres microdosimétriques sont identiques quelle que soit la position relative du noyau dans la cellule lorsque l'irradiation provient de la surface ou du milieu entourant la cellule. Ces deux cas représentent de cas généraux, mais le résultat peut être étendu à des cas d'irradiation cytoplasmique et de feu croisé provenant de cellules voisines de la cellule cible. Le modèle de deux sphères concentriques pour représenter une cellule et son noyau n'induit pas d'imprécisions significatives pour les spectres microdosimétriques.

2.2.2 Écart par rapport à la sphéricité du noyau et de la cellule:

La sphéricité de la cellule et de son noyau représente un cas idéal pour lequel la symétrie sphérique simplifie grandement les calculs. Dans de très nombreux cas expérimentaux, notamment pour des monocouches de cellules épithéliales, les cellules ont plutôt une forme ellipsoïdale plus ou moins aplatie.

2.2.2.1 Matériel et méthodes :

Pour cette étude, nous avons repris les géométries citées précédemment : cellules isolées qui subissent une irradiation surfacique ou volumique. Le radioélément simulé est toujours le ^{213}Bi . Trois formes de cellules ont été considérées :

- une cellule sphérique de rayons $R_{\text{cel}}=10 \mu\text{m}$ et $R_{\text{noy}}=5 \mu\text{m}$,
- une cellule ellipsoïdale dont le noyau a également une forme ellipsoïdale pour laquelle le rapport petit axe/grand axe vaut 0,5,
- une cellule ellipsoïdale (noyau ellipsoïdal) pour laquelle le rapport petit axe/grand axe vaut 0,2.

Le volume du noyau considéré est identique pour les trois cellules ($523,6 \mu\text{m}^3$).

Pour chaque cas, les distributions $f_1(z)$ et $f(z)$ ont été calculées en utilisant le code MCNPX. Le calcul de la survie, basée sur ces spectres microdosimétriques, a été effectué pour plusieurs nombres de désintégrations. La radiosensibilité des cellules a été fixée à $z_0=0,1 \text{ Gy}$. Il s'agit d'une radiosensibilité élevée pour laquelle les différences dans la forme des spectres d'énergie spécifique entre les trois types de cellules auront le plus d'impact sur la valeur de la survie calculée.

2.2.2.2 Résultats :

2.2.2.2.1 Irradiation surfacique :

QuickTime™ et un
décodeur pour TIF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 25: Distribution simple-coup d'énergie spécifique dans le noyau des cellules lors d'une irradiation surfacique. Chaque couleur représente une cellule de forme différente. Les calculs ont été réalisés avec le code MCNPX. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

La figure 25 représente les spectres $f_1(z)$ pour les trois types de cellules lorsque l'irradiation est surfacique. La forme de ces spectres varie en fonction de la forme des cellules et de leur noyau. Plus la cellule est aplatie, plus le pic de la distribution $f_1(z)$ est déplacé vers les faibles énergies spécifiques. Le parcours le plus fréquent dans le noyau des cellules est en effet plus court lorsque la cellule est aplatie. La seconde caractéristique des distributions $f_1(z)$ pour des noyaux de forme ellipsoïdale est un étalement plus important du spectre pour des énergies spécifiques élevées. L'énergie maximale qui peut être déposée dans le noyau de la cellule est en effet plus élevée dans une cellule aplatie. Cela correspond aux distributions de longueurs de corde caractéristique d'un volume ellipsoïdal [29].

QuickTime™ et un
décodeur pour TIF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décodeur pour TIF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 26: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau. 5 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu à la surface de la cellule (gauche). 50 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu à la surface de la cellule (droite). Les calculs ont été réalisés avec le code MCNPX.

La figure 26 montre les spectres $f(z)$ lorsque 5 et 50 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu en surface des cellules considérées. Lorsque le nombre de désintégrations est peu élevé, on retrouve les différences observées pour les spectres $f_1(z)$. Pour un nombre de désintégrations élevé, les différences sont lissées et les spectres pour une cellule sphérique et pour des cellules ellipsoïdales sont similaires.

Dans un second temps, nous avons évalué les différences entre les courbes de survie des cellules ellipsoïdales et de la cellule sphérique.

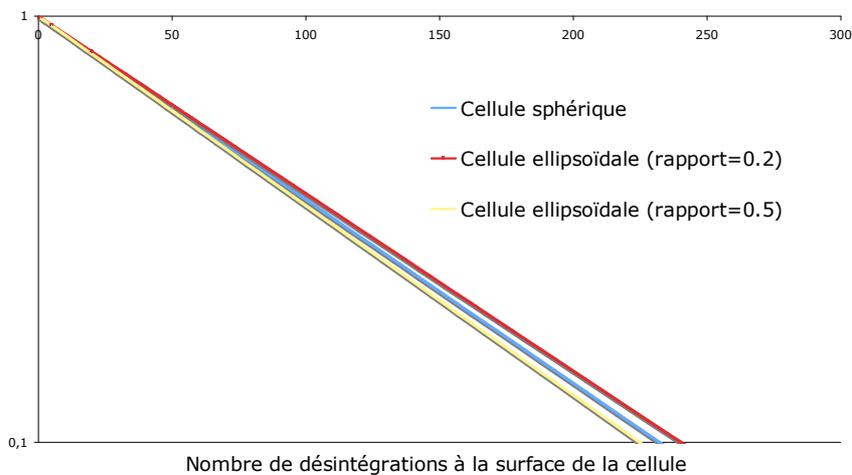


Figure 27: Survie cellulaire en fonction du nombre de désintégrations ayant lieu en surface des cellules. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

Les trois courbes de survie sont très proches (Figure 27). Pour un nombre de désintégrations donné, la différence de survie calculée entre la cellule sphérique et les cellules ellipsoïdales ne dépassera pas 1,5%.

Dans le cadre d'une irradiation spécifique, le calcul microdosimétrique de la survie n'est pas influencé par la forme des cellules. Considérer une cellule sphérique est donc une approximation acceptable.

2.2.2.2.2 Irradiation volumique :

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 28: Distribution simple-coup d'énergie spécifique dans le noyau lors d'une irradiation volumique. Chaque couleur représente une cellule de forme différente. Les calculs ont été réalisés avec le code MCNPX. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

La figure 28 représente les spectres $f_1(z)$ pour les trois types de cellules lorsque l'irradiation est volumique. Les spectres $f_1(z)$ de la cellule sphérique et de la cellule ellipsoïdale dont le rapport petit axe/grand axe vaut 0,5 sont très proches. Pour la cellule ellipsoïdale dont le rapport petit axe/grand axe vaut 0,2, le pic de la distribution $f_1(z)$ est déplacée vers les faibles énergies spécifiques comme pour l'irradiation surfacique.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 29: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau. 100 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu dans le volume entourant la cellule (gauche). 10 000 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu dans le volume entourant la cellule (droite). Les calculs ont été réalisés avec le code MCNPX.

Comme dans le cas de la cellule isolée, les spectres $f(z)$ tendent à se superposer lorsque le nombre de désintégrations augmente (Figure 29).

Nous avons ensuite calculé la survie des trois types de cellules à partir des spectres microdosimétriques :

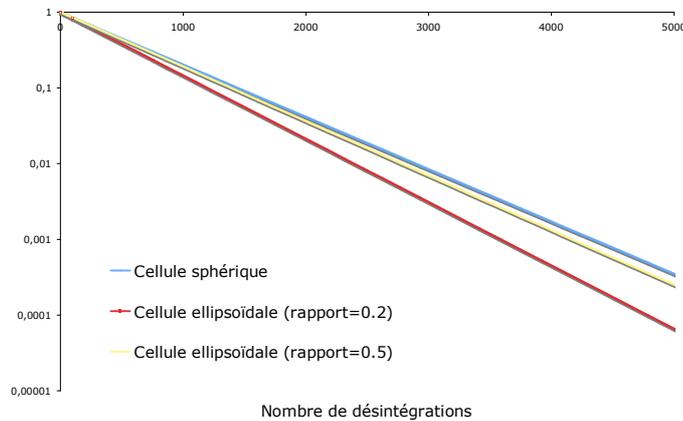


Figure 30: Survie cellulaire en fonction du nombre de désintégrations ayant lieu en surface des cellules. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

Les différences de survie entre une cellule sphérique et une cellule ellipsoïdale sont faibles (Figure 30). La différence maximale de survie pour un nombre de désintégrations donné entre la cellule sphérique et la cellule ellipsoïdale de rapport 0,2 est inférieure à 7%. Cette valeur est un peu plus élevée que pour une irradiation surfacique, mais l'approximation de la cellule sphérique reste acceptable. Le cas d'une cellule ellipsoïdale de rapport 0,2 est en effet exagéré et peu commun lors d'expériences *in vitro*.

Ces résultats confirment l'étude réalisée par Stinchcomb [29].

3 Conclusion :

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle de calcul microdosimétrique pour les irradiations cellulaires par des particules α . Ce modèle repose sur un calcul analytique. Pour calculer les dépôts d'énergie des particules α dans les cibles considérées, les approximations du ralentissement continu et du parcours rectiligne des particules α sont faites. Le logiciel permet de simuler l'ensemble des situations rencontrées lors d'expériences *in vitro*. Diverses géométries peuvent être considérées :

- cellule isolée,
- monocouche de cellules,
- cluster de cellules.

Les sources radioactives peuvent être distribuées dans différents compartiments représentant la distribution des anticorps radiomarqués lors de ces expériences :

- sources dans le noyau des cellules,
- sources dans le cytoplasme des cellules,
- sources fixées à la surface des cellules,
- sources libres dans le milieu entourant les cellules.

Le feu croisé entre des cellules voisines est également pris en compte.

Les cellules et leur noyau sont représentés par deux sphères concentriques homogènes de densité 1 g.cm^{-3} .

Ce modèle fournit, en guise de résultats, les distributions « simple-coup » et « multi-coups » d'énergie spécifique dans la cible considérée (le noyau, le cytoplasme de la cellule ou la cellule entière). Un module permet d'évaluer la survie de chaque cellule à la suite des irradiations α . La survie est calculée à partir des spectres microdosimétriques déterminés. Un autre module permet de modéliser la fixation des anticorps dans les cellules.

L'algorithme de ce modèle microdosimétrique a été évalué lors d'une étude comparative avec deux codes Monte-Carlo : Geant4 et MCNPX. Pour l'ensemble des situations considérées, les spectres microdosimétriques calculés par les deux méthodes de calcul se sont superposés de façon satisfaisante. Cette étude a confirmé les travaux de Kellerer : la non-prise en compte du straggling des dépôts d'énergie le long du parcours de la particule α et de la production d'électrons secondaires n'a que peu d'influence sur les résultats dosimétriques dans une cellule dont le noyau a des dimensions micrométriques.

La pertinence des hypothèses géométriques simplificatrices a également été évaluée. Le déplacement du noyau à l'intérieur de la cellule n'a pas d'effet sur les spectres microdosimétriques. Le fait de considérer des cellules sphériques alors que pour de nombreux groupes cellulaires utilisés *in vitro*, cette forme est plutôt ellipsoïdale, n'a pas de conséquence importante sur le calcul de la survie des cellules.

Le grand apport de ce modèle réside dans ses temps de calculs très faibles. Générer des spectres microdosimétriques avec une méthode Monte-Carlo nécessite en effet la simulation de plusieurs millions de particules. Nous avons montré qu'il existait un rapport supérieur à 3000 entre les temps de calculs de MCNPX et de notre calcul analytique.

Bibliographie

1. A. M. Ballangrud, W. H. Yang, A. Dnistrian, N. M. Lampen and G. Sgouros, Growth and characterization of LNCaP prostate cancer cell spheroids. *Clin Cancer Res* **5**, 3171s-3176s (1999).
2. A. M. Ballangrud, W. H. Yang, S. Palm, R. Enmon, P. E. Borchardt, V. A. Pellegrini, M. R. McDevitt, D. A. Scheinberg and G. Sgouros, Alpha-particle emitting atomic generator (Actinium-225)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res* **10**, 4489-4497 (2004).
3. M. Bardies, P. Thedrez, J. F. Gestin, B. M. Marcille, D. Guerreau, A. Faivre-Chauvet, M. Mahe, C. Sai-Maurel and J. F. Chatal, Use of multi-cell spheroids of ovarian carcinoma as an intraperitoneal radio-immunotherapy model: uptake, retention kinetics and dosimetric evaluation. *Int J Cancer* **50**, 984-991 (1992).
4. M. Essand, S. Nilsson and J. Carlsson, Growth of prostatic cancer cells, DU 145, as multicellular spheroids and effects of estramustine. *Anticancer Res* **13**, 1261-1268 (1993).
5. V. K. Langmuir, J. K. McGann, F. Buchegger and R. M. Sutherland, 131I-anticarcinoembryonic antigen therapy of LS174T human colon adenocarcinoma spheroids. *Cancer Res* **49**, 3401-3406 (1989).
6. S. J. Kennel, M. Stabin, J. C. Roeske, L. J. Foote, P. K. Lankford, M. Terzaghi-Howe, H. Patterson, J. Barkenbus, D. M. Popp, et al., Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroid cultures of tumor cells. *Radiat Res* **151**, 244-256 (1999).
7. T. C. Hales, *Cannonballs and Honeycombs*, Notices of the AMS, Vol 47, N.4 (1998).
8. D. E. Charlton, Radiation effects in spheroids of cells exposed to alpha emitters. *Int J Radiat Biol* **76**, 1555-1564 (2000).
9. A. M. Kellerer and D. Chmelevsky, Criteria for the applicability of LET. *Radiat Res* **63**, 226-234 (1975).
10. ICRP Publication 38, Radionuclide Transformations : Energy and Intensity of Emissions. Annals of the ICRP 11-13. Oxford : Pergamon Press (1983).
11. ICRU Report 49, Stopping Powers and Ranges for Protons and Alpha Particles. Bethesda, MD, USA (1993).
12. E. El Emir, U. Qureshi, J. L. Dearling, G. M. Boxer, I. Clatworthy, A. A. Folarin, M. P. Robson, S. Nagl, M. A. Konerding and R. B. Pedley, Predicting response to radioimmunotherapy from the tumor microenvironment of colorectal carcinomas. *Cancer Res* **67**, 11896-11905 (2007).
13. G. W. Barendsen and H. M. Walter, Effects of Different Ionizing Radiations on Human Cells in Tissue Culture. Iv. Modification of Radiation Damage. *Radiat Res* **21**, 314-329 (1964).
14. A. I. Kassis and S. J. Adelstein, Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**, 4S-12S (2005).
15. J. L. Humm, A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **13**, 1767-1773 (1987).
16. J. L. Humm and L. M. Chin, A model of cell inactivation by alpha-particle internal emitters. *Radiat Res* **134**, 143-150 (1993).
17. D. E. Charlton and R. Sephton, A relationship between microdosimetric spectra and cell survival for high-LET irradiation. *Int J Radiat Biol* **59**, 447-457 (1991).
18. T. G. Stinchcomb and J. C. Roeske, Analysis of survival of C-18 cells after irradiation

- in suspension with chelated and ionic bismuth-212 using microdosimetry. *Radiat Res* **140**, 48-54 (1994).
19. G. Sgouros, S. J. Knox, M. C. Joiner, W. F. Morgan and A. I. Kassis, MIRD continuing education: Bystander and low dose-rate effects: are these relevant to radionuclide therapy? *J Nucl Med* **48**, 1683-1691 (2007).
 20. T. R. Munro, The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res* **42**, 451-470 (1970).
 21. T. G. Stinchcomb and J. C. Roeske, Analytic microdosimetry for radioimmunotherapeutic alpha emitters. *Med Phys* **19**, 1385-1393 (1992).
 22. J. W. Cooley and J. W. Tukey, An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Math Comput* **19**, 297-301 (1965).
 23. P. V. Netti and R. W. Howell, Log normal distribution of cellular uptake of radioactivity: implications for biologic responses to radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* **47**, 1049-1058 (2006).
 24. Y. Kvinnsland, T. Stokke and E. Aurlen, Radioimmunotherapy with alpha-particle emitters: microdosimetry of cells with a heterogeneous antigen expression and with various diameters of cells and nuclei. *Radiat Res* **155**, 288-296 (2001).
 25. J. S. Hendricks, MCNPX extensions version 2.5.0. LA-UR-04-0570, Los Alamos National Laboratory, 2004.
 26. J. F. Briesmeister, MCNPTM - A general Monte Carlo N-particle transport code, version 4B. Report LA-12625-M. Los Alamos, NM : Los Alamos National Laboratory (1997).
 27. S. Agostinelli, J. Allison, and K. Amako, *Nucl Instrument Meth Phys Res A* **506**, 250-255 (2003).
 28. N. Bohr, The penetration of atomic particles through matter. *Kgl. Danske Videnskab. Selskab., Mat.-Fys. Medd.* **18**, No. 8 (1948).
 29. T. G. Stinchcomb and J. C. Roeske, Survival of Alpha Particle Irradiated Cells as a Function of the Shape and Size of the Sensitive Volume (Nucleus). *Rad Prot Dos* **62**, 157-164 (1995).

Chapitre IV : Intérêt de la méthode microdosimétrique

Depuis plus de 20 ans, la RIT- α est investiguée dans le domaine pré-clinique. La grande cytotoxicité des particules α a ainsi été démontrée. Ce haut pouvoir cytotoxique a notamment pour conséquence qu'un faible nombre de particules α est nécessaire pour tuer une cellule : 1 à 4 passages de particules α semblent suffisant; il en faut 20000 pour des particules β [1]. Cette caractéristique conjuguée au TEL et à l'énergie élevés des particule α va entraîner une grande variabilité des dépôts d'énergie d'une cible à une autre. Cette variabilité sera d'autant plus grande que les cibles seront petites.



Figure 31: Variation de la dose en fonction de la masse de la cible (d'après [2]).

Figure 31: Variation de la dose en fonction de la masse de la cible (d'après [2]).

La figure 31 représente la dose ou la densité d'énergie spécifique en fonction de la masse de la cible considérée. La ligne pleine décrit l'intervalle des tailles de cible pour lesquelles la dose absorbée peut être déterminée à l'aide d'une simple mesure. Chaque point représente l'énergie spécifique obtenue lors d'une mesure ou d'un calcul unique. Cette région de points est la zone pour laquelle les fluctuations statistiques de la dose sont importantes. Le noyau des cellules et les cellules elles-mêmes, dont les diamètres ne dépassent pas 30 μm constituent des cibles dont la taille est comprise dans cette dernière zone.

Au plan dosimétrique, la microdosimétrie est donc très souvent employée dans les études pré-cliniques utilisant des particules α . Cette utilisation de la microdosimétrie correspond au respect du critère énoncé par Kellerer [3], déjà cité dans ce rapport. Ce critère dit que les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie sont non significatives pour une dose absorbée élevée, pour laquelle la variance relative de la distribution de l'énergie spécifique est inférieure à 20%. Cette valeur peut être utilisée pour délimiter les domaines de la macrodosimétrie et de la microdosimétrie [4]. Cette règle est une justification physique de l'emploi de la microdosimétrie. Nous nous sommes demandés si cette justification était valable, si la microdosimétrie pouvait apporter des informations supplémentaires et surtout observables ou quantifiables, lorsque l'on étudie la relation dose-effet.

Dans ce chapitre, nous délimiterons, dans un premier temps, le domaine d'emploi de la microdosimétrie dans les études pré-cliniques de RIT- α selon le critère de Kellerer. Dans un second temps, le but de cette étude sera de quantifier l'impact de la prise en compte des fluctuations statistiques des dépôts d'énergie sur la pente et/ou la forme des courbes de survie cellulaire. Deux modèles biologiques simples seront utilisés : la cellule isolée, le cluster de cellules. Pour ces deux modèles, l'impact de distributions non-uniformes de l'activité sur les courbes de survie sera évalué.

1 Domaine d'emploi de la microdosimétrie selon le critère de Kellerer :

La forme des distributions d'énergie spécifique dans une cible irradiée par des particules α va dépendre de différents paramètres :

- la taille de la cible,
- l'énergie des particules α ,
- le point d'émission de ces particules,
- la dose absorbée.

Dans le contexte d'une étude dosimétrique de l'irradiation *in vivo* de cellules par des particules α , nous avons cherché à délimiter les intervalles de dose absorbée et de taille du noyau pour lesquels l'emploi de la microdosimétrie est requis si l'on respecte le principe de Kellerer.

1.1 Matériel et méthodes :

Pour chaque taille de cible (ici le noyau de la cellule) et chaque dose absorbée, la distribution (multi-coups) de l'énergie spécifique a été déterminée en utilisant le modèle développé. Dans un second temps, la variance relative de cette distribution a été calculée et comparée à la valeur de 20% définie plus haut. Ce calcul a été répété pour différentes localisations des sources (dans le noyau, le cytoplasme, à la surface des cellules, dans le volume entourant les cellules). Le radionucléide considéré est le ^{213}Bi et le rayon de la cellule est égal à 10 μm .

1.2 Résultats/Discussion :

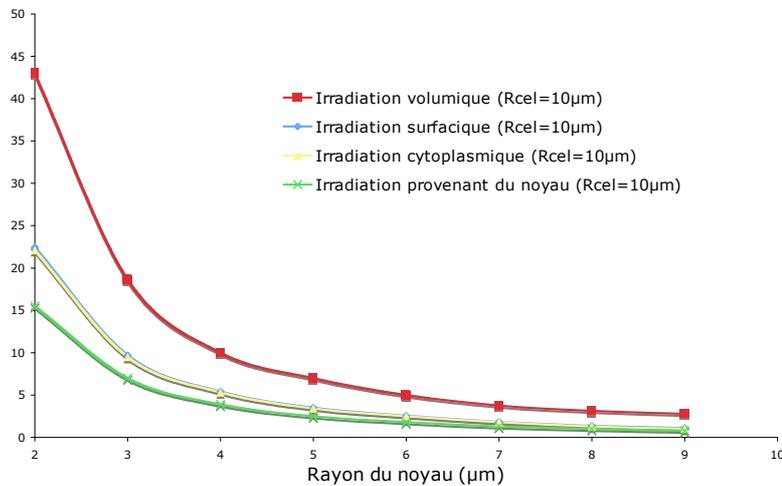


Figure 32: Dose moyenne absorbée pour laquelle l'écart type relatif de la distribution $f(z)$ est égale à 20% en fonction du rayon du noyau.

La figure 32 décrit la dose moyenne absorbée pour laquelle la variance relative de la distribution de l'énergie spécifique est égale à 20% en fonction du rayon du noyau de la cellule. Les différentes courbes représentent des localisations variables des sources. Ces courbes délimitent les intervalles de taille de la cible et de dose moyenne absorbée pour lesquels la microdosimétrie est conseillée. Pour chaque rayon, pour des valeurs de dose situées au-dessus de la courbe, les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie sont jugées non significatives et la microdosimétrie n'est pas nécessaire. Pour un rayon cellulaire de 5 µm et une irradiation volumique (i.e. irradiation provenant des anticorps radiomarqués libres en solution), la microdosimétrie est recommandée jusqu'à une dose absorbée de 7 Gy. Plus le rayon du noyau est petit, plus l'écart type de la distribution d'énergie spécifique sera grand. Pour un rayon nucléaire de 2 µm, la microdosimétrie doit être employée jusqu'à une dose absorbée de 43 Gy. On peut remarquer que les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie sont plus importantes quand l'irradiation est volumique que lorsque les sources sont localisées à la surface ou dans la cellule. Cette observation peut être aisément expliquée. Dans le cas où les sources sont localisées au niveau de la cellule, les particules α émises vont déposer leur énergie au début de leur parcours et donc avec un TEL relativement constant. Dans le cas d'une irradiation volumique, le TEL auquel les dépôts d'énergie sont effectués est très variable en raison du pic de Bragg. La distribution de l'énergie spécifique a donc un écart type plus important.

Dans le cadre des expériences *in vitro* d'irradiation α , les doses considérées sont inférieures aux doses mentionnées ci-dessus. Selon le principe de Kellerer, la microdosimétrie devrait donc être systématiquement utilisée pour analyser ces expériences.

2 Microdosimétrie et courbes de survie :

2.1 Introduction :

Dans un article datant de 1987 [5], Humm a montré que les courbes de survie de deux populations cellulaires issues de la même lignée mais irradiées par des particules α selon deux géométries distinctes pouvaient comporter des différences. La dose moyenne absorbée, n'était, dans ce cas, pas suffisante pour prédire la survie cellulaire. Lors d'une irradiation α , les cibles (noyaux cellulaires ou autres volumes spécifiés) ne reçoivent en effet pas toutes la même dose. Il est même possible que certaines cibles ne reçoivent aucune dose si aucune particule α ne les traverse [6]. Ce concept est illustré par la figure 33.

The figure is a very small, low-resolution image that is mostly illegible. It appears to be a diagram or a set of data points related to the path of alpha particles in matter, as described in the caption. The content is too small to be accurately transcribed or described in detail.

Figure 33: Parcours des particules α dans la matière (d'après [5]).

Il semble donc plus pertinent de relier la survie cellulaire au spectre complet de doses reçues par les cellules. Nous avons défini dans la partie précédente la zone d'emploi de la microdosimétrie selon le critère physique de Kellerer. Ici, nous allons essayer d'analyser si l'utilisation de ces spectres microdosimétriques pour évaluer la survie cellulaire à la suite d'une irradiation α apporte des informations supplémentaires par rapport à une analyse macrodosimétrique de la relation dose/effet. Il s'agit donc, d'une certaine manière, de préciser un critère biologique pour l'utilisation de la microdosimétrie.

Les études dosimétriques d'irradiation cellulaire par des particules α peuvent poursuivre deux objectifs différents. Le premier but d'une étude peut être de déterminer à la suite d'expériences *in vitro* la radiosensibilité d'une cellule. Les données d'entrée sont les mesures de survie et la géométrie de l'irradiation et le but du calcul est de déterminer la valeur macrodosimétrique D_0 ou la valeur microdosimétrique z_0 .

Le second type d'étude que l'on peut réaliser consiste à prédire, à partir d'une valeur de radiosensibilité cellulaire connue, la survie d'une population cellulaire irradiée, dans une géométrie donnée, par un radioélément émetteur α . Ce genre d'analyse peut permettre d'évaluer l'efficacité d'un traitement contre des cellules tumorales mais aussi sa toxicité vis-à-vis des tissus sains. Nous nous sommes placés ici dans le contexte de ce type d'étude.

La distribution multi-coups d'énergie spécifique au sein du noyau d'une cellule va varier en fonction de divers paramètres géométriques. La localisation des sources émettrices de particules α (dans le noyau, le cytoplasme, à la surface des cellules ou dans le milieu entourant les cellules) ainsi que la géométrie de l'irradiation (cellule isolée, monocouche ou

cluster de cellules) et la taille des cellules vont déterminer la forme des spectres $f(z)$. Cette forme va également varier en fonction de la dose moyenne absorbée reçue par la cible considérée.

Dans ce travail, nous avons cherché à caractériser les variations de survie des cellules, pour deux géométries représentatives (cellule isolée et cluster de cellules) lorsque la localisation des sources change.

La méthode utilisée a consisté à quantifier, à dose moyenne égale, la variation de survie prédite par ce modèle microdosimétrique de survie. Pour chaque localisation des sources, nous avons calculé la courbe de survie correspondante lorsque la dose absorbée augmente.

Ces variations des courbes de survie lorsque l'on utilise un calcul microdosimétrique seront mises en parallèle avec l'impact de la prise en compte de certaines non-uniformités.

2.2 Cellule isolée :

2.2.1 Matériel et méthodes :

Un calcul macrodosimétrique de la survie d'une population de cellules isolées peut être effectué à partir de l'équation suivante :

$$S = e^{-D/D_0} \quad (4-1)$$

où D est la dose moyenne absorbée par les cellules et D_0 représente la dose moyenne absorbée permettant de réduire à 37% la survie cellulaire.

Quelle que soit la localisation des désintégrations radioactives, une courbe unique représentera la survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée.

Dans le cadre d'une étude microdosimétrique, lorsque la localisation des sources varie, le spectre multi-coups d'énergie spécifique, $f(z)$ dans la cible cellulaire considérée, ici le noyau, va être modifié. La survie pour une même dose absorbée pourra donc varier. On va obtenir, pour chaque localisation de sources, une courbe de survie cellulaire différente. Si l'écart entre ces courbes est important, l'emploi de la microdosimétrie, dans ce genre d'étude est justifié. Si les courbes sont très proches, un calcul macrodosimétrique peut suffire pour prédire la survie cellulaire.

Le principe général de cette étude a donc consisté à évaluer l'écart entre les courbes de survie calculées lorsque la localisation des sources varie.

2.2.1.1 Quantification des différences :

La première façon de comparer deux courbes de survie est de faire le rapport des survies à dose égale. Pour des cellules isolées, les courbes de survie sont des exponentielles. Ce rapport des survies augmentera donc avec la dose. Toutefois, un rapport de $1 \cdot 10^5$ calculé en faisant le rapport d'une survie de $1 \cdot 10^{-16}$ sur une survie de $1 \cdot 10^{-21}$ est difficile à appréhender en pratique. Ces taux de survie restent théoriques puisque non-mesurables lors d'expériences *in vitro* ou *in vivo*. Pour cette raison, nous avons calculé un second paramètre pour quantifier l'erreur potentielle commise lorsque l'on ne réalise qu'une étude macrodosimétrique : il s'agit de la différence maximale de survie observée pour une même dose moyenne. Cette différence

maximale de survie (DMS) correspond à l'écart maximum entre deux courbes de survie lorsque l'on fait varier la dose de 0 à l'infini. Sa définition mathématique est la suivante :

$$\forall D, DMS = \max(S_1(D) - S_2(D))$$

où $S_1(D)$ et $S_2(D)$ représentent les survies calculées à la dose moyenne absorbée D dans les configurations d'irradiation 1 et 2.

2.2.1.2 Variation de la localisation des sources :

Au cours de cette étude, quatre localisation possible des sources ont été considérées:

- dans le noyau des cellules,
- dans le cytoplasme des cellules,
- à la surface des cellules,
- dans le milieu ou surnageant entourant les cellules.

Les courbes de survie correspondantes ont été calculées et comparées pour ces quatre localisations. La radiosensibilité des cellules a été fixée à $z_0=0,1$ Gy. La cellule considérée a un rayon cellulaire de $10 \mu\text{m}$ et un rayon nucléaire de $5 \mu\text{m}$. Le radioélément utilisé est le ^{213}Bi .

2.2.1.3 Variation de la taille et de la radiosensibilité des cellules :

Le même calcul a été répété en faisant varier les rayons cellulaire (de 3 à $10 \mu\text{m}$) et nucléaire (de 2 à $9 \mu\text{m}$).

Lorsque la radiosensibilité des cellules diminue, l'impact de la variation de la forme des spectres microdosimétriques sur la valeur de la survie va être atténué. Nous avons comparé les courbes de survie lorsque les sources sont localisées dans le noyau et lorsque les sources sont localisées dans le surnageant pour trois radiosensibilités différentes :

- $z_0=0,1$ Gy
- $z_0=0,5$ Gy
- $z_0=1$ Gy.

Le radioélément utilisé est toujours le ^{213}Bi .

2.2.1.4 Etude de cas réalistes :

In vitro ou *in vivo*, l'irradiation ne proviendra jamais exclusivement du noyau, du cytoplasme ou de la surface des cellules; une part de l'irradiation proviendra toujours des vecteurs radiomarqués restés libres dans le milieu entourant la cellule. Les calculs précédents ont donc été repris en utilisant un modèle de fixation classique des anticorps par les cellules, tel que celui décrit dans le chapitre III. La survie des cellules a été évaluée lorsque l'on fait augmenter la concentration d'anticorps ajoutés. Pour chaque concentration, le nombre d'anticorps radiomarqués fixés à la cellule et la densité de particules α émises par unité de volume ont été calculés. La survie cellulaire calculée a été représentée en fonction de la dose moyenne absorbée par le noyau des cellules.

Deux courbes de survie ont alors été comparées :

- une courbe de survie représentant le cas où les anticorps fixés sont dans le noyau,
- une courbe de survie représentant le cas où les anticorps fixés restent à la surface de la cellule.

Le nombre de sites de fixation des anticorps est équivalent quelle que soit la localisation des sources et a été fixé à $2,5 \cdot 10^5$.

La radiosensibilité des cellules a été fixée à $z_0=0,1$ Gy. La cellule considérée a un rayon cellulaire de $10 \mu\text{m}$ et un rayon nucléaire de $5 \mu\text{m}$. Le radioélément utilisé est le ^{213}Bi .

Un second calcul de « cas réaliste » a été réalisé. Dans le cadre de la RIT, le nombre d'antigènes présents à la surface des cellules tumorales est un paramètre important de l'efficacité du traitement. Nous avons donc représenté la survie en fonction de la dose moyenne absorbée, lorsque les anticorps radiomarqués au ^{213}Bi se fixent à la surface de la cellule. Les courbes de survie cellulaire de trois cellules comportant des nombres de sites antigéniques différents (0 sites ; $2,5 \cdot 10^5$ sites ; $1 \cdot 10^6$ sites) ont été comparées. Dans le cas de la cellule qui ne comporte pas de site antigénique, l'irradiation sera exclusivement volumique. Les comparaisons ont été effectuées en faisant varier le rayon nucléaire entre 2 et $9 \mu\text{m}$ et en faisant varier la radiosensibilité des cellules ($z_0=0,1$ Gy ; $0,5$ Gy ou 1 Gy).

2.2.1.5 Prise en compte des non-uniformités :

Deux articles récents [7, 8] se sont intéressés à des variations intercellulaires au sein d'une population cellulaire et les conséquences de ces variations au niveau dosimétrique. Kvinnsland a mesuré les rayons cellulaires et nucléaires d'un large échantillon de cellules de deux types (RAEL et OHS-s1). Il a montré que le rapport nucléo cytoplasmique de ces cellules était globalement constant mais que les rayons cellulaires et nucléaires étaient distribués suivant une gaussienne tronquée autour de la valeur moyenne de ces rayons. La prise en compte de ces distributions de rayons dans le calcul dosimétrique a modifié les courbes de survie calculée. Celles-ci ne sont alors plus linéaires.

Dans son travail, Netti a évalué la variation intercellulaire de l'activité fixée au sein d'une population cellulaire. Il a montré que cette activité était distribuée selon une loi log-normale de la forme :

$$f(a_0) = \frac{1}{a_0 \sigma \sqrt{2\pi}} \exp(-(\ln(a_0) - (\ln \langle a_0 \rangle - \sigma^2/2))^2 / 2\sigma^2) \quad (4-4)$$

$a_0 > 0$

Cette distribution est caractérisée par la valeur de l'activité fixée moyenne : $\langle a_0 \rangle$ et le paramètre de forme σ qui représente l'écart de la distribution log-normale par rapport à une distribution normale (Figure 34).

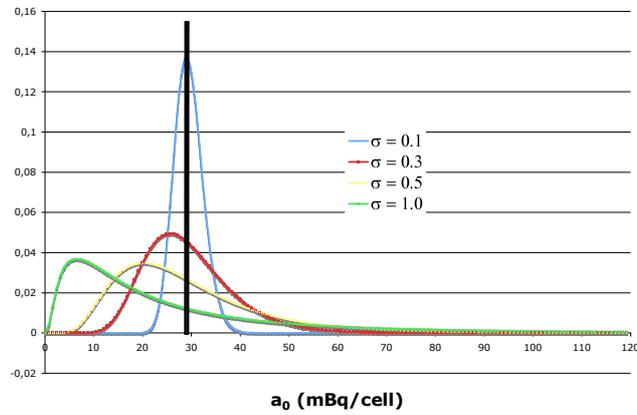


Figure 34: Distributions log-normale correspondant à différents paramètres de forme. Le trait noir vertical représente la valeur moyenne de l'activité.

L'impact de la prise en compte de la distribution log-normale de l'activité fixée est important. À nouveau, les courbes de survie ne sont plus linéaires (Figure 35).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 35: Survie cellulaire calculée en fonction de l'activité moyenne par cellule si l'on suppose que l'activité par cellule suit une distribution log-normale (d'après [8]).

Nous avons souhaité mettre en regard des différences observées précédemment entre les différentes localisations de sources, les variations induites par la prise en compte de ces variations intercellulaires au niveau d'une population cellulaire irradiée par des particules α . Il est important de noter que la prise en compte des distributions de rayons cellulaires dans le calcul des courbes de survie nécessite une méthode microdosimétrique et rejoint donc le

thème de ce chapitre. On va, en effet, faire la moyenne pondérée des survies de cellules de différentes tailles. Si l'on prend un D_0 identique pour les cellules de tailles différentes, le raisonnement est faux puisque le D_0 que l'on utilise correspond à une taille bien précise de cellules. En revanche, si l'on connaît la radiosensibilité microdosimétrique, z_0 , de la cellule, on peut l'appliquer à des cellules de différentes tailles pour calculer la survie cellulaire. On fera l'hypothèse, comme Kvinnsland, que l'on peut considérer un même z_0 pour des cellules de même type, quelle que soit leur taille.

La prise en compte de la distribution d'activité par cellule à l'intérieur d'une population cellulaire peut, elle, être réalisée à l'aide d'un calcul macrodosimétrique. Ce calcul consiste, en effet, à faire la moyenne des survies calculées pour chaque échantillon de la distribution d'activité. La survie est alors égale à :

$$S = \sum_{i=1}^N f(a_i) e^{-D_i / D_0} \quad (4-5)$$

où $f(a_i)$ est la densité de probabilité de l'activité fixée. N représente le nombre total de cellules.

Toutefois, si l'on veut comme dans la partie précédente comparer différentes localisations des sources (mais cette fois-ci en considérant que l'activité fixée est distribuée selon une loi log-normale à l'intérieur de la population cellulaire), il faudra utiliser la radiosensibilité microdosimétrique, z_0 .

Le premier calcul de cette étude a été repris : cellule $10 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, 4 localisations de sources, $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$, irradiation au ^{213}Bi . Ces courbes de survie ont été comparées aux courbes de survie lorsqu'une distribution de rayons cellulaires au sein de la population est prise en compte (rapport nucléo cytoplasmique constant = 0,5, $R_{\text{cel moyen}} = 10 \mu\text{m}$; écart type de la gaussienne tronquée = $2 \mu\text{m}$) et lorsqu'une distribution de la fixation de l'activité par les cellules est prise en compte (distribution log-normale, $\sigma=1$).

On a ensuite fait varier l'écart type de la distribution gaussienne des rayons et le paramètre σ de la distribution log-normale de l'activité fixée.

2.3 Résultats :

2.3.1 Variation de la localisation des sources :

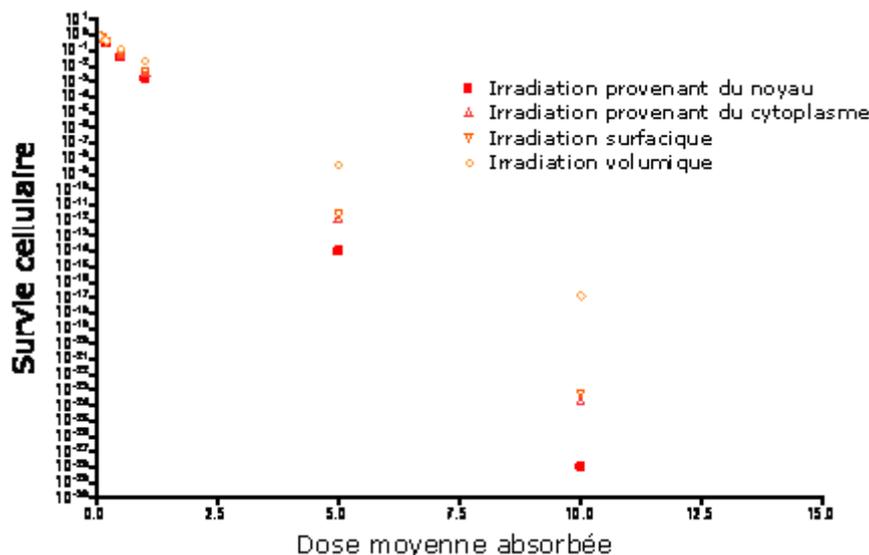


Figure 36: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée par le noyau lorsque la localisation des sources varie (noyau, cytoplasme, membrane ou dans le milieu extracellulaire). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

La figure 36 montre que pour une cellule très radiosensible ($z_0=0,1$ Gy), la survie cellulaire calculée, pour une même dose moyenne absorbée, va beaucoup varier en fonction de l'origine de l'irradiation (sources situées dans le noyau, le cytoplasme, à la surface de la cellule ou dans le milieu extracellulaire).

Les courbes de survie obtenues sont des courbes mono-exponentielles, ce qui correspond aux observations expérimentales. Leur pente varie en fonction de la localisation des sources. À dose moyenne absorbée égale, une irradiation provenant du noyau de la cellule sera ainsi plus cytotoxique qu'une irradiation provenant du milieu.

La survie est calculée selon la relation suivante :

$$Survie = \exp[-\bar{n}(1 - T_1(z_0))] \quad (4-2)$$

Pour chaque localisation des sources, les facteurs \bar{n} et $T_1(z_0)$ vont varier. Pour une même dose absorbée, le nombre moyen de coups sera beaucoup plus élevé lorsque les sources sont localisées dans le noyau puisque les dépôts d'énergie ont lieu au début du parcours de la particule α c'est-à-dire à faible TEL. On rappelle que l'on a, en effet, l'égalité suivante :

$$D = \bar{n} * \bar{z}_F \quad (4-3)$$

où \bar{z}_F est la moyenne fréquentielle de l'énergie spécifique par événement.

En revanche, lorsqu'une particule va traverser le noyau de la cellule, elle sera beaucoup plus létale si elle vient du milieu extracellulaire que si elle est émise dans le noyau (concept représenté par le facteur $(1 - T_1(z_0))$). On observe que le nombre moyen de coups varie, selon les localisations, plus rapidement que le facteur « $1 - T_1(z_0)$ ». Lorsqu'on représente le spectre microdosimétrique $f(z)$ pour une même dose absorbée pour les deux localisations de sources

mentionnées, on peut observer des différences pouvant expliquer les différences de survie (Figure 37).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 37: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau pour une dose moyenne absorbée de 5 Gy. Les trois courbes correspondent à des localisations des sources différentes (noyau, surface, milieu).

On remarque que les trois spectres $f(z)$ ont une forme de gaussienne. Le spectre $f(z)$ de l'irradiation volumique est plus aplati : une fraction plus importante de cellules va recevoir de faibles dépôts d'énergie par rapport au cas où les sources sont localisées dans le noyau. Ceci explique les différences de survie observée. Les forts dépôts d'énergie, plus fréquents dans le cas de l'irradiation volumique ont un impact négligeable sur le taux de survie.

Le tableau 3 montre que pour une dose moyenne de 1 Gy, la survie observée sera 12,7 plus élevée lorsque l'irradiation est volumique que lorsque l'irradiation provient du noyau de la cellule. Ce rapport atteindra $3,3 \cdot 10^5$ pour une dose moyenne absorbée de 5 Gy. Ces rapports seront plus faibles si l'on compare une irradiation volumique et une irradiation membranaire ou cytoplasmique (environ 4 pour une dose moyenne absorbée d'1 Gy).

	D=1 Gy	D=5Gy
Survie _{Volume} vs Survie _{Noyau}	12,7	$3,34 \cdot 10^5$
Survie _{Volume} vs Survie _{Membrane}	4,3	$1,45 \cdot 10^3$
Survie _{Membrane} vs Survie _{Noyau}	3,0	$2,31 \cdot 10^2$

Tableau 3: Rapports des survies pour des doses moyennes (délivrées au noyau de la cellule) égales (1 Gy et 5 Gy) lorsque les sources sont localisées dans le noyau, à la surface de la cellule, dans le milieu entourant la cellule. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

Le tableau 4 présente les différences maximales de survie entre différentes localisations de sources.

	Différence maximale
Survie _{Volume} vs Survie _{Noyau}	19 %
Survie _{Volume} vs Survie _{Membrane}	12 %
Survie _{Membrane} vs Survie _{Noyau}	7 %

Tableau 4: DMS pour une même dose moyenne au noyau de la cellule entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du noyau ou de la membrane et entre une irradiation provenant de la membrane et une irradiation provenant du noyau. Le radioélément considéré est le ²¹³Bi. La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

D'après le tableau 4, la différence maximale atteint 19% si l'on compare une irradiation volumique et une irradiation provenant du noyau de la cellule. Cette différence est significative et observable lors d'une expérience.

2.3.1.1 Variation de la taille et de la radiosensibilité des cellules :

Les résultats précédents ont été obtenus pour une cellule que l'on pourrait qualifier de standard ($R_{cel}=10 \mu m$; $R_{noy}=5 \mu m$). Nous avons cherché à savoir si ceux-ci variaient en fonction des rayons des cellules ou du rapport nucléo cytoplasmique, mais également de la radiosensibilité de la cellule.

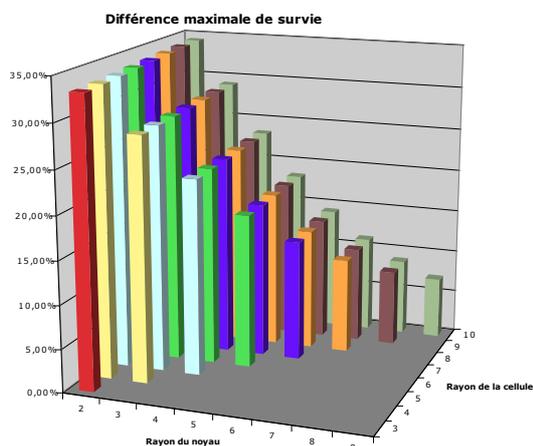


Figure 38: Différence maximale de survie pour une même dose moyenne délivrée au noyau de la cellule entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du

noyau pour différents rayons cellulaires et nucléaires. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

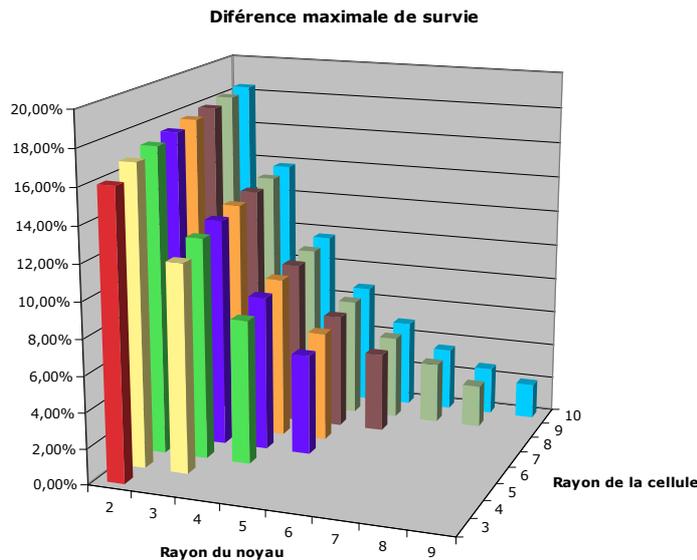


Figure 39: Différence maximale de survie pour une même dose moyenne au noyau de la cellule entre une irradiation provenant de la surface de la cellule et une irradiation provenant du noyau pour différents rayons cellulaires et nucléaires. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

Les figures 38 et 39 montrent que les différences les plus importantes entre une irradiation volumique et une irradiation provenant du noyau et entre une irradiation provenant de la surface des cellules et une irradiation provenant du noyau sont observées pour des cellules à « petits noyaux » ($R_{\text{noy}} = 2 \mu\text{m}$). Ces différences peuvent atteindre 34% et 18% entre une irradiation volumique et une irradiation provenant du noyau et entre une irradiation surfacique et une irradiation provenant du noyau respectivement. Pour ces cellules, il sera donc essentiel de réaliser une étude microdosimétrique.

Pour des cellules dont le rayon du noyau est supérieur à $7 \mu\text{m}$, les différences observées seront inférieures à 12% entre une irradiation volumique et une irradiation provenant du noyau et à 4% entre une irradiation surfacique et une irradiation provenant du noyau.

Ces différences ont été calculées pour des cellules très radiosensibles ($z_0 = 0,1 \text{ Gy}$). Dans la littérature, les radiosensibilités rapportées sont généralement comprises entre $z_0 = 0$ et $z_0 = 1 \text{ Gy}$ pour des irradiations α . Lorsque l'on augmente la valeur de z_0 , les différences entre les courbes de survie se réduisent comme le montre la figure 40:

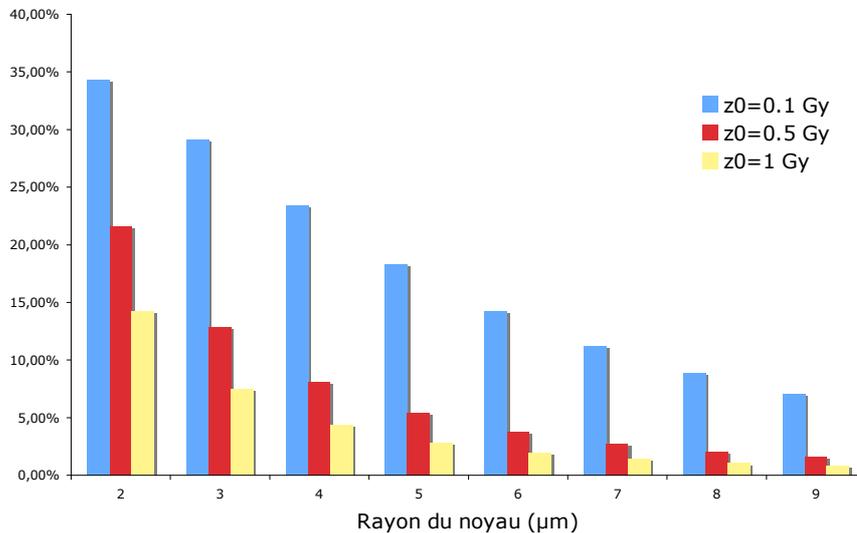


Figure 40: DMS pour une même dose moyenne au noyau entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du noyau pour différents rayons nucléaires ($R_{\text{cel}}=10 \mu\text{m}$) et pour différentes radiosensibilités ($z_0=0,1$ ou $0,5$ ou 1 Gy). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

La radiosensibilité de la cellule est un paramètre important lorsqu'on évalue l'intérêt d'un calcul microdosimétrique pour l'étude de la relation dose-effet. Pour des cellules dont le noyau est supérieur à $5 \mu\text{m}$ et pour des valeurs de z_0 supérieures à $0,5 \text{ Gy}$, l'évaluation de la survie au moyen d'une dose moyenne ne conduira qu'à une erreur potentielle de 5% sur la survie cellulaire, ce qui est acceptable. En revanche pour des cellules à petits noyaux, il convient, quelle que soit la radiosensibilité de la cellule, d'effectuer un calcul microdosimétrique (environ 15% de différence pour une cellule $R_{\text{cel}}=10 \mu\text{m}$ et $R_{\text{noy}}=2 \mu\text{m}$ lorsque $z_0=1 \text{ Gy}$).

2.3.1.2 Cas réalistes :

La figure 41 montre que dans des cas réalistes (i.e. une partie des anticorps radiomarqués restent libres en solution) les courbes de survie ne sont plus alors de simples exponentielles.

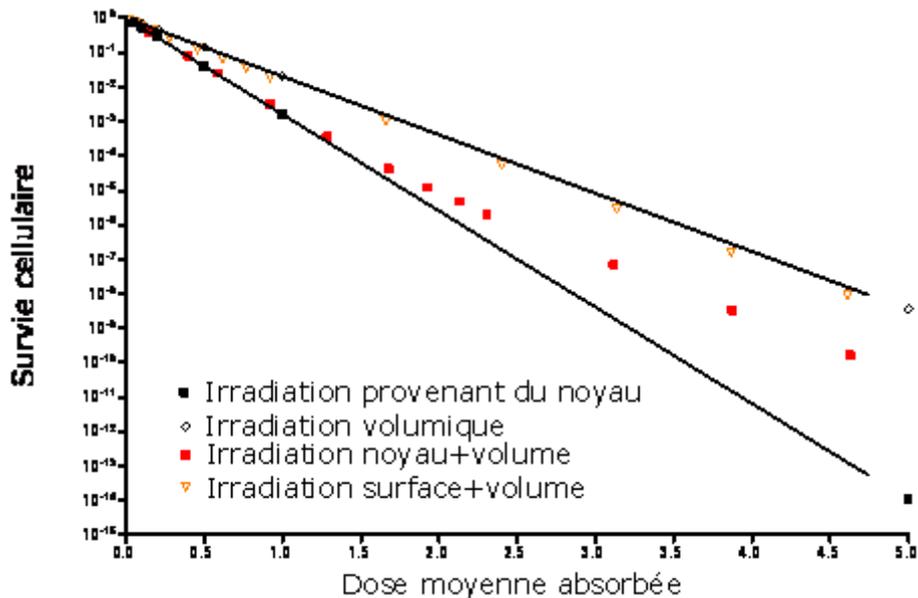


Figure 41: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée par le noyau. Les 4 couleurs de points représentent des localisations de sources variables (noyau, volume, noyau+volume, surface+volume). Le radioélément considéré est le ²¹³Bi. La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $\alpha_0 = 0,1$ Gy.

Cette forme peut être expliquée par le type de fixation des anticorps. Au début, l'ensemble des récepteurs de la cellule sont libres et donc pour une faible concentration d'anticorps ajoutés, la part de l'irradiation provenant de la cellule sera importante. À faibles concentrations d'anticorps ajoutés et donc à faibles doses absorbées, les courbes de survies « réalistes » vont donc se superposer aux courbes de survie où l'on considère que l'irradiation vient exclusivement de la cellule. Lorsque la concentration d'anticorps ajoutés va augmenter, les récepteurs cellulaires vont être, petit à petit, saturés et la part relative de la dose totale provenant des anticorps radiomarqués restés libres dans le surnageant va augmenter. Les courbes de survie « réalistes » vont alors se rapprocher des courbes de survie correspondant à une irradiation volumique.

Les différences de survie observées entre les irradiations provenant du noyau et de la membrane sont encore plus grandes que celles observées dans des cas non-réalistes. La différence maximale passe ainsi de 7% à 10,5% entre une irradiation surfacique et une irradiation provenant du noyau. En revanche, à fortes doses, l'irradiation devenant majoritairement volumique et ce, quelle que soit la cible du vecteur, les courbes de survie vont se superposer.

Les différences maximales de survie pour une même dose absorbée entre la cellule ne comportant aucun site et la cellule comportant 1 million de sites sont représentées dans la figure 42.

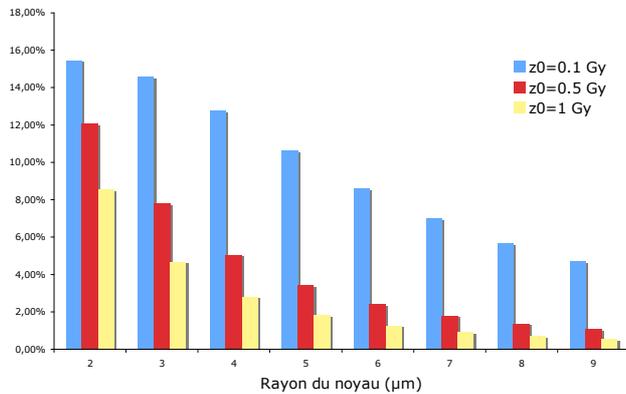


Figure 42: DMS en fonction du rayon du noyau pour trois radiosensibilités ($z_0=0,1; 0,5; 1$ Gy). Cette différence maximale exprime l'écart entre les courbes de survie d'une cellule comportant $1 \cdot 10^6$ sites antigéniques et une cellule ne comportant aucun site. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

Les différences les plus importantes sont observées pour les cellules à petits noyaux. Cette différence atteint 16% pour une cellule possédant un noyau de 2 μm de rayon et une radiosensibilité, $z_0=0,1$ Gy. Pour les cellules possédant un noyau dont le rayon est supérieur à 4 μm, la différence maximale de survie est inférieure à 5% pour $z_0=0,5$ Gy et $z_0=1$ Gy.

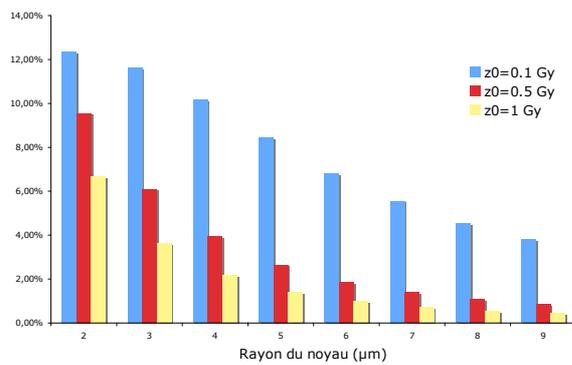


Figure 43: DMS en fonction du rayon du noyau pour trois radiosensibilités ($z_0=0,1; 0,5; 1$ Gy). Cette différence maximale exprime l'écart entre les courbes de survie d'une cellule comportant $2,5 \cdot 10^5$ sites antigéniques et une cellule ne comportant aucun site. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

Lorsque l'on considère une cellule possédant moins de sites antigéniques ($2,5 \cdot 10^5$ sites), la différence maximale de survie avec la cellule ne possédant aucun site diminue (Figure 43). Pour les cellules possédant un noyau dont le rayon est supérieur à $4 \mu\text{m}$, la différence maximale de survie est inférieure à 4% pour $z_0=0,5 \text{ Gy}$ et $z_0=1 \text{ Gy}$.

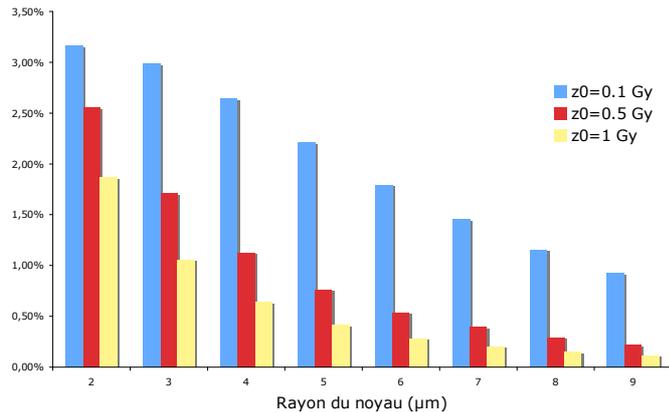


Figure 44: Différence maximale de survie en fonction du rayon du noyau pour trois radiosensibilités ($z_0=0,1; 0,5; 1 \text{ Gy}$). Cette différence maximale exprime l'écart entre les courbes de survie d'une cellule comportant $2,5 \cdot 10^5$ sites antigéniques et une cellule comportant $1 \cdot 10^6$ sites antigéniques. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

Si l'on compare les survies des cellules possédant 1 million de sites et $2,5 \cdot 10^5$ sites, les différences sont très faibles (Figure 44). Elles sont inférieures à 3,5% quel que soit le rayon du noyau et quelle que soit la radiosensibilité. La microdosimétrie dans ce cas n'est pas utile. Les différences observées dans des cas réalistes sont relativement faibles. Pour des cellules possédant des densités d'antigènes à leur surface relativement proches, un calcul macrodosimétrique semble suffisant pour prédire leur survie. Si l'on compare une cellule d'1 million de sites et une cellule ne possédant pas de sites antigéniques, la microdosimétrie doit être utilisée si les cellules sont fortement radiosensibles. Pour une radiosensibilité moyenne, la macrodosimétrie peut suffire pour calculer la survie si le noyau des cellules a un rayon supérieur à $4 \mu\text{m}$.

2.3.2 Prise en compte des non-uniformités :

La figure 45 reprend les courbes de survie montrées dans la figure 36. Ces courbes sont comparées aux courbes de survie calculées pour une distribution gaussienne de rayons cellulaires et pour une distribution log-normale de la quantité d'activité fixée par cellule.

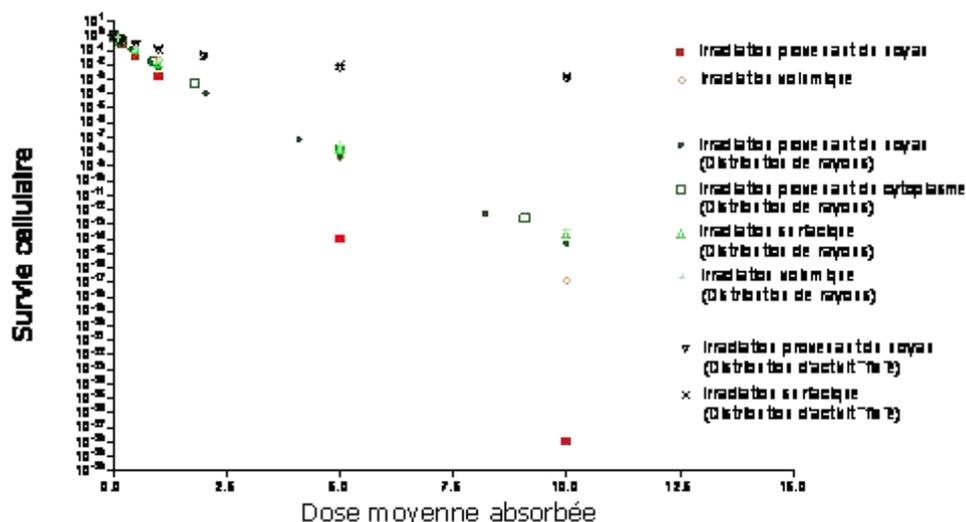


Figure 45: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée par le noyau pour deux localisations des sources (Noyau, ou dans le milieu extracellulaire), lorsqu'une distribution de rayons cellulaires au sein de la population est prise en compte et lorsqu'une distribution de la fixation de l'activité par les cellules est prise en compte. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

Nous observons les effets mentionnés dans les travaux de Neti [8] et de Kvinnsland [7]. La prise en compte des variations intercellulaires modifie les courbes de survie. Celles-ci ne sont plus linéaires.

On observe également, que la survie calculée en prenant en compte une distribution des rayons cellulaires sera beaucoup plus élevée que lorsque le calcul est effectué en considérant des rayons cellulaires moyens. La différence maximale peut atteindre 10% (Tableau 5).

	Différence maximale
Survie _{Noyau-distrib. de rayons} vs Survie _{Noyau-rayon moyen}	10 %
Survie _{Membrane--distrib. de rayons} vs Survie _{Membrane- rayon moyen}	3,5 %
Survie _{Volume--distrib. de rayons} vs Survie _{Volume- rayon moyen}	1,3 %

Tableau 5: DMS pour une même dose moyenne au noyau lorsqu'une distribution de rayons cellulaires est prise en compte par rapport à un calcul réalisé avec des rayons moyens pour différentes localisations des sources (noyau, membrane, milieu extracellulaire). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

On remarque enfin que quelle que soit la localisation des sources, on observera, à dose moyenne absorbée identique, un taux de survie quasiment constant.

Les observations précédentes sont également valables lorsqu'on considère que chaque cellule ne va pas fixer de la même manière l'activité présente dans le milieu mais que l'activité fixée va être distribuée selon une loi log-normale au sein d'une population cellulaire. Les courbes, lorsque la localisation des sources varie, sont à nouveau très proches.

	Différence maximale
Survie_{Noyau}-distrib. d'activité vs Survie_{Noyau}-activité moyenne	20 %
Survie_{Membrane}-- distrib. d'activité vs Survie_{Membrane}-activité moyenne	20 %

Tableau 6: DMS pour une même dose moyenne au noyau lorsqu'une distribution de l'activité fixée (distribution log-normale, sigma=1) est prise en compte par rapport à un calcul réalisé avec une activité moyenne pour différentes localisations des sources (noyau, membrane). Le radioélément considéré est le ²¹³Bi. La radiosensibilité de la cellule a été fixée à z₀ = 0,1 Gy.

La différence maximale lorsque l'on tient compte de la distribution log-normale peut atteindre 20 % (Tableau 6).

2.3.2.1 Variation de l'écart type de la distribution gaussienne des rayons :

Pour la même dose moyenne, la prise en compte d'une distribution gaussienne des rayons cellulaires (avec un écart type relatif de 40%, conforme à ce qui est mesuré expérimentalement) au lieu d'un rayon moyen conduit à une différence maximale de survie d'environ 6 % quel que soit le rayon de la cellule, lorsque l'activité est fixée par la cellule. Si l'irradiation est volumique, cette prise en compte n'a qu'un effet négligeable sur la prédiction de la survie (de 1 à 2%).

Cette différence augmente toutefois très vite avec l'écart type de la distribution des rayons :

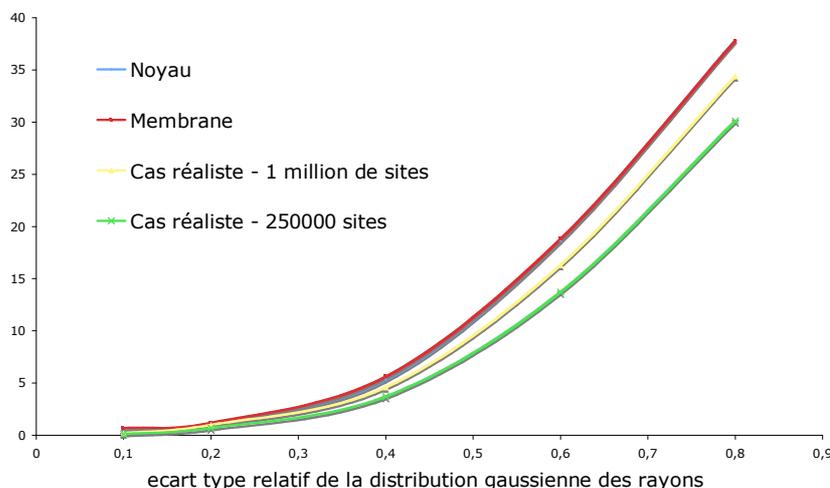


Figure 46: Différence maximale de survie lorsque l'on tient compte de la distribution des rayons et lorsque l'on considère des rayons moyens (R_{cellulaire}moyen=10 µm; R_{noyau}moyen=5 µm) en fonction de l'écart type relatif de la distribution gaussienne des rayons. Le radioélément considéré est le ²¹³Bi. La radiosensibilité de la cellule a été fixée à z₀ = 0,1 Gy.

La comparaison des courbes considérant des cas réalistes montre que plus le nombre de sites antigéniques présents à la surface des cellules est faible plus l'impact de la prise en compte d'une distribution de rayons est faible. Lorsque les cellules présentent 250000 sites antigéniques, la part relative de la dose provenant du volume est, en effet, plus élevée que lorsque la cellule présente 1 million de sites.

2.3.2.2 Variation du paramètre de forme de la distribution d'activité :

Le paramètre de forme, σ , de la distribution log-normale de l'activité fixée va beaucoup influencer la forme des courbes de survie calculées. La figure 47 montre que si ce paramètre vaut 0,1 l'impact de la prise en compte de la distribution d'activité par cellule sera négligeable. Si ce paramètre vaut 1, la différence maximale avec un calcul réalisé avec une valeur moyenne atteindra 20%. Dans son article, Neti [8] a mesuré des distributions dont le paramètre de forme est proche de 0,5. On le voit, dans ce cas, la différence maximale de survie pour une dose absorbée est proche de 4%.

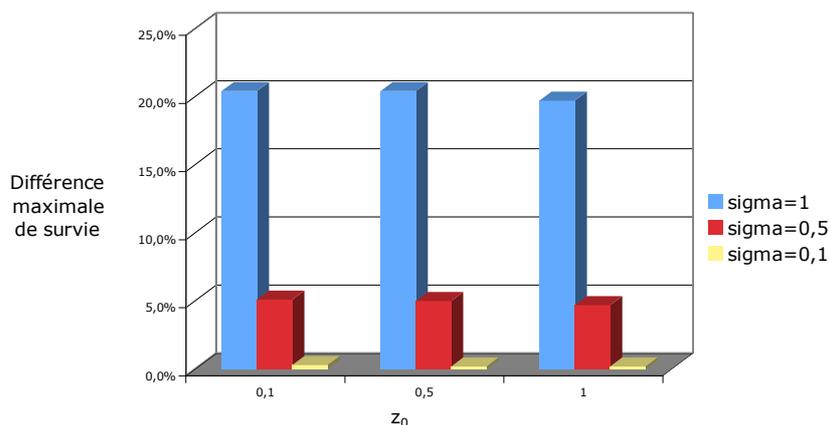


Figure 47: Différence maximale de survie lorsque le nombre de désintégrations en surface de la cellule est constant et lorsque ce nombre est distribué selon une distribution log-normale en fonction de la radiosensibilité z_0 . Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

2.3.3 Discussion/Conclusion :

Pour une même dose absorbée, on a vu que la survie d'une cellule pouvait être différente suivant la localisation des sources. On a déterminé que cette différence pouvait atteindre 20% entre une irradiation provenant du noyau et une irradiation provenant du milieu entourant les cellules pour une cellule, très radiosensible ($z_0=0,1$ Gy) de rayon cellulaire $10 \mu\text{m}$ et de rayon

nucléaire 5 μm . Cette différence augmente encore pour des cellules aux noyaux plus petits. La microdosimétrie est dans ce cas indispensable.

Lorsque l'on s'intéresse à des cas réalistes dans le contexte de la RIT- α , l'emploi de la microdosimétrie est justifié pour des cellules très radiosensibles et possédant un petit noyau ($R_{\text{noy}} < 4 \mu\text{m}$).

Pour une cellule isolée, l'intervalle d'intérêt de la microdosimétrie pour le calcul de la survie cellulaire semble donc moins étendu que ne le laissait penser le critère de Kellerer. Pour des cellules possédant un noyau dont le rayon est supérieur à 5 μm , une étude macrodosimétrique sera souvent suffisante. Cette conclusion est à moduler en fonction de la radiosensibilité des cellules étudiées.

La prise en compte du fait que toutes les cellules d'une population n'ont pas les mêmes rayons cellulaires et nucléaires mais que ceux-ci sont distribués de façon gaussienne a modifié les courbes de survie. La relation entre la survie et la dose moyenne n'est alors plus linéaire et les différences de localisation des sources n'ont plus beaucoup d'influence. Si une partie importante de la dose vient des anticorps restés libres en solution, l'impact de cette prise en compte diminue fortement.

La prise en compte d'une distribution d'activité fixée va également beaucoup influencer les courbes de survie. La toxicité apparente des particules α est alors beaucoup moins forte, en raison des cellules non marquées ou faiblement marquées. La relation entre la survie et la dose n'est plus linéaire. La survie cellulaire va, dans un premier temps, diminuer de façon exponentielle puis diminuer beaucoup plus lentement lorsque la dose moyenne absorbée va augmenter. La diminution exponentielle de la survie pour de faibles doses absorbées représente la mort des cellules fortement marquées (i.e qui concentrent à leur surface une forte activité). Dans la deuxième phase de la courbe, bien que la dose moyenne absorbée augmente, certaines cellules vont demeurer faiblement marquées et ne seront pas tuées. Cette forme non-linéaire de la courbe de survie correspond au concept d'« overkill » défini par Humm [9].

L'impact de cette distribution d'activité peut être pris en compte par un calcul macrodosimétrique si le paramètre de forme, σ , de la distribution log-normale est suffisamment élevé ($>0,4$) et si la part de la dose volumique dans la dose totale est faible puisque, dans ces cas, les courbes de survie sont confondues lorsque les localisations des sources varient.

Toutefois, la distribution des récepteurs à la surface des cellules tumorales ciblées par des anticorps radiomarqués est encore mal connue. Elle n'a été mesurée que sur quelques lignées cellulaires et c'est encore insuffisant pour en tirer une conclusion générale.

2.4 Cluster de cellules :

La modélisation de la survie d'une population cellulaire regroupée sous la forme d'un cluster à la suite d'une irradiation α ajoute une dimension supplémentaire par rapport aux études pour des cellules isolées. Dans ce dernier cas, et si l'on considère que les sources radioactives sont distribuées de façon homogène, l'ensemble des cellules sera placé dans des conditions identiques d'irradiation. Un calcul microdosimétrique pour une cellule cible suffira donc à prédire la survie globale de la population cellulaire. Lors d'une irradiation α de cellules assemblées en cluster, de larges variations de dépôts d'énergie au sein des différentes cellules pourront être observées en raison du feu croisé : les cellules situées à la périphérie du cluster recevront moins d'énergie en moyenne que les cellules situées au centre du cluster [10]. La figure 48 illustre cette observation. Elle montre les spectres $f(z)$ d'une cellule située au centre

d'un cluster de rayon 100 μm et d'une cellule située à la périphérie de ce même cluster lorsque 21 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu à la surface de chaque cellule du cluster. La dose moyenne reçue par la cellule centrale est plus de 2,5 fois la dose reçue par la cellule périphérique (5 Gy contre 1,9 Gy respectivement). Pour évaluer la survie globale de ce groupe de cellules, il conviendra donc d'évaluer les dépôts d'énergie pour chaque cellule (ou dans une moindre mesure pour plusieurs groupes de cellules). C'est ce que l'on appelle traditionnellement la dosimétrie multi-cellulaire.

QuickTime™ et un
décodeur PDF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 48: Distributions d'énergie spécifique, $f(z)$, dans les noyaux d'une cellule située au centre du sphéroïde et d'une cellule située en périphérie du cluster ($R_{\text{cluster}}=100 \mu\text{m}$, compacité = 0,74). 21 désintégrations de ^{213}Bi ont lieu à la surface de chaque cellule du cluster.

Dans cette étude, nous avons simulé l'impact d'une irradiation α sur différents types de clusters de cellules en faisant varier : la taille des clusters, leur compacité, la localisation des sources. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la diffusion des anticorps radiomarqués pouvait être restreinte dans les sphéroïdes, limitant leur fixation aux cellules proches de la surface externe [11, 12]. L'influence de cette distribution non-homogène de l'activité dans les clusters sur la survie globale des cellules irradiées a été évaluée grâce à notre modèle dosimétrique.

Dans le cas de clusters de cellules, il est difficile de relier la survie globale à une dose unique. Comme nous l'avons dit précédemment, la dose dans le sphéroïde n'est pas uniforme, et calculer la moyenne des doses reçues par les différentes cellules serait une erreur, d'après la définition de la dose. La seule dose à laquelle nous pouvons relier la survie est la dose au sphéroïde. Nous représenterons donc la moyenne des survies des cellules du sphéroïde en fonction de la dose moyenne au sphéroïde. Cette solution est loin d'être satisfaisante puisque pour deux doses moyennes au sphéroïde identiques, il est intuitif de penser que l'on pourra obtenir des survies très variables. Dans le cadre de ce travail où nous cherchons à démontrer l'intérêt de la microdosimétrie par rapport à un calcul macrodosimétrique, cette contrainte nous permettra d'ajouter une dimension à nos conclusions : nous pourrons en effet comparer les apports de la dosimétrie multi-cellulaire par rapport à une dosimétrie « tumeur ». Le mot « tumeur » est exagéré ici puisque les clusters auxquels nous nous intéresserons sont de taille réduite (diamètre de 200 μm maximum) et représentent plutôt des micrométastases.

2.4.1 Matériel et méthodes :

2.4.1.1 Principe général des comparaisons :

Les calculs de survie ont été réalisés avec le modèle microdosimétrique. Ces résultats ont été comparés avec un calcul macrodosimétrique de la survie.

Dans ce dernier cas, nous avons calculé le paramètre de radiosensibilité macrodosimétrique, D_0 , à partir de la courbe de survie (calculée par le modèle microdosimétrique) qui correspond au cas où les sources sont localisées dans le noyau. Selon un modèle macrodosimétrique de la survie, on aura :

$$S = \sum_{i=1}^N S_i \quad (4-6)$$

$$S = \sum_{i=1}^N e^{-D_i/D_0} \quad (4-7)$$

où N représente le nombre de cellules dans le cluster.

Pour une dose au sphéroïde donnée, on aura donc une survie moyenne, S, calculée par le modèle microdosimétrique. Connaissant, pour cette dose au sphéroïde, la dose moyenne reçue par chacune des cellules du cluster, on pourra déterminer la valeur de D_0 telle que l'équation 4-7 soit satisfaite.

Pour les autres localisations, nous avons calculé les doses reçues par chaque cellule du cluster et à l'aide du D_0 précédemment déterminé, nous avons calculé la survie de chacune des cellules. Les courbes de survie représentent la moyenne de ces survies représentées en fonction de la dose moyenne au sphéroïde.

Les courbes de survie « microdosimétrique » et « macrodosimétrique » ainsi calculées seront comparées et la différence maximale de survie sera déterminée comme décrit dans la partie précédente.

Nous avons également évalué l'intérêt de la dosimétrie multi-cellulaire. Dans le cadre d'une dosimétrie « tumeur », la survie cellulaire est évaluée en fonction de la dose moyenne au sphéroïde. Quelle que soit la localisation des sources notamment, la survie cellulaire sera donc représentée par une courbe de survie unique. Dans le cadre d'une dosimétrie multi-cellulaire, chaque localisation de sources conduira à une courbe de survie différente. L'intérêt de la dosimétrie multi-cellulaire sera donc évalué en calculant la différence maximale de survie entre ces différentes courbes.

2.4.1.2 Variation de la taille du cluster :

Des clusters de trois tailles (de 21, 50 et 100 μm de rayon) ont été étudiés. Pour chaque cluster, on a fait varier la localisation des sources (dans le noyau, dans le cytoplasme, à la surface des cellules ou dans la solution entourant le cluster). Les courbes de survie ont été calculées selon une méthode microdosimétrique et selon une méthode macrodosimétrique

comme décrit précédemment. La radiosensibilité des cellules a été fixée à $z_0=0,1$ Gy. Le radioélément utilisé est le ^{213}Bi .

2.4.1.3 Variation de la taille des cellules et de la radiosensibilité :

Pour un cluster de 100 μm de rayon, les courbes de survie de trois cellules de tailles différentes :

- $R_{\text{cel}}=10 \mu\text{m}$, $R_{\text{noy}}=9 \mu\text{m}$
- $R_{\text{cel}}=10 \mu\text{m}$, $R_{\text{noy}}=5 \mu\text{m}$
- $R_{\text{cel}}=10 \mu\text{m}$, $R_{\text{noy}}=2 \mu\text{m}$

ont été calculées pour différentes localisations des sources (noyau, surface, volume entourant les cellules). Le radioélément simulé est le ^{213}Bi .

On a fait varier la radiosensibilité des cellules : $z_0=0,1$ Gy ; 0,5Gy ou 1Gy.

2.4.1.4 Impact d'une distribution de rayons :

Les cellules à l'intérieur d'un cluster ne présenteront pas toutes les mêmes rayons cellulaires. Pour évaluer l'impact de la prise en compte d'une distribution de rayons au sein de la population cellulaire, deux types de clusters ont été simulés :

- clusters composés de cellules dont les rayons cellulaires et nucléaires sont fixes ($R_{\text{cel}}=10 \mu\text{m}$, $R_{\text{noy}}=5 \mu\text{m}$),
- clusters composés de cellules dont les rayons cellulaires et nucléaires varient (distribution gaussienne de ces rayons parmi la population cellulaire : $R_{\text{cel-moyen}}=10 \mu\text{m}$, écart type : 2 μm).

Pour le même rayon de sphéroïde (50 μm et 100 μm) et pour le même nombre de cellules à l'intérieur de ces sphéroïdes, les survies moyennes ont été comparées.

La radiosensibilité des cellules a été fixée à $z_0=0,1$ Gy. Le radioélément utilisé est le ^{213}Bi .

2.4.1.5 Impact d'une distribution d'activité

Les cellules à l'intérieur d'un cluster ne présentent pas toutes le même nombre d'antigènes à leur surface. Nous avons évalué l'impact de cette distribution non-uniforme des sites antigéniques à la surface des cellules sur la survie cellulaire. Pour un cluster de rayon 100 μm , la survie cellulaire a été calculé lorsqu'on considère une distribution log-normale ($\sigma=0,1$ ou 1) du nombre d'atomes de ^{213}Bi fixés à la surface des cellules et comparée à la survie cellulaire lorsque chaque cellule fixe le même nombre d'atomes de ^{213}Bi à sa surface. La radiosensibilité des cellules a été fixée à $z_0=0,1$ Gy. Les cellules considérées ont un rayon cellulaire de 10 μm et un rayon nucléaire de 5 μm .

2.4.1.6 Hétérogénéités spatiales de l'activité :

La pénétration des anticorps radiomarqués à l'intérieur d'un sphéroïde est souvent partielle [11, 12]. Nous avons cherché à évaluer l'impact de cette limitation de la RIT sur l'efficacité d'un traitement.

Le premier effet d'un marquage partiel des cellules d'un cluster sera de réduire le nombre de désintégrations dans le cluster. Les courbes de survie correspondant aux cas où 100%, 50%, 10% des cellules du cluster ($R=100 \mu\text{m}$) sont marquées en surface ont été calculées en

fonction du nombre de désintégration par cellule. Une courbe de survie supplémentaire a été calculée et correspond au cas où seules les cellules en périphérie du cluster (couche d'épaisseur de 10 μm) sont marquées. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité des cellules est fixée à $z_0=0,1$ Gy.

Les courbes de survie ont ensuite été représentées en fonction de la dose moyenne au sphéroïde.

Dans une étude expérimentale publiée par Neti [13], des cellules marquées et non marquées au ^{210}Po ont été mélangées selon différentes proportions (100%, 10%, 1% de cellules marquées) et assemblées sous la forme de sphéroïdes. Après 72 heures d'irradiation, la survie cellulaire a été mesurée. Nous avons souhaité comparer les résultats fournis par notre calcul théorique et les résultats expérimentaux de Neti. Un cluster de rayon 100 μm de cellules de rayons $R_{\text{cel}}=5$ μm et $R_{\text{noy}}=4$ μm a été modélisé soit 5917 cellules pour une compacité de 0,74. Dans l'étude de Neti le ^{210}Po -citrate est internalisé : 22% des désintégrations ont lieu dans le noyau, 78% des désintégrations ont lieu dans le cytoplasme. Les spectres microdosimétriques de chaque cellule ont été calculés. La survie globale des cellules du cluster a été calculée pour différentes radiosensibilités.

2.4.2 Résultats:

2.4.3 Variation de la taille du cluster :

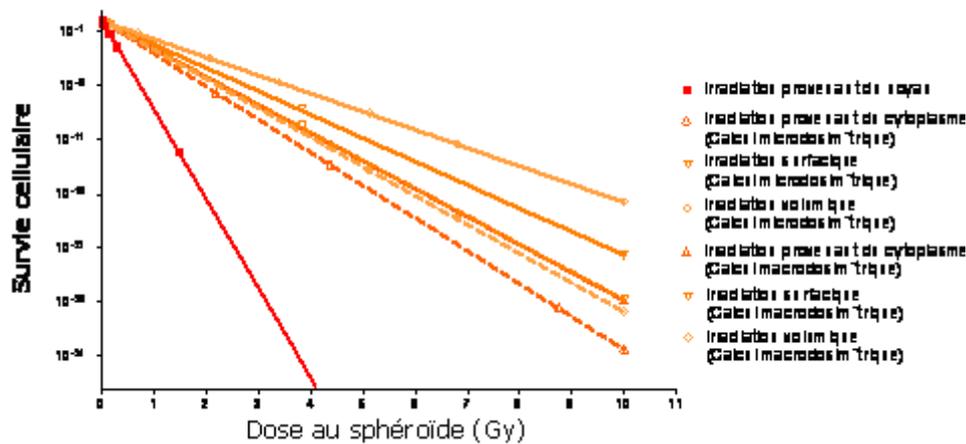


Figure 49: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon 21 μm en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Les courbes de survie sont calculées soit par une méthode microdosimétrique (lignes) soit par une méthode macrodosimétrique (pointillés). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

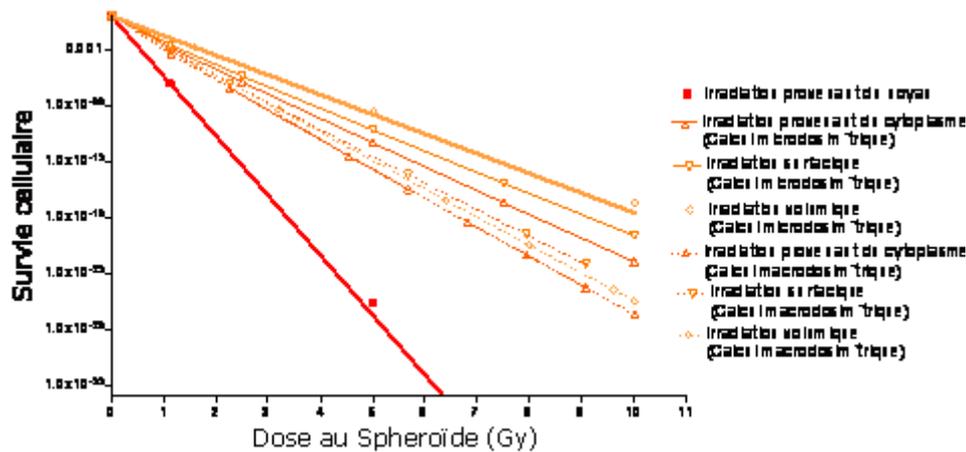


Figure 50: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon 50 µm en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Les courbes de survie sont calculées soit par une méthode microdosimétrique (lignes) soit par une méthode macrodosimétrique (pointillés). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

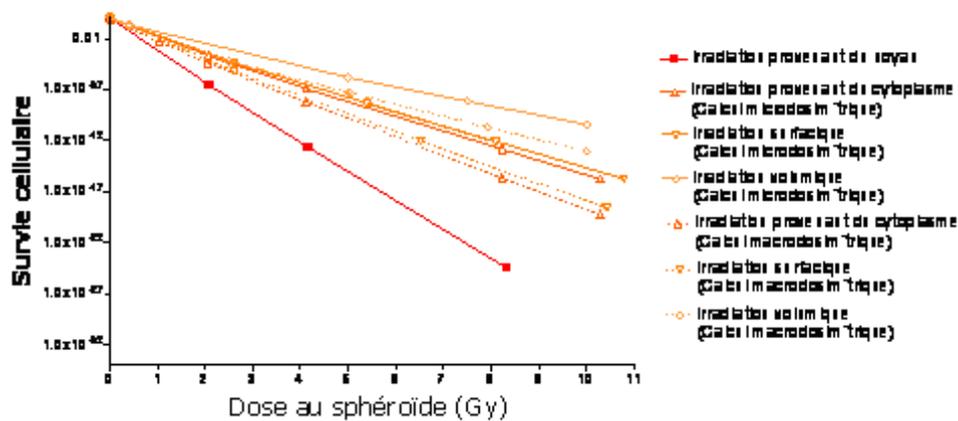


Figure 51: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon 100 µm en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Les courbes de survie sont calculées soit par une méthode microdosimétrique (lignes) soit par une méthode macrodosimétrique (pointillés). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

2.4.3.1 Dosimétrie multi-cellulaire :

On voit que la dose au sphéroïde n'est pas suffisante pour caractériser la survie cellulaire attendue. Pour la même dose absorbée, des irradiations provenant du cytoplasme ou de la

surface de la cellule donneront globalement la même survie (moyenne des survies calculées pour chaque cellule). Pour des sphéroïdes assez grands (à l'échelle des particules α , e.g. 100 μm de rayon), l'irradiation volumique donnera également une survie équivalente à celle d'observée pour les deux irradiations précédemment citées (différence maximale : 1%). En revanche pour le cluster de rayon 21 μm , la différence maximale de survie entre une irradiation volumique et une irradiation provenant du noyau pourra atteindre 53% et la différence entre une irradiation surfacique et une irradiation provenant du noyau 46% (Tableau 7). À dose moyenne absorbée équivalente, l'irradiation provenant du noyau des cellules entraînera systématiquement une toxicité beaucoup plus importante.

Les courbes de survie exprimée en fonction de la dose au sphéroïde sont des exponentielles pour les petits clusters (21 μm). Lorsque le rayon des sphéroïdes augmente (50 μm et 100 μm), ce ne sont plus des exponentielles.

La survie montrée dans les figures 49, 50 et 51 représente la moyenne des survies des cellules qui constituent le cluster. Dans un cluster de petite taille, la dose reçue par chacune des cellules sera relativement homogène. Pour le cluster de rayon 21 μm , le rapport de la dose minimale reçue par une cellule sur la dose maximale reçue par une cellule est de 0,9 lorsque les sources sont localisées dans le noyau des cellules. Pour le cluster de rayon 100 μm , ce rapport sera de 0,51. Dans le cas d'un petit cluster, la dose au sphéroïde représentera donc assez bien la cellule reçue par chaque cellule. Dans le cadre d'une irradiation α , la survie cellulaire représentée en fonction de la dose est une exponentielle ; il est normal de retrouver des courbes de survie de forme exponentielle pour des petits clusters.

	R = 21 μm (13 cellules)	R = 50 μm (87 cellules)	R = 100 μm (740 cellules)
Survie_{Volume} vs Survie_{Noyau}	53%	39%	24 %
Survie_{Volume} vs Survie_{Membrane}	9%	9%	1 %
Survie_{Membrane} vs Survie_{Noyau}	46%	30%	23 %

Tableau 7: DMS pour une même dose moyenne au sphéroïde entre une irradiation provenant du milieu extracellulaire et une irradiation provenant du noyau ou de la membrane et entre une irradiation provenant de la membrane et une irradiation provenant du noyau. Le calcul a été réalisé pour les trois tailles de clusters. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

2.4.3.2 Microdosimétrie vs Macrodosimétrie :

Pour chacun des clusters, les différences maximales de survie ont été calculées entre un calcul macrodosimétrique et un calcul microdosimétrique pour des irradiation surfacique et volumique (Tableau 8). On voit que les différences sont importantes pour des irradiations volumiques (17% pour un cluster de 21 μm). Ces différences diminuent lorsque le rayon du cluster augmente (11% pour un cluster de 100 μm). En revanche, les différences observées pour une irradiation surfacique sont constantes et proches de 7%.

	R = 21 μm (13 cellules)	R = 50 μm (87 cellules)	R = 100 μm (740 cellules)
Irradiation volumique	17%	15%	11%
Irradiation surfacique	7%	7%	7%

Tableau 8: Différence maximale de survie pour une irradiation volumique et une irradiation surfacique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

2.4.4 Variation des rayons cellulaires :

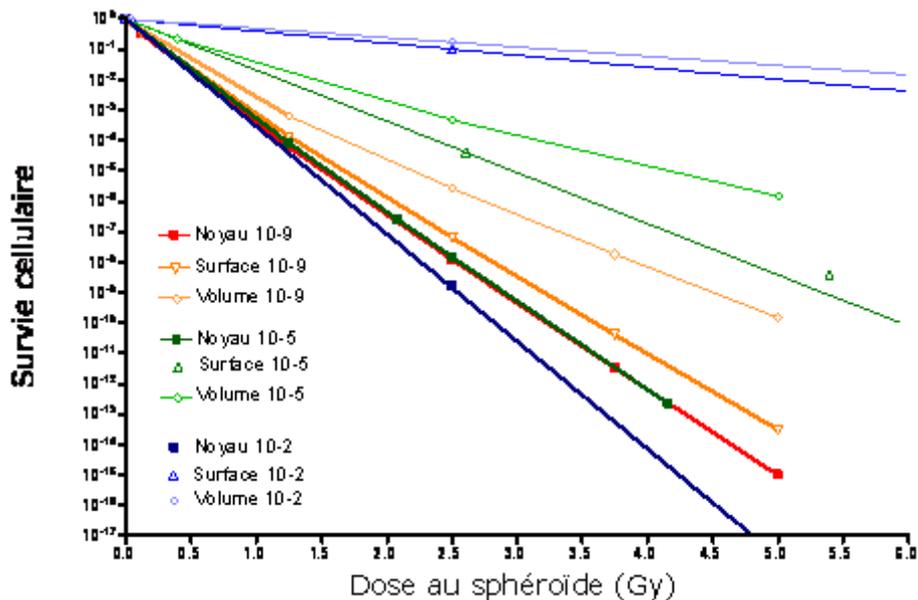


Figure 52: Survie cellulaire moyenne dans un cluster de rayon 100 μm en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

On remarque que pour des cellules à gros noyau (e.g. cellule 10-9) les différences observées entre les trois courbes (sources dans le noyau, à la surface ou dans le milieu) sont faibles (Figure 52). En revanche, pour une cellule à petit noyau (e.g. cellule 10-2), les écarts entre les trois courbes deviennent importants.

Charlton [10] a également montré que ces différences augmentent lorsque l'énergie des particules α émises diminue.

Les comparaisons entre un calcul macrodosimétrique et un calcul microdosimétrique de la survie montrent, comme pour les cellules isolées, que les écarts sont d'autant plus importants que le noyau des cellules est petit (Tableau 9).

	Cellules 10 μm - 9 μm	Cellules 10 μm - 5 μm	Cellules 10 μm - 2 μm
Irradiation volumique	2,1%	11%	31%
Irradiation surfacique	0,6%	7%	25%

Tableau 9: Différence maximale de survie pour une irradiation volumique et une irradiation surfacique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

2.4.5 Influence de z_0 :

2.4.5.1 Dosimétrie multi-cellulaire :

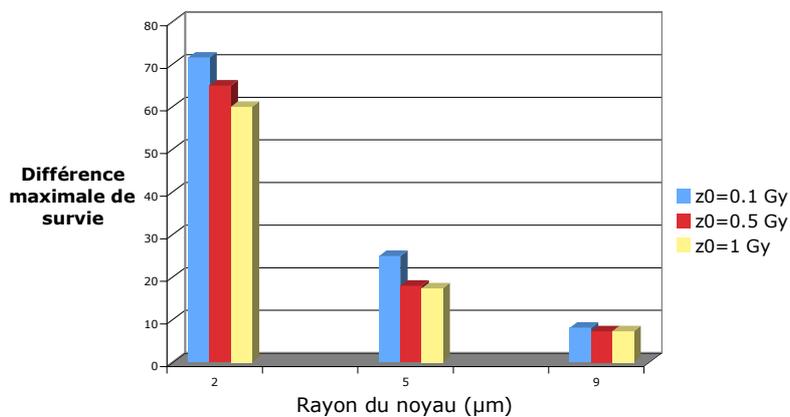


Figure 53: Différence maximale de survie entre une irradiation volumique et une irradiation provenant du noyau pour trois tailles de noyaux de cellules. Le calcul a été effectué dans un cluster de rayon 100 μm pour trois radiosensibilités. Le radioélément simulé est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

La figure 53 montre que la radiosensibilité n'a que peu d'influence sur l'intérêt d'effectuer une dosimétrie multi-cellulaire. Celle-ci est recommandée quelle que soit la radiosensibilité pour des cellules dont le rayon est inférieur à 9 μm .

2.4.5.2 Microdosimétrie vs Macrodosimétrie :

Les différences maximales de survie entre les courbes de survie calculées par une méthode macrodosimétrique et par une méthode microdosimétrique ont été évaluées lorsque la radiosensibilité et la taille du noyau des cellules varient. Le calcul a été effectué pour deux types d'irradiation : irradiation surfacique, irradiation volumique.

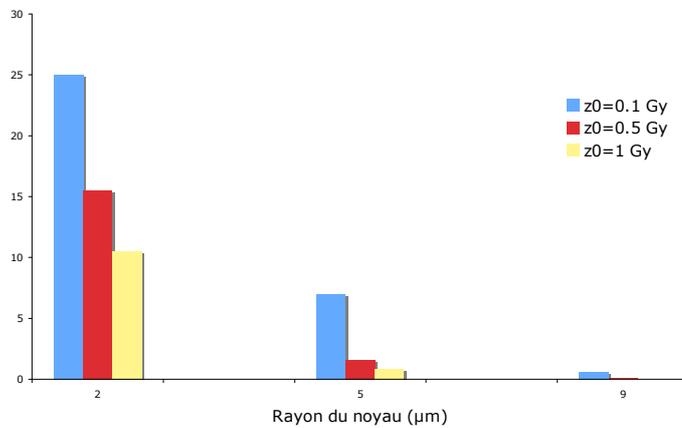


Figure 54: Différence maximale de survie pour une irradiation surfacique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique pour trois radiosensibilités et trois tailles de noyaux de cellules. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

Pour une cellule qui possède un rayon de 2 μm le calcul microdosimétrique est recommandé quelle que soit la radiosensibilité : la différence maximale de survie vaut en effet 10 % pour $z_0=1$ Gy (Figure 54). Les différences sont plus faibles pour une taille de noyau de 5 μm . Elles ne dépassent 5% que pour une cellule très radiosensible ($z_0=0,1$ Gy). Pour une cellule dont le rayon du noyau vaut 9 μm , la microdosimétrie n'apporte aucune précision supplémentaire dans le calcul de la survie par rapport à la macrodosimétrie.

Les mêmes observations peuvent être faites pour une irradiation volumique (Figure 55).

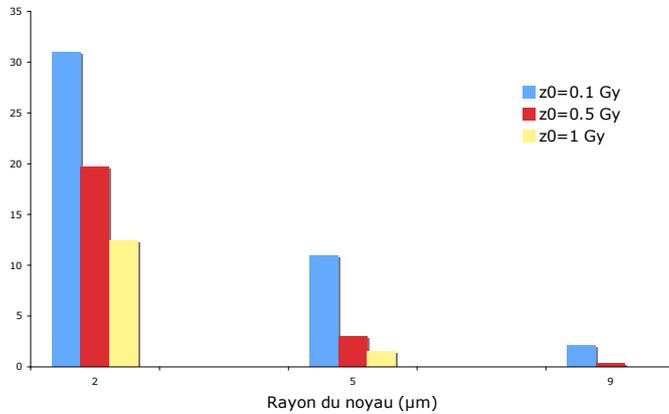


Figure 55: Différence maximale de survie pour une irradiation volumique entre un calcul de survie effectué selon une méthode microdosimétrique et un calcul de la survie effectué selon une méthode macrodosimétrique pour trois radiosensibilités et trois tailles de noyaux de cellules. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi .

2.4.6 Impact d'une distribution des rayons :

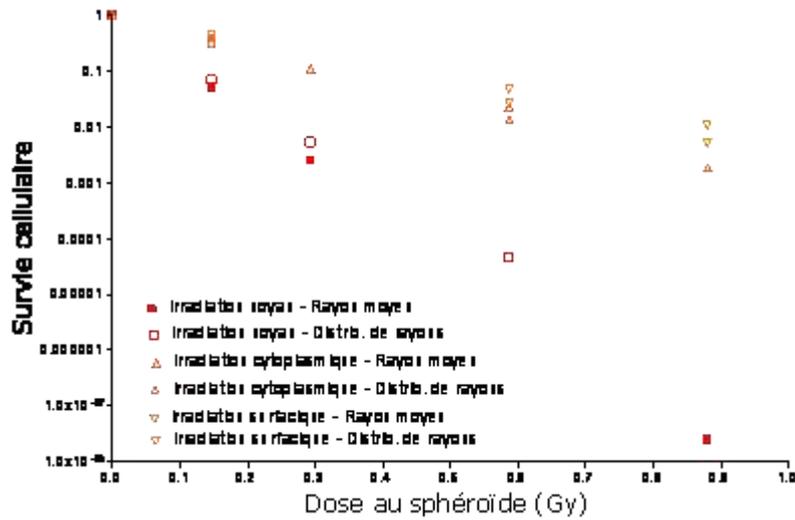


Figure 56: Survie cellulaire en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Le calcul a été réalisé pour un cluster de rayon de 50 µm composé de cellules possédant toutes les mêmes rayons cellulaires (signes pleins) et des cellules dont les rayons cellulaires sont distribués selon une gaussienne tronquée (signes vides). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

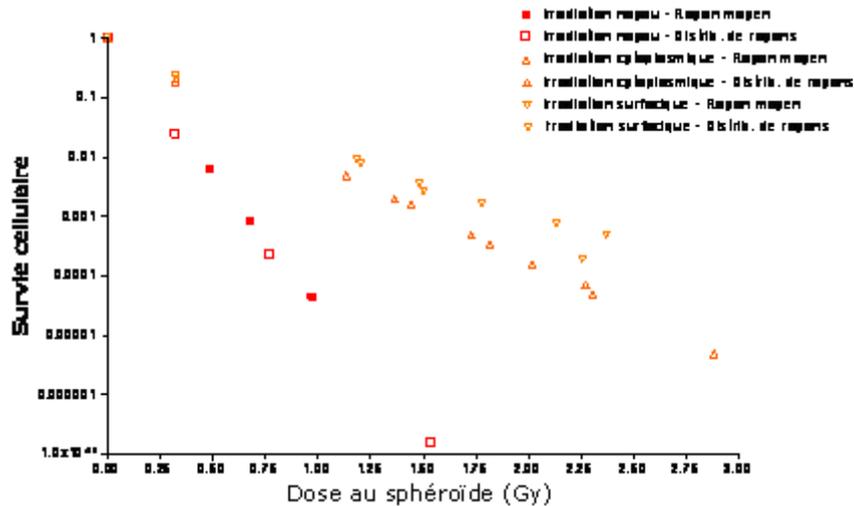


Figure 57: Survie cellulaire en fonction de la dose au sphéroïde pour différentes localisations des sources. Le calcul a été réalisé pour un cluster de rayon de 100 μm composé de cellules possédant toutes les mêmes rayons cellulaires (signes pleins) et des cellules dont les rayons cellulaires sont distribués selon une gaussienne tronquée (signes vides). Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

Les figures 56 et 57 montrent que l'impact de la prise en compte d'une distribution des rayons cellulaires à l'intérieur de la population cellulaire est très faible (différences de survie inférieures à 5% pour des doses au sphéroïde identiques). On peut donc considérer des rayons cellulaire et nucléaire moyens lorsque l'on évalue la survie cellulaire à l'intérieur d'un cluster de cellules.

2.4.7 Impact d'une distribution d'activités :

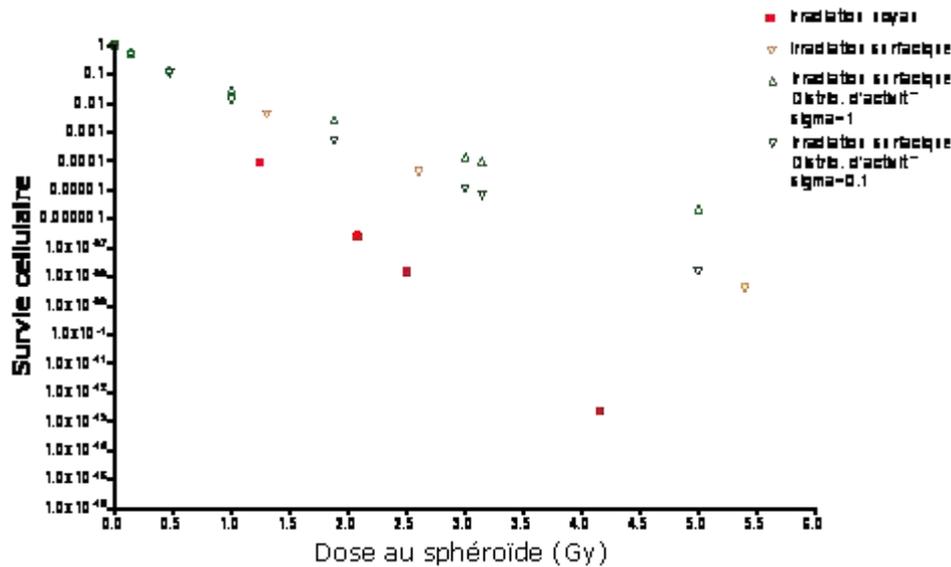


Figure 58: Survie cellulaire en fonction de la dose au sphéroïde pour des sources de ^{213}Bi localisées dans le noyau ou à la surface des cellules. Les deux courbes supérieures représentent les cas où l'activité est distribuée de façon log-normale ($\sigma=0,1$ et $\sigma=1$) à la surface des cellules. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

La figure 58 montre l'influence de la prise en compte d'une distribution d'activité à la surface des cellules. Comme pour une cellule isolée, la survie calculée est plus élevée si l'on prend en compte cette distribution. Les écarts sont toutefois très faibles, comme le montre le tableau 10 (environ 4% lorsque la paramètre de forme, σ , de la distribution log-normale est égal à 1 et inférieur à 1% lorsque σ vaut 0,1).

	Différence maximale
$\text{Survie}_{\text{Membrane}} - \text{distrib. d'activité} / \text{Survie}_{\text{Membrane-activité moyenne}} (\sigma=0,1)$	<1%
$\text{Survie}_{\text{Membrane}} - \text{distrib. d'activité} / \text{Survie}_{\text{Membrane-activité moyenne}} (\sigma=1,0)$	4%

Tableau 10: DMS lorsque le nombre de désintégrations (^{213}Bi) en surface des cellule d'un cluster de rayon $100 \mu\text{m}$ est constant et lorsque ce nombre est distribué selon une distribution log-normale. La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1$ Gy.

Cette influence très faible de la distribution d'activité fixée par les cellules sur la survie dans le cadre des clusters de cellules peut être expliqué par le fort feu croisé qui tend à gommer les non-uniformités.

2.4.8 Hétérogénéités spatiales de l'activité:

Pour une même concentration d'anticorps administrés, le premier effet de la pénétration partielle des anticorps sera d'entraîner une diminution de la dose délivrée aux cellules.

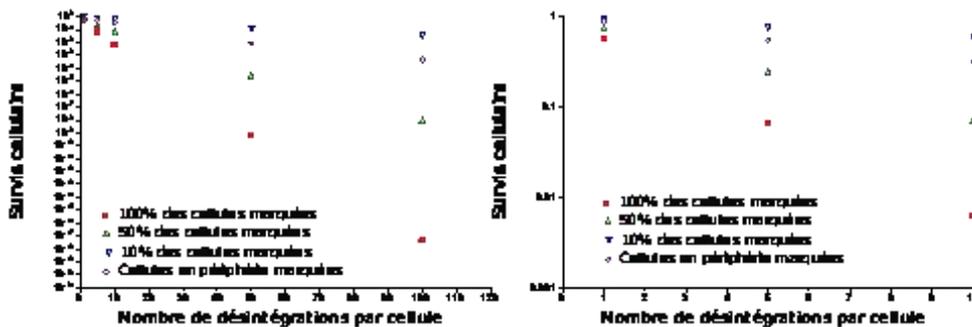


Figure 59: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster de 100 μm en fonction du nombre de désintégrations par cellule lorsque 100%, 50%, 10% des cellules ou seules les cellules situées en périphérie des clusters sont marquées. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

La figure 59 représente la survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster de 100 μm en fonction du nombre de désintégrations par cellule lorsque 100%, 50%, 10% des cellules ou seules les cellules situées en périphérie des clusters sont marquées.

Les différences de survie sont très importantes. Pour 5 désintégrations par cellule, la survie moyenne sera comprise entre 75% (10% des cellules marquées) et 7% (100% des cellules marquées).

Lorsque le nombre de cellules marquées va varier, la dose au sphéroïde sera également modifiée. Nous avons donc étudié, dans un second temps, la survie cellulaire en fonction de la dose au sphéroïde. La question sous-tendue par cette étude est : Peut on prédire la survie globale des cellules à l'intérieur du sphéroïde seulement à partir de la dose au sphéroïde ?

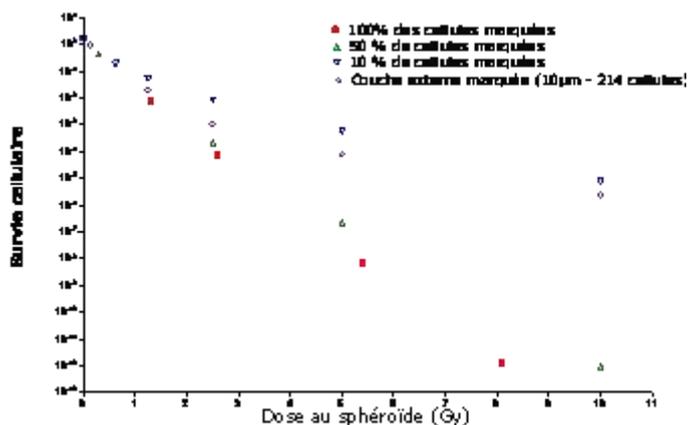


Figure 60: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster de 100 μm en fonction de la dose moyenne au sphéroïde lorsque 100%, 50%, 10% des cellules ou seules les cellules situées en périphérie des clusters sont marquées. Le radioélément considéré est le ^{213}Bi . La radiosensibilité de la cellule a été fixée à $z_0 = 0,1 \text{ Gy}$.

La figure 60 montre que pour une même dose au sphéroïde, et donc pour un même nombre de désintégrations dans le cluster, les courbes de survie cellulaires seront très variables. La différence maximale sera observée pour les courbes correspond à 100% et à 10% des cellules marquées : elle est estimée à 7%.

Pour évaluer l'impact d'une distribution non-uniforme de l'activité, il conviendra donc d'effectuer une dosimétrie multi-cellulaire.

Cette conclusion basée sur une étude théorique a été mise en évidence expérimentalement par Neti [13]. Lors de cette étude, des cellules marquées et non marquées au ^{210}Po ont été mélangées selon différentes proportions (100%, 10%, 1% de cellules marquées) et assemblées sous la forme de sphéroïdes. Après 72 heures d'irradiation, la survie cellulaire a été mesurée. La figure 61 montre les résultats obtenus.

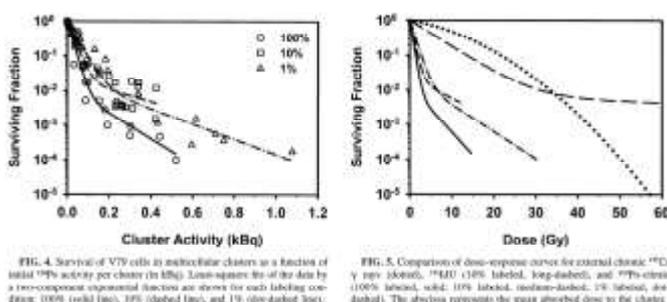


Figure 61: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster contenant 1 million de cellules en fonction de l'activité fixée dans le cluster lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marqués (gauche). Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster contenant 1 million de cellules en fonction de la dose au sphéroïde lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marqués (droite).



Figure 62: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster contenant 1 million de cellules en fonction de la self dose et de la cross dose reçues par les cellules dans le cluster lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marqués.

Des calculs microdosimétriques réalisés par Neti n'ont pas permis d'expliquer la forme de ces courbes. Pour son analyse dosimétrique, Neti a divisé les cellules en 2 groupes:

- cellules marquées,
- cellules non-marquées.

La dose reçue par les cellules non marquées a été calculée en prenant la dose moyenne reçue par le cluster. Pour déterminer la dose reçue par les cellules marquées, une dose auto-absorbée correspondant au nombre de désintégrations par cellule a été ajoutée à cette première dose.

Les courbes de survie représentée en fonction de la cross dose ou de la self dose sont alors exponentielles (Figure 62). Cette modélisation ne permet donc pas d'expliquer la forme des courbes.

En réalité, les cellules, suivant les distances qui les séparent des cellules marquées, vont recevoir des doses très variables. Lorsque la dose va augmenter, les cellules très proches vont être tuées mais celles situées plus loin auront tendance à ne pas être affectées par cette augmentation de la dose globale.

Toutefois, cette explication n'est pas suffisante pour le cas où 100% des cellules sont marquées. Dans ce cas, les cellules situées en périphérie recevront une dose très inférieure aux cellules situées au centre du cluster. Cette différence peut induire une certaine résistance des cellules périphériques lorsque la dose augmente et expliquer la forme de la courbe.

Une dosimétrie multi-cellulaire plus précise doit être réalisée pour modéliser ce phénomène. Nous avons repris cette étude. Les spectres microdosimétriques de chaque cellule ont été calculés. La survie globale des cellules du cluster a été calculée pour différentes radiosensibilités.

Les courbes de survie calculées par notre modèle sont représentées dans la figure 63. Elles sont très proches des courbes expérimentales observées.

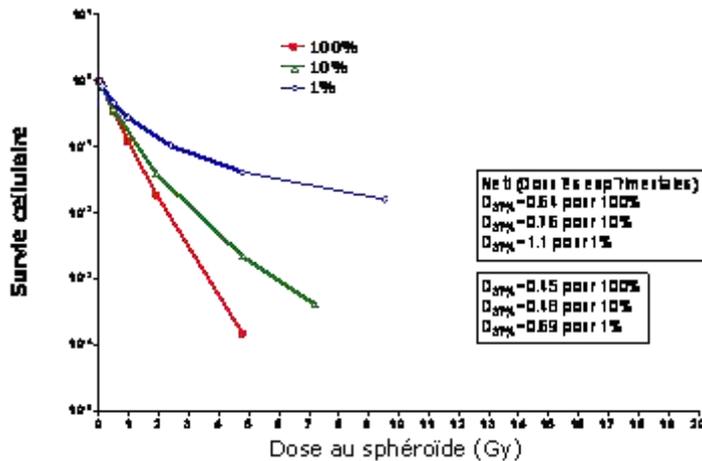


Figure 63: Survie moyenne des cellules à l'intérieur d'un cluster de rayon $100 \mu\text{m}$ de cellules en fonction de la dose au sphéroïde lorsque 100%, 10%, 1% des cellules sont marquées. La radiosensibilité des cellules est fixée à $z_0=0,6$ Gy. Le radioélément considéré est le ^{210}Po .

Les valeurs de $D_{37\%}$ (i.e. dose délivrée au sphéroïde qui entraîne une survie de 37%) ont été calculées. Elles sont différentes des valeurs observées dans l'étude de Neti, quelle que soit la valeur de radiosensibilité que nous choisissons. Les sphéroïdes de Neti sont composés d'1 million de cellules. Nous avons simulé, pour des raisons de temps de calculs, des sphéroïdes plus petits de 5917 cellules.

Nous pensons que la taille du cluster va influencer la valeur du paramètre $D_{37\%}$. Nous avons comparé les valeurs de $D_{37\%}$ obtenues si la taille des clusters varie. Lorsque la taille des clusters augmente, la valeur de $D_{37\%}$ augmente (i.e. $D_{37\%}=0,3$ Gy pour un cluster de $50 \mu\text{m}$ lorsque 100% des cellules sont marquées et $D_{37\%}=0,45$ Gy pour un cluster de $100 \mu\text{m}$ lorsque 100% des cellules sont marquées).

La dosimétrie multi-cellulaire s'avère encore indispensable pour modéliser l'impact d'une distribution non-uniforme de l'activité. Cette étude constitue une comparaison intéressante entre les résultats de survie fournis par notre modèle et des résultats expérimentaux. Les courbes de survie sont relativement bien prédites par notre modèle. Il s'agit d'une validation qualitative de notre modélisation.

2.4.9 Conclusion:

Cette étude nous a permis d'approcher les réponses à deux questions distinctes :

- Doit-on effectuer une dosimétrie multi-cellulaire pour calculer la survie de cellules à l'intérieur d'un cluster ou la dose moyenne délivrée au sphéroïde suffit-elle ?
- Dans le cadre d'une dosimétrie multi-cellulaire, doit-on effectuer des calculs macrodosimétriques ou des calculs microdosimétriques pour évaluer la survie des cellules ?

L'analyse que nous avons réalisée n'est pas exhaustive. De nombreux paramètres vont influencer cette survie : la taille du cluster, la compacité du cluster, la taille des cellules, la radiosensibilité des cellules, la location des sources, le radioélément utilisé, le degré d'uniformité de la distribution d'activité au sein du cluster. Dans notre étude, le paramètre de la compacité n'a pas été étudié. Nous pensons qu'*in vivo* les cellules qui n'ont pas une paroi rigide auront tendance à former des amas de compacité élevée. Nous avons donc effectué nos calculs en considérant à chaque fois une compacité maximale (pour des cellules sphériques) soit 0,74.

Les premiers résultats ont montré que les courbes de survie étaient très variables suivant la localisation des sources et la taille des clusters.

Pour des clusters de faible taille, les courbes de survie représentées en fonction de la dose au sphéroïde sont exponentielles. Lorsque la taille des clusters augmente, pour des doses au sphéroïde élevées (>5 Gy) la survie ne diminue plus de façon exponentielle mais a tendance à diminuer beaucoup moins vite. Cela peut être expliqué par la plus grande homogénéité des doses reçues par les cellules dans des sphéroïdes de petites tailles.

Les variations des courbes de survie suivant les localisations indiquent qu'il est important de réaliser une analyse multi-cellulaire ; la dose au sphéroïde ne suffit pas pour évaluer la survie. Les écarts entre les courbes sont moins importants lorsque les cellules possèdent un gros noyau. Toutefois, quelle que soit la sensibilité de la cellule et quelle que soit la taille de son noyau, cette étude montre qu'il est indispensable d'effectuer une dosimétrie multi-cellulaire pour prédire de façon satisfaisante la survie cellulaire.

En ce qui concerne l'intérêt de la microdosimétrie, la conclusion est moins générale. Il semble que l'intérêt de la microdosimétrie dépende de la taille du cluster. Pour des petits clusters ($R=21 \mu\text{m}$), son impact par rapport à la macrodosimétrie est important. Pour prédire la survie dans un cluster de plus grande taille ($R>50 \mu\text{m}$), la microdosimétrie offre un degré de précision supplémentaire par rapport à la macrodosimétrie lorsque le noyau des cellules est inférieur à $6 \mu\text{m}$.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés aux différentes non-uniformités qui pouvaient modifier le résultat des calculs. Contrairement au cas de la cellule isolée, la non-uniformité des rayons cellulaires au sein d'une population n'a que très peu d'influence sur les courbes de survie.

Si l'on suppose une pénétration complète de l'anticorps dans le cluster, une distribution log-normale de l'activité fixée par les cellules aura également peu d'impact sur les courbes de survie même pour un paramètre de forme élevé ($\sigma=1$).

Toutefois, il est généralement observé que la pénétration des anticorps dans les sphéroïdes *in vitro* ou dans les micrométastases *in vivo* n'est pas complète. Nous avons cherché à quantifier l'impact de cette pénétration partielle sur la survie cellulaire. Dans le cas d'un cluster de rayon $100 \mu\text{m}$, les courbes de survie vont être très variables suivant le pourcentage de cellules marquées. Pour 5 désintégrations par cellule, la survie moyenne sera comprise entre 75% (10% des cellules marquées) et 7% (100% des cellules marquées).

Une étude expérimentale réalisée par Neti [13] a montré l'impact d'une distribution non-uniforme de l'activité au sein d'un sphéroïde. Notre modélisation multi-cellulaire semble mieux décrire les résultats que la méthode utilisée dans l'étude. Ces résultats expérimentaux tendent à valider l'approche que nous utilisons pour le calcul de la survie.

2.5 Conclusion :

Au cours de ce chapitre, nous avons cherché à détailler les situations dans lesquelles l'apport de la microdosimétrie par rapport à la macrodosimétrie est significatif. Pour répondre à cette question, il faut d'abord préciser dans quel but on souhaite utiliser la dosimétrie. Le but de la dosimétrie est, nous le pensons, de relier la survie d'une structure biologique à la quantité de rayonnements reçus par cette structure. Dans le cas de la macrodosimétrie, à l'échelle cellulaire, la survie sera reliée à la dose moyenne absorbée par les cellules. Dans le cadre de la microdosimétrie, la survie peut être reliée à la distribution d'énergie spécifique reçue par les cellules.

Il convenait donc de mesurer, dans différentes conditions expérimentales d'irradiation, la survie d'une population cellulaire et d'essayer de relier cette survie soit à la dose moyenne absorbée, soit à la distribution d'énergie spécifique. Pour des raisons de disponibilité de sources émettrices α , il a été impossible de réaliser ces expériences. Pour être plus précis, nous avons pu, au cours de ce travail de thèse, analyser deux séries d'expériences réalisées *in vitro* au sein du laboratoire U892 (les résultats sont détaillés dans le chapitre V) mais celles-ci avaient été réalisées avant le début de la thèse et le protocole n'avait pas été pensé pour répondre à la question posée dans ce chapitre.

L'étude que nous présentons ici est donc théorique, à l'exception de l'analyse d'une expérience provenant de la littérature. Il est donc difficile d'estimer si les résultats ou différences que nous qualifions de significatifs sont réellement observables lors d'études pratiques.

La première partie de cette étude a consisté à appliquer le critère de Kellerer aux situations expérimentales auxquelles nous sommes confrontés lors d'expérience d'irradiations cellulaires par des particules α . Le critère de Kellerer est basé sur la forme de la distribution multi-coups d'énergie spécifique dans la cible considérée. Il permet de délimiter le domaine d'intérêt de la microdosimétrie, c'est-à-dire définir jusqu'à quelle taille de cible et quelle dose absorbée la microdosimétrie est recommandée. Il dépend également de l'énergie des particules α considérées mais l'impact de ce paramètre, dans l'intervalle des énergies des particules α utilisées en RIT, est peu significatif.

La distribution multi-coups d'énergie spécifique dans une cible tend vers une gaussienne lorsque la dose absorbée augmente. C'est une conséquence du théorème de la limite centrale qui établit que la distribution résultant d'une convolution répétée n fois d'une première distribution tend vers une gaussienne dont l'écart type diminue lorsque n augmente. Lorsque l'écart type de cette distribution sera réduit, on pourra alors considérer que chaque cellule d'une population cellulaire recevra la même dose : la dose moyenne.

Nous avons montré que cette dose absorbée pour laquelle l'emploi de la microdosimétrie n'a plus d'intérêt est de 15 Gy lorsque le noyau de la cellule, que l'on considère ici comme cible, a un rayon de 2 μm . Pour un rayon de 9 μm , la dose absorbée correspondante est relativement faible : 2,8 Gy.

L'écart type de la distribution d'énergie spécifique dans le noyau d'une cellule a, de façon évidente un impact, sur la survie cellulaire. Toutefois, il n'aura pas le même impact par exemple sur des cellules très radiorésistantes et sur des cellules radiosensibles. Dans la seconde partie, nous avons donc cherché à quantifier cet impact en faisant varier différents paramètres géométriques et cellulaires. Nous avons comparé les courbes de survie calculées à partir de la dose moyenne absorbée et les courbes de survie calculées à partir des spectres microdosimétriques. Nous avons également analysé l'impact de certaines non-uniformités à l'intérieur d'une population cellulaire (taille, activité). De façon générale, nous avons considéré qu'une différence de 5% pour la survie était peu significative, en raison de la variabilité observée lors de mesures expérimentales.

Pour des cellule isolées, l'emploi de la microdosimétrie est indispensable lorsque le rayon du noyau cellulaire est inférieur à 6 μm et que la radiosensibilité microdosimétrique, z_0 , est inférieure à 0,6 Gy. Pour une très forte radiosensibilité, $z_0=0,1$ Gy, la microdosimétrie est recommandée quelle que soit la taille du noyau cellulaire. Si une part de l'irradiation provient du surnageant et une autre part de l'activité fixée à la surface des cellules, ce qui est une illustration de ce qui se passe souvent en RIT- α , l'emploi de la microdosimétrie n'est pas nécessaire pour toutes les situations.

Pour les clusters de cellules dont le rayon est inférieur ou égal à 100 μm , il apparaît indispensable d'effectuer une dosimétrie multi-cellulaire, c'est-à-dire d'évaluer les dépôts d'énergie dans chacune des cellules constituant le sphéroïde. La dose au sphéroïde ne permet, en effet, pas de décrire précisément la forme des courbes de survie. L'emploi de la microdosimétrie est recommandé pour des cellules dont noyau a un rayon inférieur à 6 μm .

Pour ces deux géométries cellulaires (cellule isolée et cluster de cellules), le domaine d'emploi de la microdosimétrie défini par l'intérêt de cette méthode pour l'étude de la survie cellulaire après une irradiation semble plus restreint que le domaine défini par le critère de Kellerer.

La seconde partie de ce chapitre a montré que les courbes de survie pouvaient être modifiées parfois de façon importante par une distribution non-uniforme de certains paramètres.

Pour des cellules isolée, la prise en compte d'une distribution de rayons cellulaires au sein d'une population cellulaire rend la relation dose/survie non linéaire et diminue la toxicité apparente d'une irradiation. Ce résultat est modulé par la part de l'irradiation provenant du milieu. Si l'on considère que chaque cellule ne fixe pas la même quantité d'activité mais que ce paramètre suit une distribution log-normale, la relation dose/survie devient à nouveau non linéaire et l'impact sur la valeur de survie calculée peut être très élevé (jusqu'à 20% de différence).

Pour des clusters de cellules, les deux paramètres cités ont moins d'influence sur les courbes de survie. En revanche, on sait que la pénétration des anticorps à l'intérieur d'un sphéroïde ne sera pas homogène. Pour un même nombre de désintégrations par cellule, on peut comparer les cas où l'ensemble des cellules sont marquées et où seules les cellules situées en périphérie du cluster sont marquées. Ces deux exemples conduiront à des différences de survie de plus de 30%. La distribution hétérogène de l'activité à l'intérieur d'un cluster de cellules doit donc être caractérisée et prise en compte dans le calcul dosimétrique afin de mieux comprendre les effets de l'irradiation. La dernière étude réalisée a consisté à comparer les résultats fournis par notre modèle de calcul et les résultats d'expériences réalisés par Neti. Ces expériences souhaitaient montrer l'impact sur la survie d'une distribution non-homogène de l'activité à l'intérieur d'un sphéroïde. La forme des courbes de survie obtenues expérimentalement a été retrouvée par notre calcul.

Bibliographie

1. A. I. Kassis and S. J. Adelstein, Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**, 4S-12S (2005).
2. D.R. Fisher, The microdosimetry of monoclonal antibodies labeled with alpha emitters. Proceedings of the fourth international radiopharmaceutical dosimetry symposium, Oak Ridge, TN, eds. Schlafke-Stelson AT, Watson EE, Oak Ridge Assoc. Univ., TN, CONF-851113, 1767-1773 (1986).
3. A. M. Kellerer and D. Chmelevsky, Concepts of microdosimetry. III. Mean values of the microdosimetric distributions. *Radiat Environ Biophys* **12**, 321-335 (1975).
4. ICRU Report 36, Microdosimetry. Bethesda, MD, USA (1983).
5. J. L. Humm, A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **13**, 1767-1773 (1987).
6. J. C. Roeske and T. G. Stinchcomb, Dosimetric framework for therapeutic alpha-particle emitters. *J Nucl Med* **38**, 1923-1929 (1997).
7. Y. Kvinnsland, T. Stokke and E. Aurlien, Radioimmunotherapy with alpha-particle emitters: microdosimetry of cells with a heterogeneous antigen expression and with various diameters of cells and nuclei. *Radiat Res* **155**, 288-296 (2001).
8. P. V. Neti and R. W. Howell, Log normal distribution of cellular uptake of radioactivity: implications for biologic responses to radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* **47**, 1049-1058 (2006).
9. J. L. Humm, J. C. Roeske, D. R. Fisher and G. T. Chen, Microdosimetric concepts in radioimmunotherapy. *Med Phys* **20**, 535-541 (1993).
10. D. E. Charlton, Radiation effects in spheroids of cells exposed to alpha emitters. *Int J Radiat Biol* **76**, 1555-1564 (2000).
11. A. M. Ballangrud, W. H. Yang, S. Palm, R. Enmon, P. E. Borchardt, V. A. Pellegrini, M. R. McDevitt, D. A. Scheinberg and G. Sgouros, Alpha-particle emitting atomic generator (Actinium-225)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res* **10**, 4489-4497 (2004).
12. M. Essand, S. Nilsson and J. Carlsson, Growth of prostatic cancer cells, DU 145, as multicellular spheroids and effects of estramustine. *Anticancer Res* **13**, 1261-1268 (1993).
13. P. V. Neti and R. W. Howell, Biological response to nonuniform distributions of (210)Po in multicellular clusters. *Radiat Res* **168**, 332-340 (2007).

Chapitre V : Applications biologiques

L'équipe 13 de l'U892 est une équipe relativement unique dans sa structure puisqu'elle regroupe l'ensemble des compétences nécessaires à la mise au point, l'étude, l'optimisation et l'application lors d'essais cliniques de nouveaux radioimmunoconjugués dans le cadre de la RIT. Dans ce contexte, la RIT- α est très étudiée en pré-clinique par le groupe de biologistes dirigé par Michel Chérel et François Davodeau. Au cours de ma thèse, deux groupes d'expériences ont été analysés grâce au modèle analytique développé. Ces modèles biologiques originaux ont constitué une application idéale pour notre modèle et en retour, celui-ci a apporté quelques informations supplémentaires pour la compréhension des mécanismes de contrôle tumoral par des anticorps radiomarqués. Le premier type d'expériences a été mené par Michel Chérel et Stéphane Supiot et a porté sur l'irradiation *in vitro* par des anticorps radiomarqués au ^{213}Bi de trois lignées cellulaires du Myélome Multiple (LP1, RPMI, U266). Les autres expériences étudiées ont été réalisées par François Davodeau et Karine Bernardeau et ont consisté à cibler un complexe CMH/peptide à l'aide d'anticorps radiomarqués au ^{213}Bi sur deux lignées cellulaires (T2, Ada).

À la suite de ces expériences, plusieurs questions relatives à l'optimisation de la RIT- α et à ses limites sont apparues. Un modèle mathématique relativement simple de l'administration de traitements de RIT- α , basé sur des travaux initiaux de Sgouros [1] a été mis au point afin de caractériser ces limitations et de donner quelques voies d'optimisations possibles pour cette modalité de traitement.

1.1 Cellules du myélome multiple :

1.1.1 Introduction

Le myélome multiple représente 10% des maladies sanguines malignes. Les formes de ces cancers sont multiples et il existe actuellement très peu de traitements appropriés [2]. La RIT est une thérapie prometteuse dans ce contexte. Dans ce cancer, les cellules tumorales sont, en effet isolées dans la moelle osseuse ou regroupées sous la forme de petits clusters. Le parcours dans les tissus des particules émises sera donc un paramètre essentiel du succès de la RIT. Les particules α semblent particulièrement adaptées en raison de leur court parcours et de leur toxicité élevée qui va permettre d'éliminer des cellules tumorales isolées sans nécessité de feu croisé. Ces expériences réalisées entre 2002 et 2004 avaient pour objectif principal de comparer l'efficacité de la RIT- β et de la RIT- α pour des modèles *in vitro* de myélome multiple. L'efficacité relative biologique de ces deux types d'irradiation pour les trois lignées cellulaires étudiées (LP1, RPMI 8226, U266) a ensuite été évaluée par rapport à une irradiation externe au ^{60}Co .

L'analyse dosimétrique a rendu possible ces comparaisons. La dose est, en effet, un index qui permet de prendre en compte les tailles différentes des cellules, les distributions particulières des anticorps radiomarqués à l' ^{131}I et au ^{213}Bi à la surface des cellules et surtout les dépôts d'énergie très différents des particules β et α dans les cellules.

1.1.2 Matériel et Méthodes:

1.1.2.1 Lignées Cellulaires :

Le myélome multiple regroupe des entités cliniques et biologiques très différentes qui répondent de manière hétérogène aux traitements habituels. Pour cette étude, trois modèles cellulaires de myélome multiple humain aux caractéristiques différentes ont été retenus :

- LP1 (Rcel = $9,5 \mu\text{m} \pm 2,3$ et Rnoy = $6,95 \mu\text{m} \pm 1,6$),
- RPMI 8226 (Rcel = $7,7 \mu\text{m} \pm 1,75$ et Rnoy = $5,75 \mu\text{m} \pm 1,05$),
- U266 (Rcel = $8,2 \mu\text{m} \pm 1,3$ et Rnoy = $5,1 \mu\text{m} \pm 0,9$).

Entre parenthèses, figurent les valeurs des rayons cellulaires mesurées lors du protocole expérimental. Ces mesures ont été effectuées sur un large échantillon de cellules.

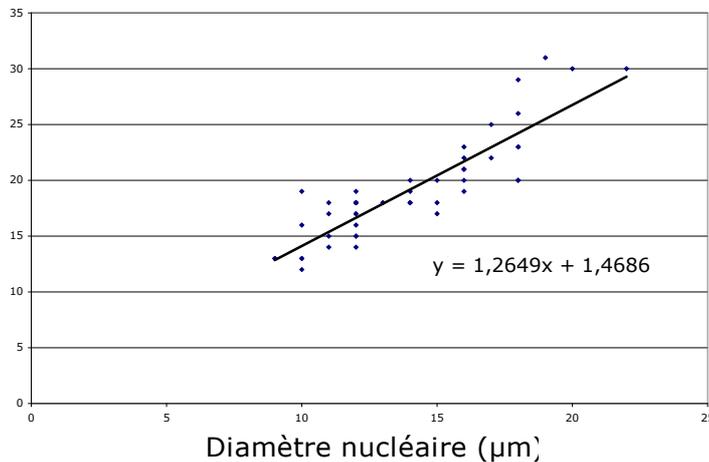


Figure 64: Diamètre cellulaire des cellules en fonction de leur diamètre nucléaire (Lignée LP1).

Deux caractéristiques ont été observées lors de l'analyse de ces mesures :

- au sein d'une population cellulaire, le rapport nucléo cytoplasmique est relativement constant (Figure 64),
- les rayons cellulaires sont distribués selon une gaussienne dont l'espérance et l'écart type ont été précisés entre parenthèses.

Les cellules étudiées (U266, RPMI 8226, LP1) sont des cellules non-adhérentes, ce qui signifie qu'elles n'ont pas besoin d'un support solide pour proliférer. Cette caractéristique est importante pour l'étude dosimétrique car les cellules non-adhérentes sont des cellules relativement sphériques ce qui est idéal pour l'utilisation de notre modèle.

1.1.2.2 Fixation de l'anticorps :

L'anticorps utilisé au cours de ces expériences est l'anticorps B-B4 (Diaclone Research, Besançon, France), spécifique du syndécan 1 ou CD138, exprimé sur les cellules tumorales de la totalité des patients atteints de myélome multiple mais également sur certaines cellules du cancer du sein [3].

La fixation de cet anticorps sur les trois lignées cellulaires a été évaluée selon une méthode Scatchard.

Sa constante de dissociation est la suivante : $K_d = 1,5 \text{ nM} \pm 0,3$ et le nombre de sites est proche de 300 000 pour les 3 lignées cellulaires (Figure 65 et Tableau 11).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 65: Courbes de Scatchard: LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) et U266 (rond).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (Uncompressed)
sont requis pour visionner cette image.

Tableau 11: Nombre de sites de fixation de l'anticorps B-B4.

L'évaluation du nombre de sites antigéniques présents à la surface des cellules n'est pas aisée et il existe une variation intercellulaire de ce nombre de sites. Cette incertitude va entraîner une incertitude sur le nombre d'anticorps fixés à la cellule et donc sur la dose délivrée.

Pour le calcul dosimétrique, on va supposer une fixation immédiate de l'anticorps à la cellule. Cette hypothèse est justifiée dans le cadre d'un protocole *in vitro*.

Le taux d'internalisation des anticorps a été évalué pour les trois lignées cellulaires et il ne dépasse pas 5%.

1.1.2.3 Radiomarquage de l'anticorps :

1.1.2.3.1 Marquage à l'¹³¹I :

Les anticorps ont été marqués à l'iode 131 (Schering AG, Gif-sur-Yvette, France) par la méthode de l'iodogène [4].

L'activité spécifique de l'anticorps pour ces expériences était fixe et égale à 400 MBq/mg (10,8 mCi/mg) ce qui représente un anticorps marqué sur 15.

1.1.2.3.2 Marquage au ²¹³Bi :

Afin de fixer l'atome de bismuth 213 à l'anticorps B-B4, l'utilisation d'un agent chélatant est nécessaire. Deux agents ont été utilisés, le Benzyl-DTPA et le CHX- α '-DTPA, plus stable.

Le bismuth 213 est un isotope de la famille des actinides généré par la désintégration nucléaire de l'actinium 225 dont la demi-vie est de l'ordre de 10 jours. L'actinium 225 est fourni par l'Institut des TransUranien (ITU, Karlsruhe, Allemagne) fixé à une résine d'AGMP-50. Le générateur peut être utilisé pendant environ deux semaines après réception en fonction de son chargement. La colonne de bismuth 213 est éluée avec 2 mL d'une solution contenant 0,1 M HCl et 0,1 M de NaI.

L'activité spécifique de l'anticorps pour ces expériences était fixe et égale à 148 MBq/mg (4 mCi/mg) ce qui représente un anticorps marqué sur 10 000.

1.1.2.4 Irradiations :

1.1.2.4.1 Irradiation externe au ⁶⁰Co

Les expérimentations d'irradiation gamma ont été réalisées, pour les trois lignées cellulaires, grâce à une source de cobalt 60 (Centre René Gauducheau, Nantes-St-Herblain) ayant un débit de dose de 1 Gy/min. Un puits de culture contenant 250000 cellules/ml a été placé sous la source et irradié pendant des temps variables selon la dose que l'on souhaitait délivrer.

1.1.2.4.2 Irradiation au ²¹³Bi et à l'¹³¹I

Les trois lignées cellulaires (250 000 cellules/ml) ont été irradiés pendant 24 heures après l'ajout des anticorps radiomarqués au ²¹³Bi. La cellule U266 a également été incubée en présence d'anticorps radiomarqués à l'¹³¹I pendant la même période de 24 heures. Des observations au microscope ont montré que les cellules, pendant cette période d'irradiation, se trouvaient en monocouche au fond du puits.

1.1.2.5 Mesure de la survie :

La survie des cellules irradiées a été mesurée par une méthode de Dilution Limite (les détails de cette méthode sont donnés en annexe).

1.1.2.6 Étude dosimétrique :

Le calcul de la dose délivrée aux cellules lors de l'irradiation au ^{60}Co a été réalisé par l'équipe de physique médicale du CLCC René Gauducheau à partir du temps d'irradiation.

Pour les expériences avec les anticorps radiomarqués au ^{213}Bi et à l' ^{131}I , la dosimétrie est plus complexe. Il existe trois sources d'irradiation pour chaque cellule : une irradiation volumique à partir des anticorps radiomarqués libres dans le surnageant, une irradiation surfacique à partir des anticorps radiomarqués fixés à la surface de la cellule et le feu croisé provenant des cellules voisines de la cellule cible. Pour chaque point expérimental correspondant à une concentration d'anticorps ajoutés et une activité spécifique bien déterminées, le nombre de désintégrations par unité de volume du milieu ainsi que le nombre d'anticorps radiomarqués accrochés à la surface de chaque cellule ont été calculés.

Ce dernier paramètre est évalué à partir de l'activité spécifique et à partir du Kd de l'anticorps et du nombre de sites antigéniques des cellules déterminé par la méthode Scatchard.

Pour la dosimétrie alpha, à partir de toutes ces données expérimentales, les spectres $f_1(z)$ et $f(z)$ correspondant aux distributions single-hit et multi-hit de l'énergie spécifique ont été déterminées avec notre modèle analytique. Ce calcul a été effectué en prenant en compte les distributions des rayons cellulaires mesurées. Du spectre $f(z)$, on a pu déduire la dose moyenne absorbée, le pourcentage de cellules épargnées, le nombre moyen de coups.

Pour la dosimétrie β , une méthode de calcul Monte-Carlo a été utilisée. En raison du parcours plus long des particules β dans l'eau, les volumes d'intérêt considéré dans la dosimétrie β sont plus grands et l'ensemble du puits de culture a dû être modélisé pour les calculs pour l' ^{131}I . Dans le cadre de ces expériences, trois localisations de sources doivent être considérées. Les cellules sont en effet irradiées par les anticorps radiomarqués fixés à leur surface, les anticorps fixés à la surface des cellules voisines de la cellule cible et les anticorps radiomarqués libres dans le surnageant. Trois facteurs S doivent donc être déterminés :

- S_{self} correspondant à l'auto-irradiation de la cellule cible
- S_{cross} correspondant à l'irradiation croisée de la cellule cible par les autres cellules de la monocouche,
- S_{vol} correspondant à l'irradiation provenant des anticorps marqués à l' ^{131}I libres dans le surnageant.

La figure 66 représente schématiquement la géométrie implémentée dans le logiciel Monte-Carlo MCNPX [5].

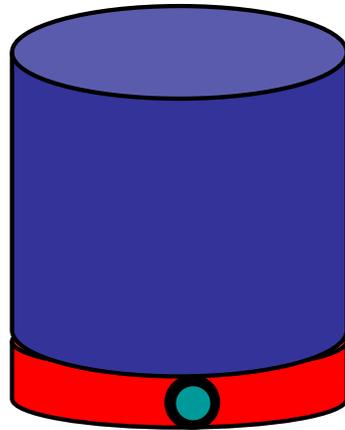


Figure 66: Géométrie simplifiée du puits de culture implémentée dans le fichier d'entrée MCNPX.

Le spectre bêta de l' ^{131}I publiés dans le rapport 38 de l'ICRP [6] et les émissions gamma de ce radionucléide ont été prises en compte dans le calcul dosimétrique.

La dose moyenne absorbée par le noyau de la cellule cible considérée a été calculée de la manière suivante :

$$D = N_{des} * S_{self} + N_{cell} * N_{des} * S_{cross} + N_{des,\mu\text{m}^{-3}} * V * S_{vol} \quad (5-1)$$

où N_{des} représente le nombre de désintégrations à la surface de chaque cellule pendant le temps de l'irradiation (ici 24 heures), N_{cell} représente le nombre de cellules dans la monocouche (200000 cellules dans cette expérience), $N_{des,\mu\text{m}^{-3}}$ est le nombre de désintégrations par unité de volume dans le surnageant et V est le volume du puits de culture représenté en bleu dans la figure 66.

Le nombre de désintégrations par cellule, N_{des} , sera calculé de la manière suivante :

$$N_{des} = 1,44 * a_0 * T_{1/2} * (1 - e^{-0,693 * T_{irr} / T_{1/2}}) \quad (5-2)$$

où a_0 est l'activité initiale à la surface de la cellule, $T_{1/2}$ est la période du radionucléide et T_{irr} est le temps pendant lequel dure l'irradiation.

Pour le calcul du facteur S_{cross} , 10 milliards de particules ont été simulées dans le code MCNPX afin d'obtenir une statistique suffisante (incertitude inférieure à 5%). Cette simulation a pris 9 jours en utilisant 10 ordinateurs. 20 milliards de particules ont été simulées pour calculer le facteur S_{vol} (18 jours de calcul avec 10 ordinateurs).

1.1.2.6.1 Incertitudes

L'incertitude portant sur la dose provient de plusieurs sources d'incertitudes inhérentes à la mesure :

- de l'activité spécifique,
- de la concentration d'anticorps ajoutée,
- du nombre de sites antigéniques à la surface des cellules,

- de l'affinité de l'anticorps B-B4.

Les incertitudes sur l'activité spécifique et sur la concentration d'anticorps ajoutée étaient *a priori* négligeables devant les autres. L'affinité de l'anticorps ainsi que le nombre de sites antigéniques à la surface des trois lignées cellulaires ont été déterminés grâce à un ajustement des courbes Scatchard. Un écart-type de la valeur de ces paramètres peut donc être déduit. En calculant la propagation de l'incertitude, un écart-type du nombre de désintégrations ayant lieu à la surface des cellules a pu être déduit. Les calculs dosimétriques ont été réalisés pour la valeur la plus faible et la valeur la plus forte de l'intervalle défini par l'écart type afin d'encadrer la valeur de la dose.

Mis en forme : Français
(France)

1.1.2.7 Calcul de l'EBR:

L'EBR (Efficacité Biologique Relative) est un facteur utilisé pour comparer l'efficacité biologique de doses absorbées de différents types de rayonnements ionisants. Plus spécifiquement, il s'agit du rapport, déterminé expérimentalement, de la dose absorbée du rayonnement d'intérêt sur la dose absorbée d'un rayonnement de référence qui conduit au même effet biologique dans un organisme ou dans un tissu. La détermination de l'EBR est importante dans le domaine de la radioprotection et des applications médicales.

Au cours de cette étude, nous avons cherché à évaluer l'impact de l'utilisation de la microdosimétrie dans le calcul de la valeur de l'EBR. Cet EBR a été évalué pour une survie de 37%. Nous avons calculé l'EBR en utilisant la valeur du D_0 obtenue en fittant les courbes de survie exprimées en fonction de la dose moyenne absorbée, mais également en utilisant la valeur du z_0 qui, elle, tient compte de l'hétérogénéité des doses reçues par les cellules lors de l'irradiation α .

1.1.3 Résultats:

1.1.3.1 Nombre de désintégrations à la surface de chaque cellule:

La première étape du calcul dosimétrique consiste à évaluer le nombre de désintégrations ayant lieu à la surface des cellules et dans le surnageant pendant la période de l'irradiation. En raison d'activités spécifiques très différentes entre les anticorps radiomarqués à l' ^{131}I et les anticorps radiomarqués au ^{213}Bi , le nombre de désintégrations d' ^{131}I à la surface des cellules va être très supérieur au nombre de désintégrations de ^{213}Bi . (Figure 67). Ici, le calcul a été réalisé pour la cellule U266 qui dispose de 270 000 sites antigéniques à sa surface. Les courbes de cette figure illustrent la saturation du nombre de sites antigéniques lorsque la concentration d'activité administrée augmente. Pour l' ^{131}I , le nombre de désintégrations à la surface des cellules va varier entre 600 et 1400. Ce chiffre est très éloigné du nombre total de sites antigéniques présents à la surface des cellules U266. Cet écart est dû évidemment à l'activité spécifique du radioimmunoconjugué (i.e. une partie des anticorps fixés à la cellule n'est pas radiomarquée) mais également à la période de l' ^{131}I . L'irradiation ne dure que 24 heures. Cette durée doit être mise en rapport avec la période de l' ^{131}I : environ 8 jours. Une partie des anticorps radiomarqués fixés à la surface des cellules n'aura pas le temps d'émettre une particule pendant la période de l'irradiation. Pour le ^{213}Bi , ce nombre va varier entre 17 et 26. Ce faible nombre de désintégrations provient de la faible activité spécifique de l'anticorps radiomarqués au ^{213}Bi . Seul un anticorps sur 10000 est marqué.

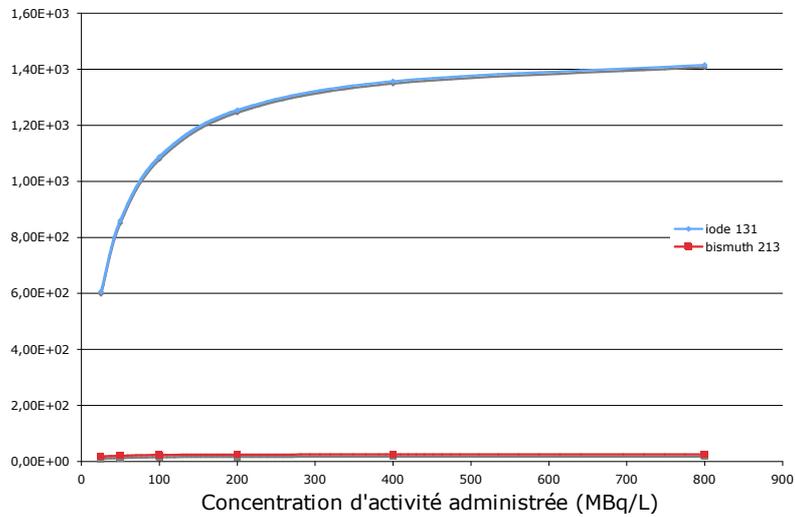


Figure 67: Nombre de désintégrations par cellule en fonction de la concentration d'activité administrée.

La concentration de désintégrations dans le surnageant augmente de façon linéaire avec la concentration d'activité ajoutée (Figure 68). On retrouve les différences liées à l'activité spécifique entre l' ^{131}I et le ^{213}Bi .

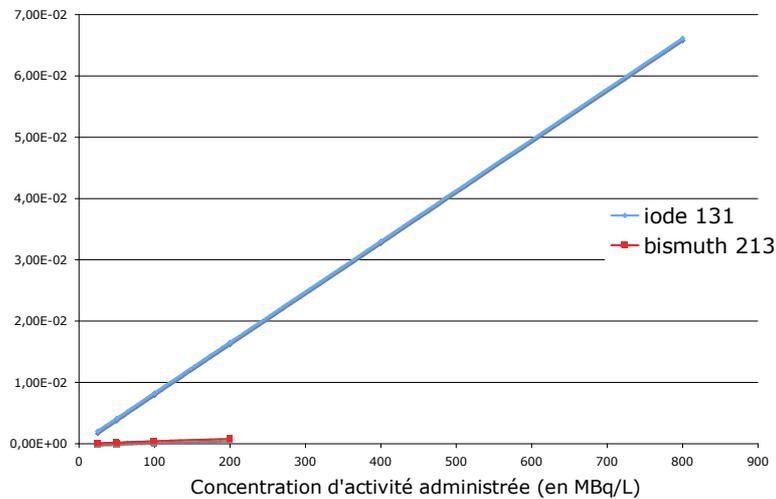


Figure 68: Nombre de désintégrations par unité de volume dans le surnageant en fonction de la concentration d'activité administrée.

1.1.3.2 Calculs des facteurs S pour $I^{131}I$:

Les facteurs S(N<-CS) calculés pour la cellule U266 ($R_{cel} = 8 \mu m$, $R_{noy} = 5 \mu m$) par les codes Monte-Carlo MCNPX et Geant4 et disponibles dans les tables du MIRD cellulaire [7] sont décrits dans la tableau 12. Les deux codes donnent des résultats similaires. En revanche, on observe une différence de 15% et 20% entre le facteur S donné par les tables du MIRD et les facteurs S calculés par MCNPX et Geant4 respectivement.

	MIRD	MCNPX	Geant4
S (N<-CS) (Gy/Bq.s)	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \cdot 10^{-4}$ (+15%)	$1,20 \cdot 10^{-4}$ (+20%)

Tableau 12: Facteurs S lorsque les sources sont réparties de façon homogène à la surface de la cellule calculés pour $I^{131}I$ et la cellule U266 par MCNPX et Geant4. La valeur du MIRD est tirée des tables disponibles [7].

Ces différences peuvent être expliquées par les méthodes de calcul différentes employés ainsi que les spectres bêta de $I^{131}I$ utilisés. En outre, la production d'électrons secondaires n'est pas prise en compte dans la calcul du MIRD.

Pour la cellule U266, les facteurs S_{cross} et S_{vol} calculés par MCNPX pour $I^{131}I$ sont donnés dans le tableau 13 et comparés à la valeur du facteur S_{self} calculé.

	S_{self} (Gy/Bq.s)	S_{cross} (Gy/Bq.s)	S_{vol} (Gy/Bq.s)
	$1,15 \cdot 10^{-4}$	$5,69 \cdot 10^{-10}$	$1,72 \cdot 10^{-11}$

Tableau 13: Facteurs S_{self} , S_{cross} et S_{vol} calculés pour la cellule U266 et $I^{131}I$.

Les valeurs des facteurs S_{cross} , S_{vol} sont très faibles comparées à la valeur du facteur S_{self} . La dose moyenne absorbée par le noyau de la cellule sera obtenue en multipliant ces facteurs S par le nombre de désintégrations pour chaque localisation. Le nombre de désintégrations dans le surnageant et à la surface des 200000 cellules étant très important, la dose délivrée par les anticorps radiomarqués qui se trouvent dans ces deux localisations ne sera donc pas négligeable par rapport à la dose auto-absorbée par la cellule cible.

1.1.3.3 Comparaison Irradiation β /Irradiation α :

La figure 69 montre la dose moyenne absorbée par le noyau des cellules en fonction de la concentration d'activité administrée lors des irradiations par les anticorps radiomarqués à $I^{131}I$ et au ^{213}Bi .

Ces courbes comportent deux parties. Pour des activités ajoutées faibles, la dose moyenne absorbée augmente très rapidement, de façon non linéaire en fonction de la concentration d'activité ajoutée. Cette phase correspond à la fixation d'anticorps radiomarqués à la surface

des cellules. Lorsque les sites antigéniques à la surface des cellules sont saturés, la dose moyenne augmente de façon linéaire avec la concentration d'activité ajoutée. Le surplus de dose ne provient en effet que des anticorps radiomarqués libres en solution.

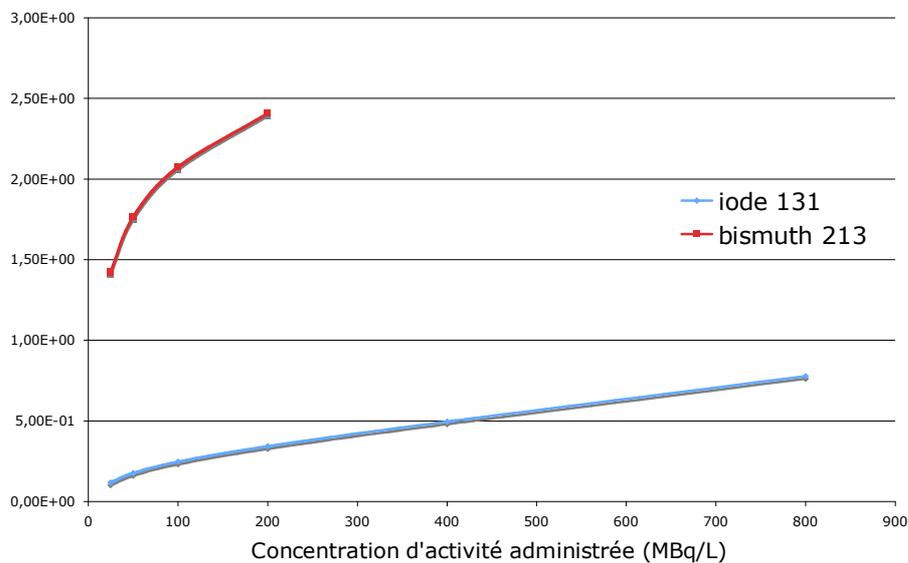


Figure 69: Dose moyenne absorbée par le noyau de la cellule U266 en fonction de la concentration d'activité administrée.

On observe donc ici qu'il n'existe pas de relation linéaire entre la dose moyenne absorbée et la concentration d'activité ajoutée. La dosimétrie est donc indispensable à toute étude pré-clinique rigoureuse. Ce constat est particulièrement vrai pour les irradiations α . Les activités ajoutées sont en effet faibles dans ce genre d'étude en raison de la grande cytotoxicité des particules α et l'on se situera donc dans la zone non-linéaire décrite précédemment.

La dose moyenne absorbée délivrée au noyau des cellules par unité d'activité administrée est 4 (pour 200 MBq/L) à 12 fois (pour 25 MBq/L) plus élevée quand les cellules sont irradiées par le ^{213}Bi par rapport à ^{131}I .

Il faut à nouveau garder à l'esprit que les activités spécifiques sont différentes entre les anticorps radiomarqués au ^{213}Bi et les anticorps marqués à ^{131}I .

L'origine de la dose absorbée est également dépendante du radionucléide (Figure 70). Pour le ^{213}Bi , de 4% (pour 25 MBq/L) à 18% (pour 200 MBq/L) de la dose totale est délivrée à partir des anticorps radiomarqués libres dans le surnageant. Pour ^{131}I , ces valeurs sont comprises entre 19% (pour 25 MBq/L) et 46% (pour 200 MBq/L). Cette irradiation non-spécifique est particulièrement importante pour ^{131}I en raison du long parcours des particules β dans l'eau. Ces résultats dépendent de la géométrie de l'irradiation (ici une monocouche de cellules dans un puits de culture cylindrique).

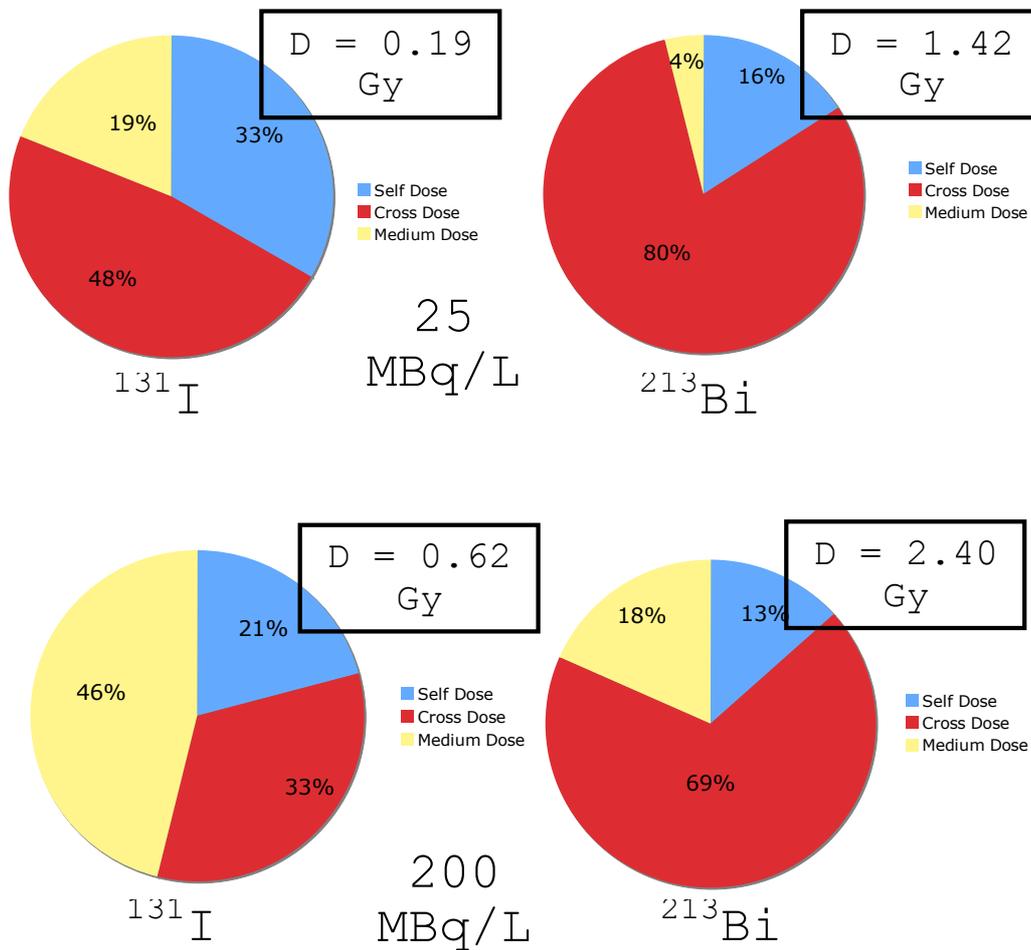


Figure 70: Origine de la dose moyenne absorbée par les noyaux des cellules et délivrée par les anticorps radiomarqués à ^{131}I et au ^{213}Bi pour deux concentrations d'activité ajoutée (25 et 200 MBq/L).

Le second résultat notable est la fraction importante de la dose totale qui provient du feu croisé pour l'irradiation α . Le facteur S_{self} est plus élevé que le facteur S_{cross} , mais en raison du pic de Bragg cette différence n'est pas si importante et comme en outre plus de désintégrations ont lieu sur les cellules voisines de la cellule cible que sur le cellule cible elle-même, le feu croisé est prédominant.

Enfin, on peut observer que lorsque la concentration d'activité augmente, le pourcentage de la dose totale provenant du surnageant augmente. Comme expliqué précédemment, cette tendance provient de la saturation des sites antigéniques.

La seconde étape de ce travail a consisté à relier ces valeurs de concentration d'activité et de dose calculées aux survies cellulaires mesurées pour chaque concentration d'activité.

Les résultats obtenus (Figure 71) par les biologistes de l'équipe à la suite des irradiations de la cellule U266 par des anticorps B-B4 radiomarqués au ^{213}Bi et à ^{131}I montrent que pour le ^{213}Bi et ^{131}I , les courbes de survie peuvent être ajustées par une exponentielle. Comme attendu, la pente de la courbe de survie suite à l'irradiation par des particules α est beaucoup plus importante que la pente de la courbe de survie suite à l'irradiation β .

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 71: Survie clonogénique en fonction de l'activité volumique ajoutée après exposition à des anticorps B-B4 radiomarqués avec différents radionucléides: ^{213}Bi (carrés), ^{131}I (ronds) (d'après [3]).

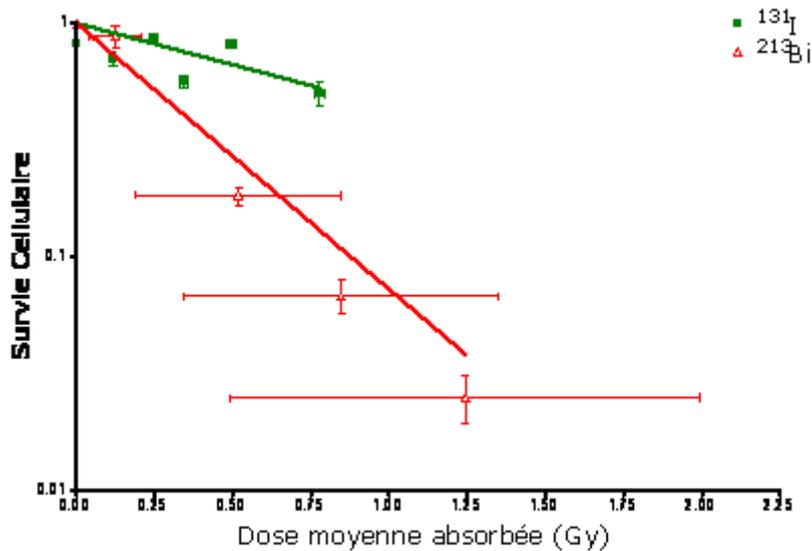


Figure 72: Survie clonogénique en fonction de la dose moyenne absorbée par les noyaux des cellules après exposition à des anticorps B-B4 radiomarqués avec différents radionucléides: ^{213}Bi (rouge), ^{131}I (vert).

Les courbes de survie en fonction de la dose moyenne absorbée sont également des exponentielles sans épaulement pour l'irradiation β et l'irradiation α (Figure 72). Le ^{213}Bi est beaucoup plus cytotoxique ($D_0=0,38 \pm 0,04$ Gy) que l' ^{131}I ($D_0=1,2 \pm 0,4$ Gy). Les incertitudes sur le calcul de la dose délivrée par les particules sont importantes. Elles proviennent de l'incertitude sur le nombre de sites antigéniques et sur l'affinité de l'anticorps.

1.1.3.4 Différences de radiosensibilité entre les trois lignées :

Puisque nous disposons de trois lignées cellulaires différentes provenant toutes du cancer du myélome multiple, il convenait de comparer leur radiosensibilité respective à l'irradiation α .

QuickTime™ et un décompresseur TIFF (Uncompressed) sont requis pour visionner cette image.

Figure 73: Survie clonogénique de 3 lignées de myélome multiple (LP1 : carré ; RPMI 8226 : triangle ; U266 : rond) après une irradiation non spécifique (formes vides) et spécifique par le $^{213}\text{Bi-B-4}$ (formes pleines) (d'après [8]).

Lorsque la survie cellulaire est exprimée en fonction de l'activité volumique, les trois lignées cellulaires semblent posséder des radiosensibilités identiques vis-à-vis de l'irradiation α (carrés, triangles et ronds noirs dans la figure 73). Cette hypothèse est infirmée lorsque l'on représente la survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée.

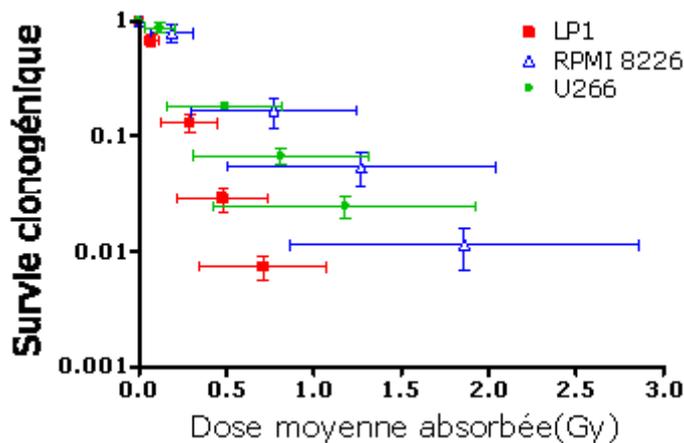


Figure 74: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau pour les trois lignées cellulaires (LP1, RPMI 8226, U266) lors de l'irradiation α .

La figure 74 montre que la lignée cellulaire LP1 est plus radiosensible que les deux autres lignées à l'irradiation α . Les incertitudes importantes portant sur la dose moyenne absorbée ne permettent pas de conclure sur la différence de radiosensibilité entre les cellules RPMI 8226 et U266.

La comparaison des figures 73 et 74 démontre l'intérêt d'une étude dosimétrique. La représentation de la survie cellulaire en fonction de l'activité ajoutée n'apporte que peu d'informations. L'effet d'une activité ajoutée sur la survie cellulaire va être modulé en effet par:

- la part de l'activité qui est fixée à la surface des cellules,
- les tailles relatives des cellules et de leur noyau.

La dose est un index qui tient compte de ces paramètres. Elle rend mieux compte des effets de l'irradiation.

1.1.3.5 Calcul de l'EBR:

Des irradiations externes au ^{60}Co ont été réalisées sur les trois lignées cellulaires qui semblent montrer une même sensibilité de ces trois lignées au rayonnement gamma (Figure 75).

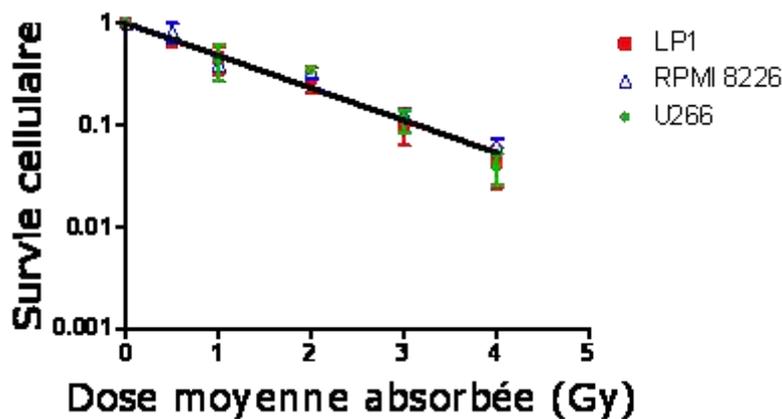


Figure 75: Survie cellulaire en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau pour les trois lignées cellulaires (LP1, RPMI 8226, U266) lors de l'irradiation γ .

Disposant de ces données, nous pouvons calculer l'EBR des trois lignées selon les deux méthodes décrites plus haut :

- en utilisant la valeur de D_0 ,
- en utilisant la valeur de z_0 .

Avant de décrire les résultats obtenus, nous avons cherché à analyser la distribution de doses reçues par les cellules pour des doses moyennes absorbées qui conduisent à une survie de 37% (Figure 76).

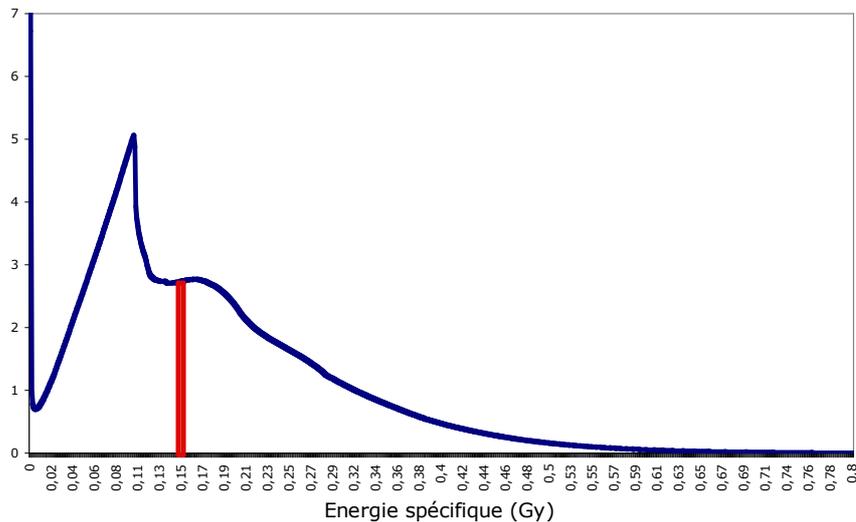


Figure 76: Distributions multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau des cellules LP1. La dose moyenne absorbée est égale à 0,146 Gy et est représentée par le trait rouge. Pour cette dose, la survie cellulaire mesurée vaut environ 40%.

Le spectre $f(z)$ de l'énergie spécifique reçue par le noyau des cellules LP1 irradiée par les anticorps radiomarqués au ^{213}Bi et pour une dose moyenne absorbée de 0,146 Gy montre une grande hétérogénéité. Cette hétérogénéité est plus visible dans le tableau 14 qui reprend les informations de la figure 76.

Dose reçue par les cellules	Pourcentage de cellules recevant cette dose
0 Gy	16,71 %
Entre 0 et 0,1 Gy	33,69 %
Entre 0,1 Gy et 0,18 Gy	23,65 %
Plus de 0,18 Gy	42,66 %

Tableau 14: Pourcentage de cellules U266 recevant des doses comprises entre 0 et 0,18 Gy lorsque la dose moyenne absorbée vaut 0,146 Gy. Données obtenues à partir de la figure 76.

On ne pourra donc pas considérer que les cellules reçoivent une valeur proche de la dose moyenne absorbée puisque par exemple plus de 16% des cellules ne reçoivent aucune dose. Les cellules irradiées par le ^{60}Co ont, elles, vraiment toutes reçu la dose moyenne absorbée

calculée en raison de l'homogénéité du faisceau d'irradiation. L'utilisation du paramètre de la radiosensibilité microdosimétrique, z_0 , semble donc appropriée.

Cette méthode de calcul va profondément modifier la valeur de l'EBR comme nous pouvons le voir dans le tableau 15:

	EBR « macrodosimétrique » (intervalle de confiance à 95%)	EBR « microdosimétrique » (intervalle de confiance à 95%)
LP1	$8,0 \pm 1,0$	$13,6 \pm 1,5$
U266	$4,0 \pm 1,5$	$5,4 \pm 1,7$
RPMI 8226	$2,8 \pm 0,7$	$3,6 \pm 1,1$

Tableau 15: Valeurs des EBR « macrodosimétriques » (calculés à partir des valeurs de D_0) et les EBR « microdosimétriques » (calculés à partir des valeurs de z_0) pour les trois lignées cellulaires du myélome multiple.

Comme attendu, l'utilisation de z_0 dans le calcul fait augmenter la valeur de l'EBR par rapport à l'utilisation de D_0 . Cette augmentation atteint 70% pour les cellules LP1.

L'EBR des particules β a également été évalué à la suite de l'irradiation des cellules U266 par des anticorps radiomarqués à ^{131}I . Il vaut $0,9 \pm 0,5$.

1.2 Discussion et Conclusion:

Cette étude expérimentale démontre de façon claire l'intérêt de la dosimétrie dans le cadre des expériences d'irradiations cellulaires réalisées *in vitro*. Analyser les courbes de survie cellulaire en fonction de l'activité n'apporte que peu d'informations et peut même conduire à de fausses conclusions si l'on ne prend pas en compte les limitations importantes de ce type d'étude. L'analyse dosimétrique, par l'intermédiaire de l'index de la dose, est indispensable :

- pour comparer la radiosensibilité de plusieurs lignées,
- pour comparer les effets de diverses modalités de traitement (RIT- α , RIT- β , irradiation γ externe) et donc pour calculer l'EBR.

La dosimétrie permet, en effet, de prendre en compte la fixation différente des anticorps radiomarqués par les différentes cellulaires, les probabilités différentes pour chaque cellule ou chaque noyau de cellule d'être traversée par une particule ionisante (cette caractéristique va dépendre des tailles des cellules), le nombre de désintégrations ayant lieu dans l'environnement qui va dépendre de la demi-vie du radioélément et de la durée de l'irradiation et enfin les caractéristiques variables des dépôts d'énergie à l'intérieur de la cellule pour différents types de particules.

L'analyse dosimétrique a montré que trois lignées cellulaires issues du même type de cancer, le myélome multiple, pouvaient avoir une radiosensibilité différente à l'irradiation α . Ce résultat est d'autant plus surprenant que les cellules avaient la même radiosensibilité à l'irradiation γ .

Le calcul de l'EBR des irradiations α et β par rapport à une irradiation externe γ a montré que les particules α étaient beaucoup plus cytotoxiques que les particules β . L'EBR de ces dernières est évalué à 0,9. L'EBR des particules α , calculé à partir du D_0 macrodosimétrique, est compris entre 2,8 et 8 suivant les lignées cellulaires. Toutefois, il nous paraît plus juste de calculer l'EBR à partir du paramètre microdosimétrique, z_0 . Dans ce cas,

les valeurs de l'EBR des particules α sont comprises entre 3,6 et 13,6. Le calcul de l'EBR des particules α à partir de D_0 nous donne un résultat sous-estimé.

De très nombreuses valeurs d'EBR pour les particules α ont été publiées au cours des dernières années [9-22]. Nous avons donc comparé les valeurs que nous avons obtenues avec ces valeurs publiées (Figure 77).

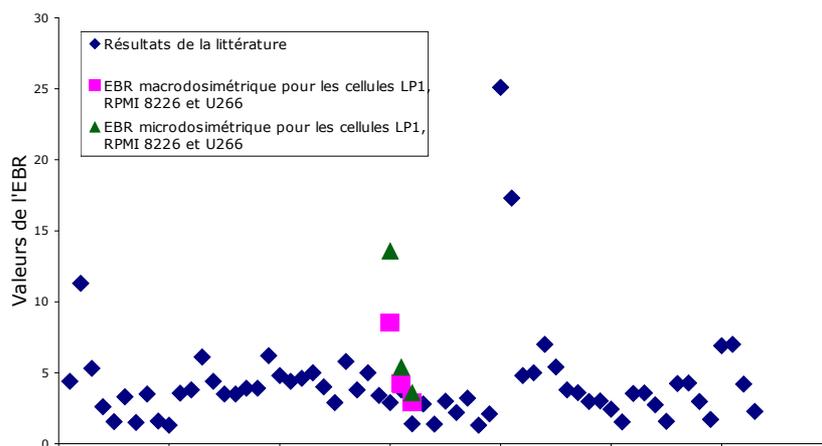


Figure 77: Comparaison de valeurs d'EBR provenant de la littérature et d'EBR calculées lors de cette étude.

On voit que la très grande majorité des valeurs de l'EBR de la littérature est comprise entre 1 et 7. Seuls 4 points de la littérature reflètent des EBR plus élevés. Ces valeurs sont issues de la même étude d'irradiation de cellules par de ^{211}At . Il semble que le rayonnement de référence choisi avait un débit de dose très faible [9], ce qui expliquerait ces EBRs supérieures à 15. Les valeurs que nous avons déterminées par le calcul macrodosimétrique sont proches des valeurs de la littérature. La valeur calculée pour la cellule LP1 par le calcul microdosimétrique est en revanche supérieure aux valeurs habituellement déterminées.

La disparité de ces valeurs souligne les difficultés inhérentes aux études expérimentales mais aussi le fait que la valeur de l'EBR dépend de nombreux paramètres :

- la lignée cellulaire étudiée
- le rayonnement de référence choisi et son particulièrement son débit de dose,
- le TEL moyen des dépôts d'énergie par les particules α
- le paramètre biologique mesuré (survie cellulaire, taux d'apoptose, taux de mutations)
- la méthode de culture cellulaire et la méthode utilisée pour mesurer le paramètre biologique considéré
- la phase de croissance des cellules pendant l'irradiation

Cette liste n'est certainement pas exhaustive.

L'étude des expériences d'irradiations *in vitro* a également souligné la limite de l'analyse dosimétrique. La grande incertitude portant sur le nombre d'anticorps fixés à la surface des cellules entraîne une incertitude importante sur la valeur de dose calculée. Cette limitation ne

nous a pas permis de conclure quant aux radiosensibilités respectives des cellules des lignées U266 et RPMI 8226.

Une autre question se pose par rapport au calcul dosimétrique et à la relation dose/effet. Nous avons comparé les radiosensibilités respectives des lignées cellulaires à partir de la dose qui permet la diminution de la survie à 37%. En parallèle, nous avons représenté la survie en fonction du nombre moyen de coups reçus par chaque cellule (Figure 78).

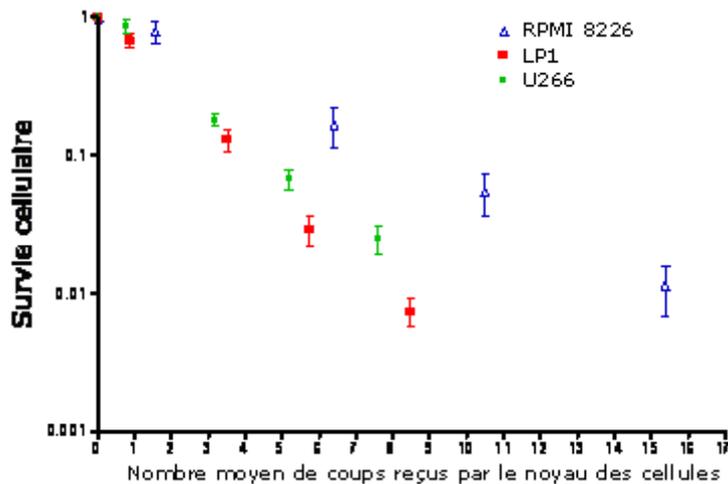


Figure 78: Survie cellulaire en fonction du nombre moyen de coups reçus par le noyau des cellules pour les trois lignées cellulaires (LP1, RPMI 8226, U266) lors de l'irradiation α .

En utilisant le paramètre du nombre moyen de coups reçus par chaque cellule, les cellules ont alors des radiosensibilités très proches. Ce n'était pas le cas lorsque l'on exprimait la courbe de survie en fonction de la dose moyenne absorbée. Cette observation pose la question du paramètre dosimétrique le plus pertinent auquel on peut relier la survie. Dans la littérature, quatre modèles de survie basés sur des paramètres différents sont évoqués. Les quatre paramètres sont les suivants :

- l'énergie spécifique, z [23, 24, 25]
- l'énergie déposée, e [26]
- la longueur de corde dans la cible, l [27]
- le nombre de coups reçus par la cible, n [28, 29].

Il est très difficile de vérifier expérimentalement quel est le modèle le plus pertinent. La majorité des études permet la mesure d'une survie moyennée pour un grand nombre de cellules. Il est alors impossible d'étudier la corrélation statistique entre un des paramètres décrits ci-dessus et la survie réelle de la cellule. Pour s'affranchir de cette incertitude statistique, il convient de mesurer la survie individuelle de chaque cellule ainsi que les caractéristiques précises de son irradiation. Deux développements techniques récents peuvent permettre de telles études :

- les micro faisceaux capables de délivrer des particules α une par une [28, 29],
- la superposition précise d'une image des cellules irradiées et d'un film sensible au passage de particules chargées (track-etch images) [30, 31].

Le groupe de Stinchcomb et Roeske a présenté le dispositif technique ainsi que le cadre théorique rigoureux permettant ces études [32, 33] mais leurs conclusions n'ont, en revanche, jamais été publiées.

Ces études marquent la limite de la microdosimétrie dans sa capacité à modéliser la survie cellulaire. L'analyse de traces, à travers la modélisation des processus physico-chimiques, devrait permettre de mieux expliquer tous les phénomènes qui entraînent la mort cellulaire à la suite d'une irradiation.

2 Complexes CMH/peptides

Le modèle cellulaire mis en place par François Davodeau et Karine Bernardeau est un modèle original et unique en son genre, qui offre des possibilités nouvelles pour des études dosimétriques. Il permet, en effet, de réaliser des irradiations sur des lignées cellulaires (T2, Ada dans cet exemple) dont on peut moduler le nombre de sites de ciblage au fil des expériences grâce au complexe CMH/peptide. Le principe est le suivant. On charge, dans un premier temps, les cellules avec différentes concentrations de peptides. Cela entraîne la présentation par les cellules d'un nombre variable de sites antigéniques à leur surface que l'on peut, ensuite, cibler « classiquement » à l'aide d'anticorps radiomarqués au ^{213}Bi . Dans nos expériences, nous sommes donc capables grâce à l'emploi du complexe CMH/peptide de faire varier la spécificité du traitement tout en administrant la même activité ajoutée. Nous aurons donc entre deux expériences le même nombre de désintégrations dans les puits de culture, mais le pourcentage d'émissions qui ont lieu à la surface des cellules pourra varier.

Ce modèle offre donc deux perspectives immédiates que nous avons explorées au cours de l'analyse des premières expériences :

- une comparaison de la survie cellulaire lors d'irradiations spécifiques (cellules chargées en peptides et ciblées par un anticorps radiomarqué) et non spécifiques (cellules non chargées en peptide et ajout d'un anticorps radiomarqué dans la solution baignant les cellules),
- une évaluation possible de l'action thérapeutique d'anticorps radiomarqués ciblant une densité antigénique faible (environ 25 000 sites) à la surface de cellules

Enfin, les calculs microdosimétriques ont montré une radiosensibilité très forte des cellules Ada qui a posé la question de la cible cellulaire des rayonnements ionisants.

2.1 Matériel et Méthodes :

2.1.1 Lignées cellulaires :

Pour cette étude, deux lignées cellulaires de lymphocytes ont été choisies:

- Ada ($R_{\text{cel}} = 5,6 \mu\text{m} \pm 0,64$ et $R_{\text{noy}} = 3,4 \pm 1,05 \mu\text{m}$),
- T2 ($R_{\text{cel}} = 7,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$ et $R_{\text{noy}} = 5,1 \pm 1,19 \mu\text{m}$).

Les mesures des rayons cellulaires et nucléaires qui figurent entre parenthèses ont été réalisées sur 200 cellules de chaque lignée.

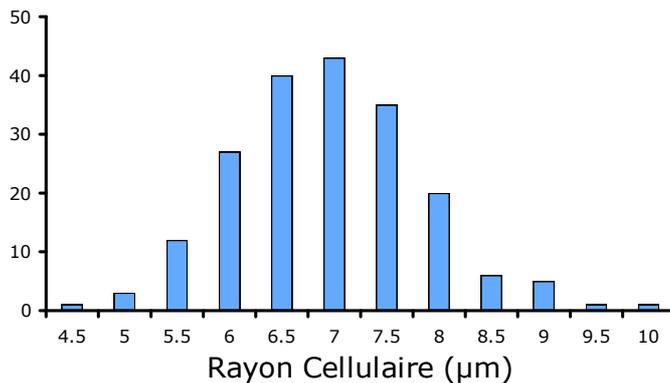


Figure 79: Distribution des rayons cellulaires mesurés au sein d'un échantillon de 200 cellules T2.

La figure 79 montre que les rayons cellulaires sont distribués de façon gaussienne pour la cellule T2. On a observé également que le rapport nucléo cytoplasmique était constant et égal à 0,72.

Les mêmes observations ont été faites pour la cellule Ada. Le rapport nucléo cytoplasmique est dans ce cas égal à 0,6.

Les cellules étudiées (T2, Ada) sont des cellules non-adhérentes et ont une forme relativement sphérique.

2.1.2 Anticorps :

L'originalité du modèle biologique mis en place réside dans le choix de cibler des complexes CMH/peptides présents à la surface des cellules [34]. Ces complexes résultent de l'association d'une molécule HLA et d'un peptide. Les peptides présentés par les molécules de CMH sont issus, classiquement, de la dégradation de protéines intracellulaires par le protéasome. Les peptides générés sont ensuite transportés dans le réticulum endoplasmique où ils sont chargés sur les molécules de CMH. Les complexes ainsi formés sont finalement transportés vers la surface cellulaire pour être présentés aux cellules du système immunitaire (Figure 80).

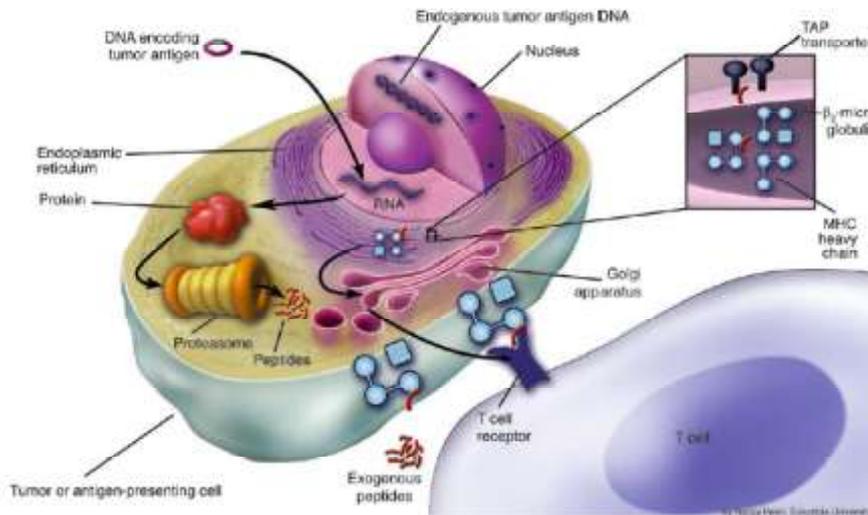


Figure 80: Voie de présentation des antigènes associés aux molécules de CMH I. Les protéines sont dégradées par le protéasome. Les peptides ainsi formés sont transportés, via le système TAP, dans le réticulum endoplasmique où ils sont chargés sur les molécules de CMH I néosynthétisées. Les complexes ainsi formés sont ensuite transportés à la surface de la cellule pour être reconnu par le TCR des clones LT (D'après [35]).

Ces complexes CMH/peptides sont ensuite reconnus par des anticorps spécifiques. Deux anticorps spécifiques du complexe CMH/peptide utilisé ont été produits et ont été utilisés pour cibler les cellules T2 et Ada.

Dans ce protocole, les deux lignées utilisées (T2 et Ada) ont été choisies car elles présentent naturellement très peu de complexes CMH/peptide endogènes. On peut, en revanche, les charger de manière exogène avec un peptide d'intérêt. Ce chargement est réalisé en faisant incubé ces cellules en présence du peptide d'intérêt. Selon la concentration de peptides ajoutée, le nombre de complexes CMH/peptide présents à la surface des cellules sera variable. Cette caractéristique va nous permettre de moduler le nombre de sites antigéniques présents à la surface des cellules et par conséquent de faire varier la spécificité de l'irradiation dans le cadre d'un protocole de RIT- α . À notre connaissance, ceci constitue un modèle biologique unique, particulièrement intéressant dans le cadre d'une analyse dosimétrique.

2.1.3 Binding de l'anticorps:

Dans un premier temps, la relation entre la densité de complexes CMH/peptides présents à la surface des cellules et la concentration de peptides a été évaluée.

Les caractéristiques de binding des anticorps 8A11 et 7D4 aux complexes CMH/peptides ont ensuite été déterminées par une analyse de type Scatchard [34].

2.1.4 Internalisation:

Une mesure de l'internalisation des anticorps 7D4 et 8A11 en fonction du temps d'incubation a été effectuée pour les deux lignées cellulaires (Ada et T2). Le nombre d'anticorps internalisés ne dépasse pas 10% du nombre total d'anticorps fixés par les cellules.

2.1.5 Radiomarquage des anticorps 7D4 et 8A11 :

Un agent chélatant bifonctionnel de type *trans*-cyclohexyldiethylene triamine penta-acetic acid (CHX- α ''-DTPA) fourni par la société Macrocyclics (Dallas, USA) a été utilisé pour marquer les anticorps au ^{213}Bi .

2.1.6 Contrôle de la configuration cellulaire dans le puits de culture :

Le contrôle de la géométrie cellulaire dans le puits de culture est essentiel pour le calcul dosimétrique. Celle-ci a été observée par microscopie (magnification 40) dans des conditions similaires à celle de l'expérience. 250 000 cellules ont été placées dans un puits de culture puis resuspendues au moment de l'ajout d'une certaine concentration d'anticorps 7D4 et 8A11. La disposition des cellules dans le puits de culture a alors été suivie pendant les deux heures suivantes. Des photos du puits de culture ont été prises régulièrement (toutes les 2 minutes pendant les 20 premières minutes, toutes les 20 minutes ensuite) afin d'observer le temps de sédimentation des cellules et la disposition des cellules ensuite au fond du puits.

Cette expérience a été réalisée pour les deux lignées cellulaires T2 et Ada.

L'observation au microscope a montré que les cellules sédimentaient rapidement. Au fond du puits de culture, on observe après 10 minutes, une monocouche compacte de cellules. Aucune différence n'a été observée entre les cellules T2 et les cellules Ada.

Le calcul analytique considèrera donc deux étapes dans l'irradiation :

- pendant les 10 premières minutes : les cellules sont isolées et irradiées par les particules α provenant des désintégrations ayant lieu dans le milieu les entourant ainsi que par les particules α émises à leur surface en raison des anticorps radiomarqués fixés à la membrane. Aucun feu croisé n'est considéré au cours de cette étape.
- Pendant le reste de l'expérience, les cellules sont en monocouche compacte. Elles sont donc irradiées par le milieu, par les particules α émises à leur surface et à la surface des cellules voisines.

2.1.7 Mesure de la cytotoxicité de l'irradiation :

Deux types de protocoles d'irradiation ont été réalisés au cours des expériences. Les cellules T2 et Ada ont été irradiées, dans un premier temps, de manière non spécifique. Aucun peptide n'a alors été ajouté dans le milieu. Dans ce cas, il n'y avait pas de fixation spécifique des anticorps 7D4 et 8A11 aux cellules en raison de l'absence de complexes CMH/peptide à la surface des cellules. Les cellules ont été irradiées avec des concentrations variables d'anticorps 7D4 et 8A11 ($1,2 \cdot 10^{-11}$ M à $5,45 \cdot 10^{-8}$ M). En réalité, une très légère fixation non spécifique a été mesurée. Pour le deuxième groupe d'expériences, une concentration variable de peptides ($6,4 \cdot 10^{-10}$ M à $1 \cdot 10^{-4}$ M) a été ajoutée à la solution contenant les cellules. Dans ce cas, des complexes CMH/peptides étaient présents à la surface des cellules et les anticorps 7D4 et 8A11 ($1,2 \cdot 10^{-11}$ M à $5,45 \cdot 10^{-8}$ M) se sont alors liés spécifiquement aux cellules T2 et Ada. Dans ces conditions, une part significative de la dose provenait, tout de même, toujours des anticorps radiomarqués libres en solution.

24 heures après l'irradiation, la capacité de prolifération des cellules a été mesurée par un test d'incorporation de $^{3\text{H}}$ thymidine [36].

2.1.8 Calcul du nombre d'anticorps radiomarqués fixés à la surface des cellules

Le nombre d'anticorps fixés à la surface des cellules à chaque expérience a été calculé grâce à l'étude de binding réalisée, sur les cellules T2 et Ada et pour les anticorps 7D4 et 8A11, avant les expériences d'irradiation.

Un calcul simple à partir de l'activité spécifique mesurée nous a permis ensuite de calculer la part d'anticorps radiomarqués et d'en déduire le nombre d'atomes de ^{213}Bi fixés à la surface des cellules.

2.1.9 Étude dosimétrique :

Pour chaque point expérimental correspondant à une concentration de peptides, une concentration d'anticorps ajoutés et une activité spécifique bien déterminées, le nombre de désintégrations par unité de volume du milieu ainsi que le nombre d'anticorps radiomarqués accrochés à la surface de chaque cellule ont été calculés. À partir de ces valeurs, les spectres $f_1(z)$ et $f(z)$ correspondant aux distributions single-hit et multi-hit de l'énergie spécifique ont été déterminées. Ce calcul a été effectué en prenant en compte les distributions des rayons cellulaires mesurées. Du spectre $f(z)$, on a pu déduire la dose moyenne absorbée, le pourcentage de cellules épargnées, le nombre moyen de coups.

2.1.9.1 Incertitudes

L'incertitude portant sur la dose provient de plusieurs sources d'incertitudes inhérentes à la mesure :

- de l'activité spécifique,
- de la concentration d'anticorps ajoutée,
- de l'affinité du peptide,
- du nombre de complexes formés à la surface des cellules,
- de l'affinité des anticorps 7-D4 et 8A11.

Nous n'avons pas tenu compte des deux premières sources d'incertitudes négligeables *a priori* devant les autres. L'affinité des peptides, le nombre de complexes à la surface des cellules et l'affinité des anticorps ont été déterminés grâce à un ajustement des courbes de Scatchard et les intervalles de confiance à 95% de ces paramètres ont été déterminés. En calculant la propagation de l'incertitude, l'intervalle de confiance à 95% du nombre d'atomes fixés à la surface des cellules a été déduit. Enfin, les calculs dosimétriques ont été réalisés et les intervalles de confiance à 95% de la dose moyenne absorbée et du nombre moyen de coups ont été déterminés.

2.1.9.2 Détermination de la radiosensibilité des cellules T2 et Ada :

À partir de la mesure de la prolifération cellulaire après l'irradiation des cellules par les particules α , les radiosensibilités des cellules T2 et Ada ont été calculées. Les paramètres D_0 et z_0 déjà présentés auparavant dans ce travail ont été calculés.

2.2 Résultats :

2.2.1 Impact de la spécificité de l'irradiation :

La méthode de la RIT repose sur le ciblage spécifique des cellules tumorales à l'aide d'anticorps reconnaissant les antigènes ou récepteurs présents à la surface de ces cellules. Ce ciblage précis doit permettre d'augmenter le ratio des doses tumeur/tissus sains. Le protocole expérimental utilisé ici sur une monocouche de cellules nous permet de mesurer directement la différence de toxicité produite entre une irradiation non-spécifique et une irradiation spécifique des mêmes cellules.

La figure 81 montre la capacité de prolifération des cellules T2 (que l'on peut assimiler à la survie cellulaire) après une irradiation à l'aide d'anticorps 7D4 radiomarqués au ^{213}Bi , pour différentes concentrations de peptides chargés au préalable. Pour une même concentration d'anticorps ajoutés, la cytotoxicité de l'irradiation va augmenter avec le nombre de sites antigéniques disponibles sur les cellules tumorales.

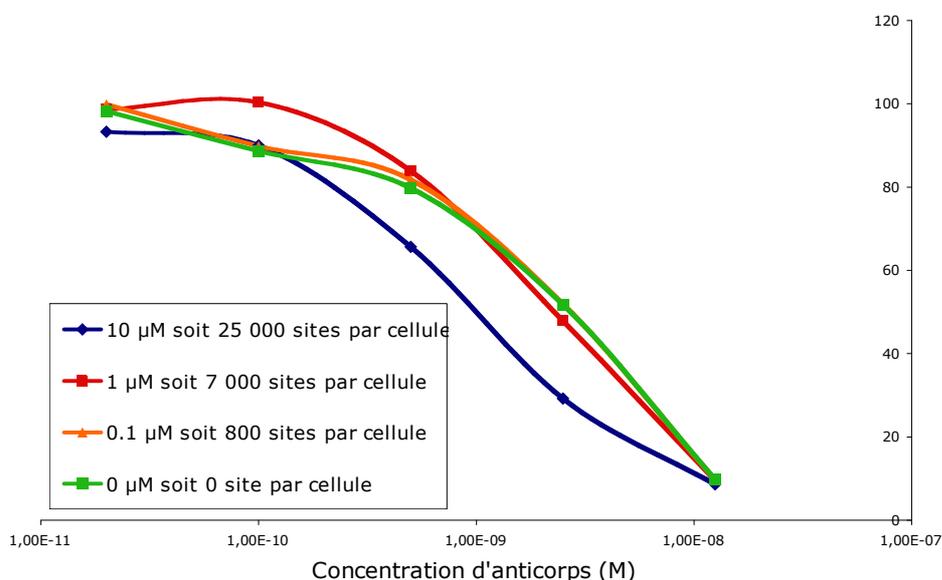


Figure 81: Survie des cellules T2 en fonction de la concentration d'anticorps ajoutés. Chaque courbe représente une concentration de peptides ajoutés différente et le nombre de sites par cellule correspondant.

La conséquence intéressante de cette observation est qu'une plus grande spécificité du traitement peut permettre, pour un résultat identique en matière d'efficacité, l'administration d'activités ajoutées beaucoup plus faibles, ce qui réduira d'autant la toxicité du traitement.

Intuitivement, il est aisé de deviner que pour un même nombre de désintégrations dans un volume entourant une cellule, la dose reçue par le noyau de celle-ci sera plus importante si une fraction importante du nombre total de désintégrations a lieu à sa surface. Au-delà de la

simple dose macrodosimétrique, les spectres microdosimétriques seront également très différents suivant la spécificité de l'irradiation.

Nous avons considéré l'irradiation de la cellule T2 pour une concentration d'anticorps radiomarqués de $2,5 \cdot 10^{-9}$ M (activité spécifique : 222 MBq/mg) avec des concentrations de peptides variables (de 0 à 10 μ M). Nous avons alors déterminé pour chaque concentration de peptides les spectres microdosimétriques correspondants (Figure 82).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 82: Distribution multi-coups d'énergie spécifique dans le noyau des cellules T2 pour un concentration d'anticorps ajoutés de $2,5 \cdot 10^{-9}$ M. Chaque courbe représente une concentration différente de peptides ajoutés.

La figure 82 montre les spectres $f(z)$ lorsque l'on varie la concentration de peptides ajoutés, et donc le nombre de sites antigéniques.

L'augmentation de la spécificité de l'irradiation va entraîner un nombre moyen de coups au noyau de la cellule plus important. La distribution d'énergie spécifique $f(z)$ va être déplacée vers la droite. Le pourcentage de cellules dont le noyau ne sera traversé par aucune particule α peut être déterminé à partir du nombre moyen de coups. Ce dernier paramètre variera donc également en fonction de la spécificité de l'irradiation.

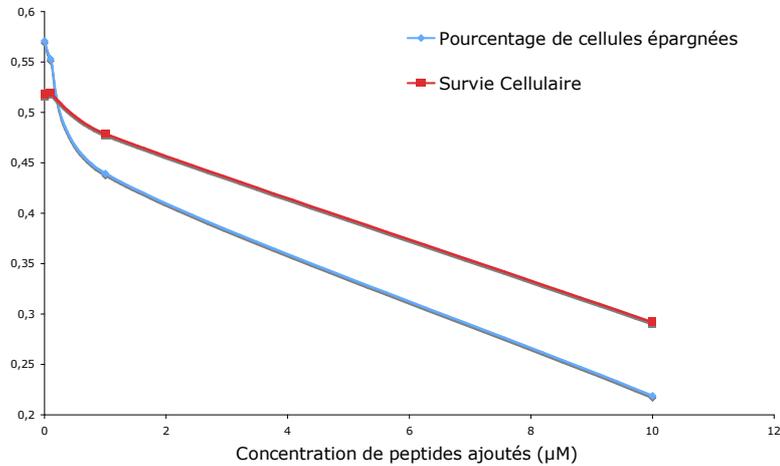


Figure 83: Survie cellulaire mesurée et pourcentage de cellules épargnées en fonction de la concentration de peptides ajoutés (cellules T2).

Le calcul du pourcentage de noyaux non touchés permet de mieux comprendre les variations de survie cellulaire en fonction de la concentration de peptides ajoutés ou de la spécificité de l'irradiation qui lui est corrélée (Figure 83).

Plus l'irradiation est spécifique, plus le pourcentage de noyaux épargnés diminue. Pour la même concentration d'anticorps ajoutés ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M), ce pourcentage vaut 57% quand l'irradiation est non-spécifique et ne vaut plus que 22% quand la cellule comporte 25000 sites à sa surface. Les données de la figure 83 représentent le résultat d'une expérience et le calcul correspondant. À faible concentration de peptides, il semble que certaines cellules dont le noyau n'a pas été touché sont tuées tout de même. Ce résultat, dans le cas présent, peut être attribué aux incertitudes expérimentales. Nous y reviendrons dans une partie ultérieure.

L'écart entre les deux courbes représente les cellules dont le noyau a été traversé par au moins une particule α et qui n'ont pas été tuées. Cet écart est assez restreint et souligne la grande cytotoxicité des particules α .

À l'exception des faibles concentrations de peptides ajoutés, les deux courbes ont une forme similaire. Cette relation montre bien l'intérêt du calcul dosimétrique dans sa qualité prédictive de la toxicité d'un traitement.

2.2.2 Comparaison Irradiation Spécifique – Irradiation Non spécifique :

Dans un second temps, nous avons séparé les expériences en deux groupes : celles pour lesquelles l'irradiation était non-spécifique et celles pour lesquelles une part de l'irradiation était spécifique.

La figure 84 représente les courbes de survie cellulaire mesurée en fonction de la dose moyenne absorbée par les cellules pour les deux types d'irradiation (spécifique et non spécifique) et pour la lignée cellulaire T2. Les 200 points expérimentaux pour les irradiations spécifique et non-spécifique sont ajustés précisément par une exponentielle avec un plateau autour d'une survie de 10%. La figure 85 représente la survie des cellules Ada en fonction de

la dose moyenne absorbée par le noyau des cellules pour les deux types d'irradiation (spécifique et non-spécifique). À nouveau, les 200 points expérimentaux forment une exponentielle avec un plateau autour de 10% de survie.

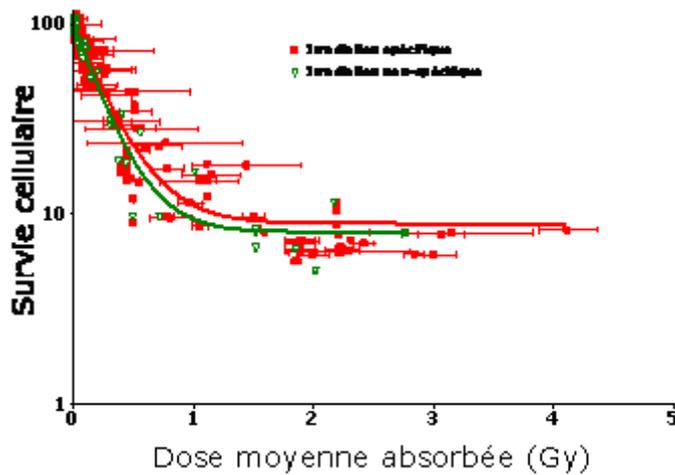


Figure 84: Survie cellulaire des cellules T2 en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau lors de l'irradiation spécifique (rouge) et de l'irradiation non spécifique (vert).

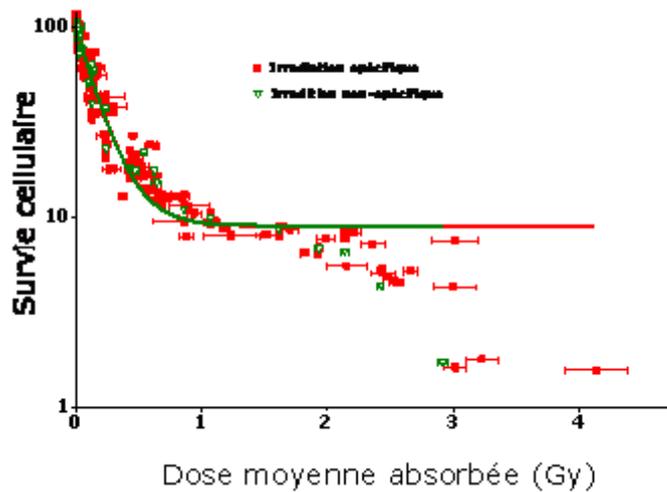


Figure 85: Survie cellulaire des cellules Ada en fonction de la dose moyenne absorbée au noyau lors de l'irradiation spécifique (rouge) et de l'irradiation non spécifique (vert).

2.2.3 Radiosensibilité des cellules:

Le tableau 16 regroupe les valeurs de D_0 déterminée pour les deux types d'irradiation et pour les deux lignées cellulaires. On peut remarquer que les cellules T2 (irradiation non-spécifique

$D_0 = 0,27 \pm 0,02$ Gy) sont moins radiosensibles que les cellules Ada (irradiation non-spécifique $D_0 = 0,21 \pm 0,01$ Gy). Pour des doses moyennes absorbées équivalentes, des taux de survie similaires sont observés lorsque l'irradiation est spécifique ou non-spécifique. Pour les cellules Ada, les deux D_0 sont similaires ($0,21 \pm 0,01$ Gy pour l'irradiation non-spécifique et $0,20 \pm 0,01$ Gy pour l'irradiation spécifique). Pour les cellules T2, les deux D_0 sont proches ($0,27 \pm 0,02$ Gy pour l'irradiation non-spécifique et $0,31 \pm 0,03$ Gy pour l'irradiation spécifique). Concernant les valeurs de n_0 pour les irradiations spécifique et non-spécifique, ils sont similaires pour les cellules Ada (respectivement $0,48 \pm 0,02$ et $0,50 \pm 0,03$). Pour les cellules T2, ils sont proches ($1,4 \pm 0,1$ pour l'irradiation non-spécifique et $1,8 \pm 0,1$ pour l'irradiation spécifique).

Mis en forme

		D_0 (Gy)	z_0 (Gy)	n_0
Ada	Non-spécifique	0,21	0	0,48
	Spécifique	0,20	0	0,50
T2	Non-spécifique	0,27	0,05	1,40
	Spécifique	0,31	0,07	1,80

- Mis en forme : Français
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme

Tableau 16: Paramètres D_0 , z_0 , et n_0 calculés pour les cellules Ada et T2 quand l'irradiation est non-spécifique ou spécifique. Les calculs ont été réalisés en considérant le noyau comme la cible critique des rayonnements.

La radiosensibilité microdosimétrique, z_0 , a été également déterminée. Pour les cellules T2 et l'irradiation non-spécifique : $z_0 = 0,05 \pm 0,01$ Gy. Pour l'irradiation spécifique, $z_0 = 0,07 \pm 0,05$ Gy. Ces deux valeurs sont encore similaires. Les calculs pour déterminer la valeur de z_0 pour les cellules Ada conduisent à $z_0 = 0$. Pour mieux comprendre ce résultat, le pourcentage de mortalité cellulaire en fonction du pourcentage de noyaux cellulaires touchés a été déterminé. Les résultats sont représentés dans la figure 86 (graphe A). La mortalité cellulaire est presque toujours plus élevée que le pourcentage de noyaux touchés. L'écart peut atteindre 40%, une mortalité de 80% est observée alors que seulement 40% des noyaux cellulaires sont touchés. Les barres horizontales représentent les incertitudes du calcul du pourcentage de noyaux touchés. Les incertitudes sur les mesures de la mortalité ne sont pas représentées. Elles sont en effet relativement faibles et ne modifient pas l'observation précédente. Ces résultats confirment la valeur du z_0 ($z_0 = 0$) pour les cellules Ada. Dans le but d'approfondir cette étude, nous avons représenté la mortalité cellulaire, mais cette fois en fonction du pourcentage des cellules touchées par au moins une particule α . Le graphe B de la figure 86 montre que la majorité des points est située désormais sous la droite $y=x$, qui représente la situation pour laquelle chaque cellule frappée par une particule α est tuée. D'un point de vue strictement dosimétrique, il semble par conséquent nécessaire de considérer la cellule entière comme la cible des rayonnements et non pas seulement le noyau.

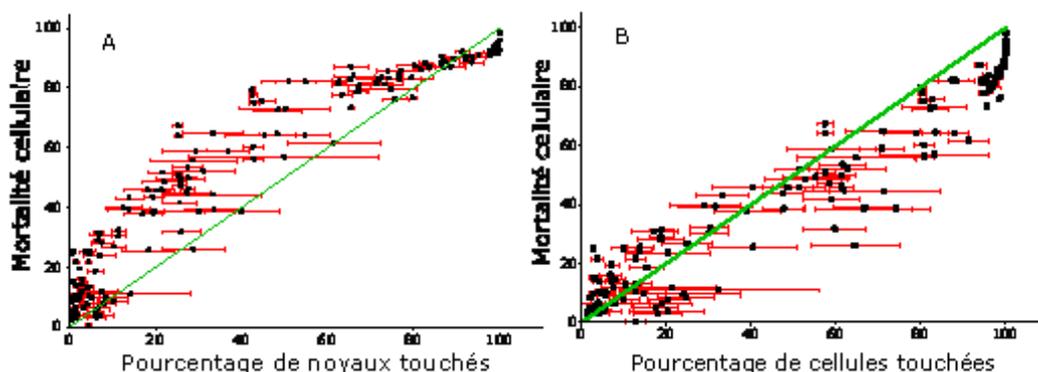


Figure 86: Mortalité des cellules Ada en fonction du pourcentage de noyaux touchés (A) ou du pourcentage de cellules touchées (B).

À la suite de cette observation, les paramètres de radiosensibilité ont été recalculés en considérant la dose déposée dans la cellule entière. Ces valeurs sont reportées dans le tableau 17. Une différence de radiosensibilité entre les cellules Ada et T2 est toujours observée. Les cellules Ada ($D_0 = 0,21 \pm 0,01$ Gy) sont plus radiosensibles que les cellules T2 ($D_0 = 0,31 \pm 0,03$ Gy). Les valeurs D_0 calculées pour la cellule entière sont proches de celles qui ont été calculées pour le noyau. En revanche, les valeurs de z_0 sont différentes lorsqu'elles sont calculées pour la cellule entière ou le noyau cellulaire. Ce paramètre dépend du nombre de coups reçus par la cible. De façon évidente, la cellule entière reçoit plus de coups que le noyau. Les valeurs de z_0 pour les cellules T2 quand l'irradiation est spécifique ($z_0 = 0,12 \pm 0,09$ Gy) et quand l'irradiation est non-spécifique ($z_0 = 0,12 \pm 0,02$ Gy) sont égales. Pour les cellules Ada, ces deux valeurs sont proches: $z_0 = 0,06 \pm 0,04$ Gy pour une irradiation spécifique et $z_0 = 0,09 \pm 0,02$ Gy pour une irradiation non-spécifique. Le nombre moyen de coups à la cellule qui conduit à une survie de 37% vaut $1,5 \pm 0,1$ pour une irradiation non-spécifique et $1,4 \pm 0,1$ pour une irradiation spécifique. Pour les cellules T2, ces valeurs sont relativement différentes quand l'irradiation est non-spécifique et quand l'irradiation est spécifique: respectivement $2,9 \pm 0,2$ and $3,7 \pm 0,2$. Ces différences sont comprises dans l'intervalle d'incertitudes inhérentes à la détermination de ces paramètres. La dose moyenne absorbée à la cellule semble être un bon index pour évaluer la survie cellulaire après une irradiation avec des particules α , quelle que soit la spécificité de l'irradiation.

		D_0 (Gy)	z_0 (Gy)	n_0
Ada	Non-spécifique	0,21	0,06	1,5
	Spécifique	0,21	0,09	1,4
T2	Non-spécifique	0,27	0,12	2,9
	Spécifique	0,31	0,12	3,7

Tableau 17: Paramètres D_0 , z_0 , et n_0 calculés pour les cellules Ada et T2 quand l'irradiation est non-spécifique ou spécifique. Les calculs ont été réalisés en considérant la cellule comme la cible critique des rayonnements.

- Mis en forme
- Mis en forme : Français
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme
- Mis en forme : Anglais (États Unis)
- Mis en forme : Français (France)

2.3 Discussion et conclusion:

Dans cette étude, notre modèle microdosimétrique a été utilisé pour analyser des données expérimentales. Le modèle biologique original mis en place a permis de moduler le nombre de complexes CMH/peptides présents à la surface des cellules qui ont été ciblés par des anticorps radiomarqués au ^{213}Bi . L'étude dosimétrique prend en compte, par conséquent, la part spécifique (pour les anticorps fixés à la surface des cellules) et la part non-spécifique de l'irradiation (pour les anticorps libres dans le surnageant) et rend possible la comparaison des résultats des différentes expériences. La survie cellulaire représentée en fonction de la dose moyenne absorbée montre une bonne homogénéité pour les 200 points expérimentaux. Cela souligne la répétabilité satisfaisante des mesures de survie cellulaire. Le plateau de la courbe pour des valeurs d'incorporation de thymidine proche de 10% et pour des doses absorbées jusqu'à 3 Gy a déjà été observé [3, 37, 38] et pourrait être la manifestation des limites techniques du test d'incorporation de thymidine. On sait qu'à la suite d'une irradiation α , une partie des cellules va connaître un arrêt dans son cycle cellulaire en phase G2/M avant de mourir. Il est possible que ces cellules incorporent alors de la thymidine. Ce reliquat serait ensuite mesuré et assimilé à une prolifération cellulaire bien que la cellule soit morte.

Mis en forme : Français
(France)

La superposition des courbes de survie en fonction de la dose moyenne absorbée dans le noyau (c'est également vrai lorsqu'on considère la cellule entière) quand l'irradiation est non-spécifique ou spécifique tend à valider biologiquement toute la chaîne de calcul dosimétrique. Dans un cas (irradiation non-spécifique), la concentration des anticorps radiomarqués libres dans le surnageant et la géométrie de l'irradiation ont été considérées pour calculer les paramètres dosimétriques pour chaque point expérimental. Dans le cas de l'irradiation spécifique, le nombre d'anticorps radiomarqués fixés à la cellule a été déterminé, ainsi que la concentration des anticorps radiomarqués libres dans le surnageant et la géométrie d'irradiation. En prenant en compte le feu croisé entre les cellules voisines, ces valeurs ont permis la détermination de la dose. Pour des doses calculées équivalents, quelle que soit la spécificité de l'irradiation, les survies cellulaires mesurées se sont avérées similaires, indiquant par conséquent la relative précision de l'étude dosimétrique. La superposition des courbes de survie est confirmée par les comparaisons des radiosensibilités microdosimétriques, z_0 . Ce résultat peut s'avérer surprenant puisque Charlton a montré que le libre parcours moyen entre deux événements létaux, qui peut être relié directement à la valeur de z_0 , étaient, pour la même lignée cellulaire, différents selon le TEL moyen des dépôts d'énergie [27]. Dans notre étude, le TEL moyen auquel l'énergie est déposée par des particules émises à la surface des cellules est proche de 60 keV/ μm . Cette valeur est proche de 90 keV/ μm lorsque les particules α sont émises dans le surnageant. Cependant, deux caractéristiques doivent être considérées dans la présente étude :

- le nombre de sites antigéniques à la surface des cellules est faible (inférieur à 30000)
- les cellules sont regroupées sous la forme d'une monocouche au fond du puits de culture pendant la majeure partie de l'irradiation.

Ces deux faits entraînent que la self-dose est faible relativement à la cross-dose et à la dose provenant du milieu. Nous avons évalué la part respective de ces doses dans la dose totale. Pour les 200 points expérimentaux, la fraction maximale de la dose totale représentée par la self-dose est égale à 12%. Le TEL moyen auquel l'énergie est déposée dans les cas d'irradiations spécifique et non-spécifique est donc proche et cela peut expliquer que l'on obtient des valeurs similaires du paramètre z_0 dans ces deux cas.

Au cours de cette étude, autour de 200 points expérimentaux ont été précisément analysés. Les nombreux paramètres nécessaires pour réaliser les calculs dosimétriques ont été caractérisés. La géométrie de l'irradiation a été observée au microscope. Les rayons des cellules et de leur noyau ont été mesurés pour un échantillon de 200 cellules pour chaque lignée cellulaire (T2 et Ada) et ont été inclus dans le calcul dosimétrique sous la forme d'une

distribution gaussienne. Le nombre de complexes CMH/peptides présents à la surface des cellules ainsi que l'affinité des deux anticorps ont été déterminés par une analyse de type Scatchard. Le taux d'internalisation de l'anticorps a été mesuré au cours du temps. Les calculs microdosimétriques ont été réalisés avec un code dont l'algorithme a été validé par comparaison un code MC. De façon surprenante, les résultats ont montré que des cellules non-touchées pouvaient être tuées. Les incertitudes concernant le pourcentage des noyaux touchés ont été évalués pour vérifier la validité de cette observation. En dépit de ces incertitudes, les résultats ont été confirmés. Certaines incertitudes n'ont pas été prises en compte dans les calculs: les incertitudes sur les mesures de l'activité spécifique et de la concentration d'anticorps ajoutés. Il s'agit d'incertitudes aléatoires et n'influencent pas les résultats dans un sens seulement (i.e. en augmentant les pourcentages des noyaux touchés). On peut également se demander si l'internalisation n'avait pas été sous-estimée. Les calculs ont été repris avec un taux d'internalisation de 15% (supérieur au taux mesuré: 11%). Une augmentation du pourcentage des noyaux touchés a été observée mais n'a pas été suffisante pour affecter la conclusion. Nous avons observé que cette surmortalité disparaît quand le pourcentage de cellules touchées est considéré, ce qui semble caractériser une réponse cellulaire à l'irradiation α .

Mis en forme : Français

Mis en forme : Français
(France)

Il n'est pas de notre ressort de donner les explications biologiques qui peuvent sous-tendre ce phénomène, mais plusieurs travaux ont déjà évoqué cette induction de signaux de mort lorsque le cytoplasme ou la membrane des cellules sont irradiés [39-40]. Une autre explication possible pour cette surmortalité observée peut être l'effet de voisinage (ou effet Bystander). Ce terme désigne les effets qui ont lieu dans les cellules qui n'ont pas été traversés par des rayonnements mais qui ont été induits par des cellules irradiées. Dans les premiers travaux faisant état de ce phénomène, des écarts ont été observés entre le pourcentage de noyaux touchés et la fréquence d'échange de chromatide (SCE) pour des cellules ovariennes de hamster chinois [41] ou des fibroblastes humains [42] exposées à de faibles doses de particules α . Ces différences n'ont pas pu être expliquées et l'existence d'un effet de voisinage a été évoqué. Depuis ces travaux, le phénomène a été observé pour différents paramètres biologiques [43-45] et en particulier pour la survie clonogénique [46, 47]. Les mécanismes de communication cellulaire n'ont pas été clairement établis mais un facteur soluble et/ou une communication intercellulaire par "gap junction" ont été évoqués [48]. Dans notre étude, de tels mécanismes n'ont pas été étudiés. Nous n'avons pas pu établir si le signal de mort cellulaire déclenché dans les cellules non-irradiées était le résultat de l'irradiation de la membrane ou du cytoplasme ou le résultat d'une communication intercellulaire. Des investigations supplémentaires sont requises.

Mis en forme : Police :Non Italique, Français

Mis en forme : Français
(France)

Mis en forme : Français
(France)

Mis en forme : Français

Mis en forme : Français
(France)

Mis en forme : Français
(France)

La mise en évidence de ce phénomène de surmortalité a été rendue possible par l'analyse microdosimétrique des données expérimentales. Dans le cadre d'une analyse macrodosimétrique, seules les doses moyennes absorbées et la valeur des paramètres D_0 auraient été calculées. Nous l'avons vu, ces paramètres ne pouvaient pas nous indiquer la présence d'une réponse cellulaire ou d'un effet Bystander. En revanche, les différences observées entre les paramètres z_0 et D_0 sont peu importantes. Ce fait peut être expliqué par la part importante de l'irradiation volumique dans la dose totale délivrée aux cellules, même lorsque l'irradiation est considérée spécifique. Ce cas a été illustré dans le chapitre IV (comparaison des courbes de survie de deux cellules comportant 0 et $2,5 \cdot 10^5$ sites).

D'un point de vue biologique, ces expériences ont montré l'importance de la spécificité de l'irradiation pour l'efficacité thérapeutique des anticorps radiomarqués. Pour une même activité ajoutée et donc, dans le cadre d'un traitement la même toxicité pour les organes sains, la spécificité de l'irradiation pourra augmenter la dose délivrée aux cellules tumorales, diminuer le pourcentage de cibles cellulaires non touchées et permettre dans certains cas de faire diminuer la survie des cellules tumorales de 20%. Ces résultats ont été obtenus pour une

cellule possédant au maximum 25 000 sites à sa surface. Le phénomène peut donc encore être amplifié avec une cellule possédant plus de sites. Ce nombre restreint de sites semble être une limitation pour une réelle efficacité de la RIT- α .

À la suite de cette observation, nous avons cherché à étudier plus précisément l'influence du nombre de sites antigéniques à la surface des cellules tumorales sur l'efficacité globale d'un traitement de RIT- α .

3 Modèle de la RIT- α :

Au cours des dernières années, La RIT- α est mise en avant pour sa capacité à contrôler et éradiquer les maladies résiduelles, après chirurgie notamment. Récemment, divers travaux ont souligné que l'échec de divers traitements anti-cancer résidait dans leur faillite à éliminer une petite sous-population de cellules tumorales caractérisées comme des cellules souches tumorales [49-55]. Ces cellules semblent moins sensibles aux agents antiprolifératifs, elles sont également moins sujettes à l'apoptose et à la reconnaissance immunitaire [56].

La grande cytotoxicité des particules α semble faire de ce rayonnement un outil de choix pour stériliser des cellules tumorales isolées ou des micrométastases résistantes.

Dans ce contexte toutefois, la toxicité envers les organes sains, et notamment la moelle qui est souvent l'organe critique pour la RIT, doit absolument être considérée pour évaluer le potentiel réel de la RIT- α .

Très récemment, Sgouros [1] a publié un travail sur ce sujet. Il a démontré la faisabilité d'une analyse théorique du potentiel de la RIT- α à l'aide d'un modèle théorique. Ces résultats ont permis d'identifier quelques paramètres critiques de la RIT- α :

- l'activité spécifique,
- la densité des sites antigéniques
- le nombre de cellules cible.

Toutefois, la modélisation réalisée n'a considéré que des cellules tumorales isolées. En outre, l'irradiation non-spécifique de ces cellules n'a pas été prise en compte. L'efficacité du traitement évalué à partir de la probabilité du contrôle tumoral (notée TCP en anglais) repose sur des calculs macrodosimétriques. La toxicité à la moelle a été estimée en considérant l'irradiation non-spécifique des cellules de la moelle osseuse rouge par les anticorps radiomarqués libres dans l'espace extracellulaire de la moelle.

En reprenant des études théoriques que nous avons déjà présentées lors du congrès de l'EANM à Athènes en 2006 et lors du symposium de Berder en 2007, nous avons cherché à compléter cette étude, à l'aide de notre modèle microdosimétrique, en évaluant l'efficacité de la RIT- α sur des agrégats de cellules représentant des micrométastases et non plus seulement des cellules isolées. L'évaluation de la toxicité à la moelle reprend la méthode adoptée par Sgouros.

3.1 Matériel et Méthodes :

3.1.1 Évaluation de l'efficacité du traitement:

Les cellules tumorales spécifiquement ciblées par le traitement de RIT- α vont être irradiées par les anticorps radiomarqués directement fixés à ces cellules et par les anticorps radiomarqués libres en solution.

Pour la première source d'irradiation (irradiation spécifique), le calcul dosimétrique impose d'évaluer le nombre de désintégrations par cellule (N_{cell}). Ce paramètre va dépendre de l'affinité de l'anticorps, du nombre de sites antigéniques présentés par les cellules, de la concentration d'anticorps dans l'environnement de la tumeur et de l'activité spécifique des anticorps radiomarqués.

En raison de la courte demi-vie du ^{213}Bi et du ciblage rapide des cellules tumorales disséminées suivant une injection intraveineuse d'anticorps radiomarqués [57], on peut faire l'hypothèse que toutes les désintégrations de l'activité administrée vont avoir lieu sur les cellules cibles. On a alors :

$$N_{cell} = \frac{C_{Ab}^{\circ} * B_{max} * AS_0 * MM_{Ab} * T_{1/2}}{C_{Ab}^{\circ} + Kd * \ln(2) * N_{Av}} \quad (5-3)$$

où C_{Ab}° représente la concentration d'anticorps, B_{max} est le nombre de sites antigéniques présentés par la cellule, Kd est l'affinité de l'anticorps, N_{Av} est le nombre d'Avogadro et MM_{Ab} est la masse molaire de l'anticorps.

Pour l'irradiation non-spécifique, on doit évaluer la concentration d'anticorps dans l'environnement des cellules tumorales. La concentration de désintégration dans la solution entourant la cellule (C_{vol}°) sera donnée par :

$$C_{vol}^{\circ} = C_{Ab}^{\circ} * \frac{AS_0 * MM_{Ab} * T_{1/2}}{\ln(2) * N_{Av}} \quad (5-4)$$

À partir de ce nombre de désintégrations à la surface de la cellule et autour de la cellule, nous avons utilisé notre modèle microdosimétrique pour évaluer la distribution $f_1(z)$ et le nombre moyen de coups reçus par le noyau des cellules (\bar{n}). Nous avons considéré plusieurs géométries : cellule isolée ou clusters de cellules de tailles variables.

La survie de chaque cellule est alors calculée :

$$SF = \exp(-\bar{n} * (1 - T_1(z_0))) \quad (5-5)$$

z_0 est la radiosensibilité microdosimétrique (comprise entre 0 et 1 Gy) et $T_1(z_0)$ est la transformée de Laplace de la distribution simple-coup d'énergie spécifique, $f_1(z)$.

L'efficacité du traitement sur un nombre variable de cellules tumorales est évaluée à travers le calcul de la probabilité de contrôle tumoral.

$$TCP = \exp\left(-\sum_{i=1}^{nb_{cells}} SF_i\right) \quad (5-6)$$

nb_{cells} représente le nombre de cellules tumorales.

3.1.2 Évaluation de la toxicité à la moelle :

La moelle, que l'on considèrera comme l'organe critique, est irradiée par les anticorps radiomarqués qui sont libres dans la circulation. On suppose qu'il n'y a pas de fixation spécifique des anticorps par les cellules de la moelle.

Le nombre d'anticorps libres dans la circulation (N_{libre}) peut être calculé en première approximation en soustrayant au nombre d'anticorps injectés, le nombre d'anticorps fixés par les cellules tumorales.

$$N_{libre} = Ab_{injecté} * \frac{N_{Av}}{MM_{Ab}} - nb_{cells} * N_{cell} \quad (5-7)$$

où $Ab_{injecté}$ est la masse d'anticorps injectés.

On fera à nouveau l'hypothèse que tous les atomes de ^{213}Bi des anticorps radiomarqués libres vont se désintégrer dans la circulation. Le nombre de désintégrations (\tilde{A}_{circ}) dans la circulation sera donc donné par :

$$\tilde{A}_{circ} = \frac{N_{libre} * AS * T_{1/2}}{\ln(2)} \quad (5-8)$$

La concentration de désintégrations peut être obtenue en divisant ce nombre par le volume de distribution de l'anticorps (V_d). En supposant le fluide extracellulaire de la moelle est en équilibre avec le volume de distribution de l'anticorps [58], on peut obtenir le nombre de désintégrations dans la moelle osseuse rouge (\tilde{A}_{MR}) :

$$\tilde{A}_{MR} = \frac{\tilde{A}_{circ} * FFEMR * V_{MR}}{V_d} \quad (5-9)$$

avec FFEMR, la fraction de la moelle osseuse rouge composée de fluide extracellulaire et V_{MR} , le volume de la moelle osseuse rouge.

On peut alors, en première approximation, calculer la dose absorbée par la moelle osseuse rouge :

$$D_{MR} = \frac{\tilde{A}_{MR} * \Delta_{\alpha} * \phi_{\alpha}}{M_{MR}} \quad (5-10)$$

où Δ_{α} est l'énergie émise par le radioélément (ici le ^{213}Bi) sous la forme de particules α , ϕ_{α} est la fraction de Δ_{α} qui est absorbée dans la moelle osseuse rouge et M_{MR} est la masse de moelle osseuse rouge.

Pour le calcul de la dose à la moelle, on suppose que les contributions des électrons et des photons sont négligeables devant la contribution des α .

3.1.3 Valeurs des différents paramètres :

Les valeurs choisies pour les différents paramètres sont données dans le tableau 18.

Paramètres	Valeur	Référence
V_d	3,8 L	[59]
V_{MR}	1,5 L	[60]
M_{MR}	1,5 kg	[60]
FFEMR	0,19	[58]

Δ_{α}	$1,33 \cdot 10^{-12}$ Gy.kg/Bq.s	[61]
ϕ_{α}	1,0 ou 0,57	[62,63]

Tableau 18: Valeurs des différents paramètres du modèle.

Pour évaluer l'impact de l'activité spécifique, de la masse d'anticorps d'injectés, de la radiosensibilité des cellules tumorales, du nombre de sites antigéniques présentés à la surface des cellules, de l'affinité de l'anticorps et du nombre de cellules tumorales, les valeurs de ces paramètres seront variables.

3.1.4 Variations des paramètres clé:

Deux paramètres peuvent être modifiés en entrée de ce modèle :

- la masse d'anticorps injectés
- l'activité spécifique des anticorps radiomarqués injectés.

Par ailleurs, le type de sites antigéniques ciblés à la surface des cellules peut être choisi en utilisant l'anticorps approprié. Chaque type antigénique sera caractérisé par sa densité d'expression (B_{max}) à la surface des cellules tumorales. Enfin, on peut choisir des anticorps de différentes affinités (K_d).

Nous avons fait varier ces quatre paramètres indépendamment et évaluer pour chaque cas la dose moyenne reçue par les cellules tumorales et les cellules de la moelle osseuse rouge. Les cellules tumorales ont été considérées isolées ou regroupées sous la forme de clusters. Dans le cas de clusters de cellules, la dose reçue décrite sera la dose la plus faible reçue par une cellule du cluster.

3.1.4.1 Variation de la masse d'anticorps injectés :

Pour ce cas, l'activité spécifique a été fixée à 440 MBq/mg et le nombre de sites présents à la surface des cellules à $2 \cdot 10^5$. Les cellules ont un rayon cellulaire, $R_{cel}=10 \mu m$ et un rayon nucléaire $R_{noy}=5 \mu m$. La masse d'anticorps injectés a varié entre 1 mg et 6 mg. Le K_d de l'anticorps vaut $1 \cdot 10^{-9}$ M.

3.1.4.2 Variation de l'activité spécifique:

Pour ce cas, la masse d'anticorps injectés a été fixée à 3 mg et le nombre de sites présents à la surface des cellules à $2 \cdot 10^5$. Les cellules ont un rayon cellulaire, $R_{cel}=10 \mu m$ et un rayon nucléaire $R_{noy}=5 \mu m$. La masse d'anticorps injectés a varié entre 1 mg et 6 mg. Le K_d de l'anticorps vaut $1 \cdot 10^{-9}$ M.

3.1.4.3 Variation de la densité antigénique à la surface des cellules:

Pour ce cas, la masse d'anticorps injectés a été fixée à 3 mg et l'activité spécifique à 440 MBq/mg. Les cellules ont un rayon cellulaire, $R_{cel}=10 \mu m$ et un rayon nucléaire $R_{noy}=5 \mu m$. La masse d'anticorps injectés a varié entre 1 mg et 6 mg. Le K_d de l'anticorps vaut $1 \cdot 10^{-9}$ M.

3.1.4.4 Variation du K_d de l'anticorps:

Pour ce cas, la masse d'anticorps injectés a été fixée à 3 mg et l'activité spécifique à 440 MBq/mg. Les cellules ont un rayon cellulaire, $R_{cel}=10 \mu m$ et un rayon nucléaire $R_{noy}=5 \mu m$. La masse d'anticorps injectés a varié entre 1 mg et 6 mg. B_{max} vaut $2 \cdot 10^5$.

3.2 Résultats :

3.2.1 Paramètres clé de la RIT- α :

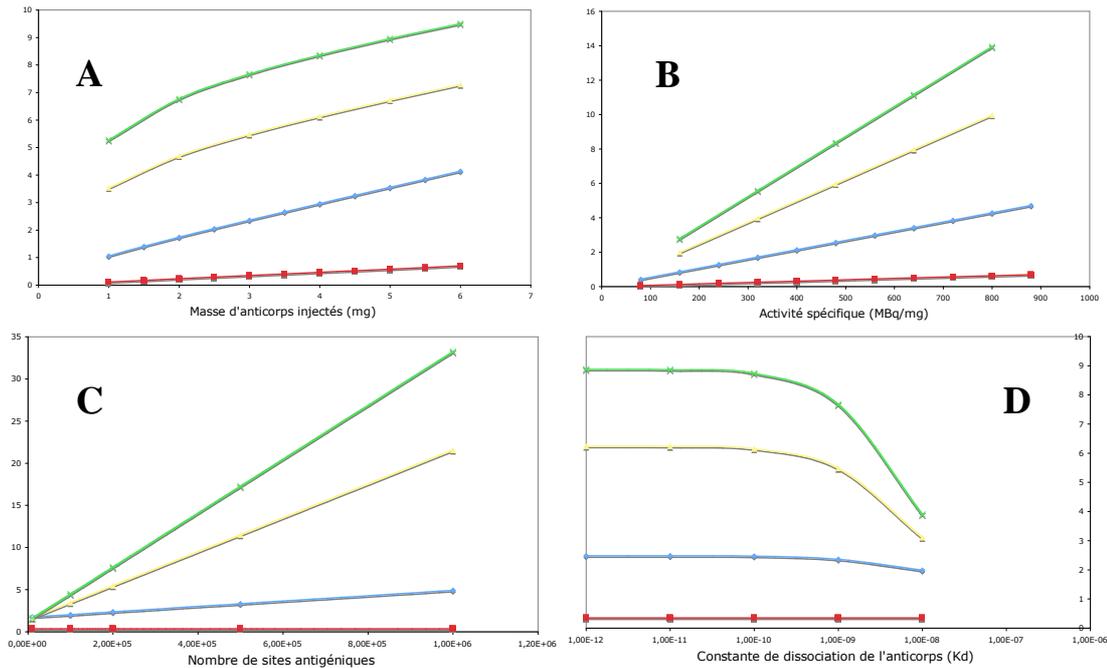


Figure 87: Dose moyenne absorbée en fonction de la masse d'anticorps injectés (A), de l'activité spécifique (B), du nombre de sites antigéniques par cellule (C) et de la constante de dissociation de l'anticorps (D). La courbe rouge représente la dose à la moelle osseuse rouge, la courbe bleue représente la dose absorbée par une cellule tumorale isolée, la courbe jaune représente la dose absorbée par une cellule d'un cluster de rayon 50 μm et la courbe verte représente la dose absorbée par une cellule d'un cluster de rayon 100 μm

La variation de deux des paramètres du ciblage, Kd et Bmax, ne modifient pas la dose délivrée aux cellules de la moelle lorsqu'ils sont modifiés. En revanche, lorsque le nombre d'antigènes à la surface des cellules tumorales est multiplié par deux, la dose délivrée à ces cellules sera également multipliée par deux dans le cas d'une cellule isolée et par un facteur supérieur, dépendant du nombre de cellules composant le cluster, dans le cas d'un cluster de cellules tumorales (on suppose une pénétration complète de l'anticorps). L'utilisation d'un anticorps de forte affinité augmentera également la dose délivrée aux cellules tumorales.

Dans les cas où l'on modifie la masse d'anticorps injectés et l'activité spécifique de l'anticorps, la dose délivrée aux cellules de la moelle augmentera, toutefois moins vite que la dose délivrée aux cellules tumorales. En effet cette dernière va augmenter en fonction du nombre de désintégrations « non-spécifiques » (ayant lieu dans la solution baignant les

cellules tumorales) mais aussi du nombre de désintégration ayant lieu à sa surface. Or ces deux paramètres vont augmenter avec la masse d'anticorps injectés et l'activité spécifique. Pour limiter la toxicité d'un traitement de RIT- α et assurer son efficacité, il conviendra donc de choisir une cible antigénique très présente à la surface des cellules tumorales et d'utiliser un anticorps très affiné. La masse d'anticorps injectés et l'activité spécifique devront être ajustés afin de ne pas dépasser une dose à la moelle acceptable.

3.2.2 Nombre minimal de sites antigéniques présents à la surface des cellules tumorales pour atteindre un TCP de 0,9 :

La seconde étape de ce travail a consisté à évaluer le nombre minimum de sites antigéniques présents à la surface des cellules tumorales pour atteindre un TCP de 0,9. L'étude sur les complexes CMH/peptides a montré que la présence de 20 000 sites à la surface des cellules ne semblait pas suffisant pour obtenir une bonne efficacité du traitement de RIT- α . Or la cible antigénique est un des premiers paramètres choisis lorsque l'on débute le développement d'un radioimmunoconjugué. Il semble donc important de préciser comment l'importance de sa représentation à la surface des cellules tumorales va influencer l'efficacité de la RIT- α . Lors de ce calcul, la quantité d'anticorps injectés (8 mg), l'activité spécifique (800 MBq/mg) et l'affinité de l'anticorps ($K_d=1 \cdot 10^{-10}$ M) ont été fixés. Ce K_d correspond à un anticorps très affiné. En outre, les valeurs citées de la quantité d'anticorps injectés et de l'activité spécifique sont très élevées. Ce choix nous permet d'évaluer un cas très favorable pour l'efficacité du traitement et donc d'estimer les valeurs minimales du nombre de sites antigéniques requis pour atteindre un TCP de 0,9. La toxicité correspondant à cette quantité d'anticorps injectés et cette activité spécifique sera, a priori, importante puisque la dose délivrée à la moelle sera $D=1,89$ Gy soit une dose équivalente de 9,45 Sv si l'on prend en compte une EBR des particules α valant 5. Nous n'avons pas pu relier cette dose à un grade de toxicité pour la moelle. Les études sur ce sujet donnent des valeurs de dose très variables et qui ne sont pas corrélées à un effet toxique particulier [64, 65].

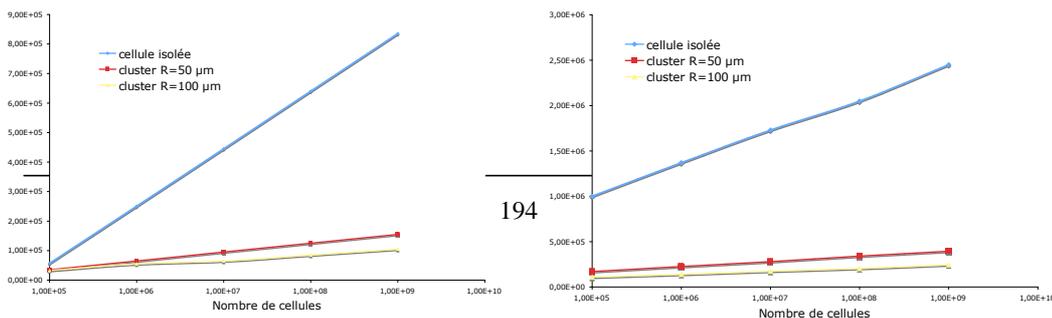


Figure 88: Nombre de sites antigéniques nécessaires pour atteindre un TCP de 0,9 en fonction du nombre de cellules tumorales. Le nombre de sites a été évalué pour deux radiosensibilités différentes des cellules tumorales: $z_0=0,5$ Gy (gauche) et $z_0=1$ Gy (droite). Les trois courbes représentent les cas où les cellules tumorales sont isolées (bleu) ou regroupées sous la forme de clusters de 50 μm de rayon (rouge) ou de 100 μm de rayon (jaune).

La figure 88 montre que l'efficacité du traitement et donc le nombre nécessaire de sites antigéniques à la surface des cellules vont dépendre de l'importance de la masse tumorale (nombre de cellules). Pour une cellule de radiosensibilité moyenne ($z_0=0,5$ Gy), la stérilisation des cellules tumorales nécessitera plus de sites à la surface des cellules si celles-ci sont isolées. Pour atteindre un TCP de 0,9, lorsque la masse tumorale est composée d'un milliard de cellules, plus de 800 000 sites antigéniques seront nécessaires à la surface des cellules. Si les cellules tumorales sont regroupées sous la forme de clusters de rayon 50 μm ou 100 μm , le nombre de sites antigéniques requis pour atteindre un TCP de 0,9 sera plus faible ($1,5 \cdot 10^5$ et $1 \cdot 10^5$ respectivement) en raison du feu croisé. Si le nombre de cellules tumorales est égal à un million, le nombre de sites antigéniques nécessaires sera de $2,5 \cdot 10^5$ pour une cellule isolée, $6,5 \cdot 10^4$ pour un cluster de rayon 50 μm , $5,5 \cdot 10^4$ pour un cluster de rayon 100 μm .

Ce résultat va dépendre fortement de la radiosensibilité des cellules. Pour une cellule plus radiorésistante ($z_0=1$ Gy), le nombre de sites antigéniques requis pour atteindre un TCP de 0,9 sera beaucoup plus élevé. Pour un milliard de cellules tumorales, le nombre de sites antigéniques nécessaires sera de $2,45 \cdot 10^6$ pour une cellule isolée, $3,95 \cdot 10^5$ pour un cluster de rayon 50 μm , $2,45 \cdot 10^5$ pour un cluster de rayon 100 μm . Pour un million de cellules tumorales, le nombre de sites antigéniques nécessaires sera de $1,37 \cdot 10^6$ pour une cellule isolée, $2,25 \cdot 10^5$ pour un cluster de rayon 50 μm , $1,4 \cdot 10^5$ pour un cluster de rayon 100 μm .

Pour une cellule isolée, il sera donc très difficile de contrôler la totalité de la masse tumorale. On atteint ici les limites de la RIT- α .

Nous nous sommes également intéressés à la pénétration partielle de l'anticorps dans les sphéroïdes de cellules. Pour le cluster de rayon 100 μm , nous avons simulé une pénétration de l'anticorps limitée à la périphérie de cet amas cellulaire. Seules les cellules comprises dans une couche externe d'épaisseur 20 μm seront marquées. Nous avons repris le calcul du TCP et estimé le nombre de sites antigéniques nécessaires pour une bonne efficacité du traitement (TCP=0,9).

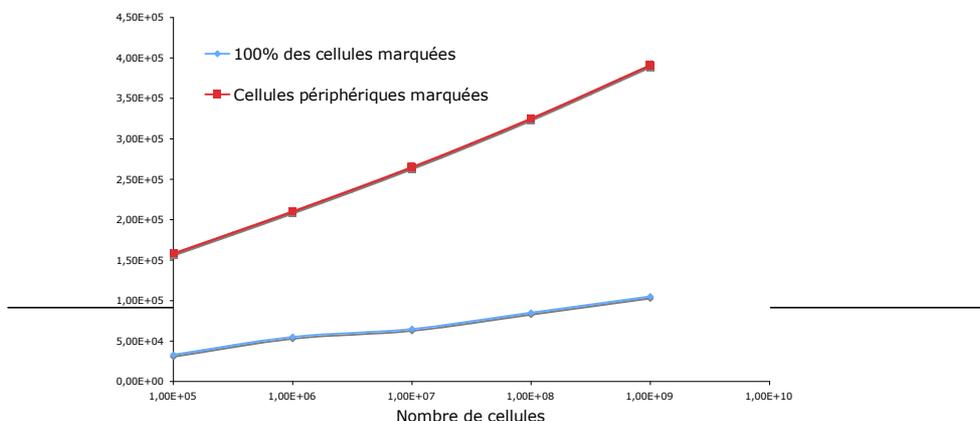


Figure 89: Nombre de sites antigéniques nécessaires pour atteindre un TCP de 0,9 en fonction du nombre de cellules tumorales. Le nombre de sites a été évalué pour une radiosensibilité des cellules tumorales: $z_0=0,5$ Gy. Le calcul a été effectué en considérant que les cellules tumorales sont regroupées sous la forme de clusters de $100 \mu\text{m}$ de rayon. Les deux courbes représentent les cas où 100% des cellules tumorales sont marquées et où seules les cellules en périphérie du cluster sont marquées.

La figure 89 montre que l'efficacité du traitement de RIT- α sera diminuée de façon importante lorsque l'anticorps ne pénètre que partiellement dans un sphéroïde tumoral. Pour un milliard de cellules, le nombre de sites antigéniques requis sera multiplié par 4 ($1 \cdot 10^5$ lorsque toutes les cellules du cluster sont marquées, $4 \cdot 10^5$ lorsque seules les cellules externes du cluster sont marquées).

3.3 Discussion - Conclusion :

La très forte cytotoxicité des particules α est attractive dans le cadre de la RIT, notamment pour éliminer des cellules tumorales radiorésistantes qui sont insensibles à d'autres types de traitement. Toutefois, l'administration systémique de ces agents très toxiques doit être réalisée avec précaution afin de préserver les organes sains. Le court parcours des particules α est, dans ce contexte un avantage. En l'absence de fixation spécifique sur des antigènes des cellules des tissus sains, les anticorps radiomarqués par des émetteurs α resteront dans le système circulatoire sanguin et lymphatique et l'irradiation des organes sains sera donc limitée. L'organe critique pour la toxicité du traitement sera, comme très souvent dans le cadre de la RIT, la moelle osseuse. L'efficacité de la RIT- α , et de la RIT en général, doit donc être envisagé comme l'effet différentiel entre la toxicité à l'encontre des cellules tumorales et la toxicité à l'égard des cellules des tissus sains, et plus particulièrement des cellules de la moelle. Le modèle mathématique simple, inspiré du travail de Sgouros [1] permet de prendre en compte ces deux aspects du traitement de RIT- α . L'évaluation de la toxicité à la moelle est difficile. Les cellules de la moelle sont en effet disséminées dans le corps humains et il a été montré que seule une partie de ces cellules étaient sensibles aux rayonnements [62]. Il est donc pour l'instant difficile de relier la dose déposée dans la moelle, ou d'autres paramètres dosimétriques, à un grade de toxicité. Le modèle ne considère donc que la dose à la moelle. Cette étude a tout d'abord comparé l'influence de quatre paramètres (activité spécifique, quantité d'anticorps injectés, affinité de l'anticorps, densité antigénique à la surface des cellules) sur la dose délivrée aux cellules tumorales et la dose délivrée aux cellules de la moelle. Deux paramètres peuvent faire augmenter la dose aux cellules tumorales sans modifier la dose aux cellules de la moelle : l'affinité de l'anticorps, la densité antigénique à la surface des cellules. Il convient donc pour la RIT- α d'utiliser des anticorps les plus affins possible. On ne peut pas, en revanche, modifier la densité antigénique à la surface des cellules tumorales. Toutefois, les cellules tumorales possèdent souvent plusieurs types d'antigènes, plusieurs marqueurs. Il faudra donc veiller à choisir l'antigène le plus représenté, en vérifiant évidemment qu'il est relativement spécifique de la tumeur. Si l'on augmente les deux autres paramètres, la dose aux cellules tumorales augmentera mais la dose à la moelle également.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer le nombre minimal de sites antigéniques permettant une certaine efficacité de la RIT. Nous sommes placés dans un cas extrême où la dose à la moelle est très élevée (certainement toxique) et où l'anticorps est très affiné. Cela représente donc le cas où l'on peut injecter un nombre maximal d'atomes radioactifs dans le corps du patient et où l'anticorps va se fixer de façon quasi idéale sur les

cellules tumorales. Le facteur limitant de l'efficacité de la RIT est alors le nombre de sites antigéniques à la surface des cellules.

Pour éliminer 1 milliard de cellules tumorales, si les cellules sont isolées celles-ci devront alors posséder 800 000 sites ou 2,5 millions de sites, si la cellule est radiorésistante pour que le traitement soit efficace. Ces valeurs excluent une gamme importante d'antigènes envisagés dans le cadre de la RIT. Les cellules du myélome multiple décrites en début de chapitre ne présentent par exemple que 300 000 antigènes de type syndécan-1 à leur surface. On approche là une limite importante de la RIT- α . Si ces cellules sont regroupées sous la forme de clusters, le feu croisé permettra d'envisager le ciblage d'un antigène moins représenté. En revanche, la pénétration partielle des anticorps dans les amas cellulaires limitera de façon importante l'efficacité de la RIT. Si l'on considère que seules les cellules situées dans la périphérie d'une micrométastase peuvent fixer des anticorps radiomarqués, le nombre de sites requis pour assurer l'efficacité du traitement pourra être multiplié par 4.

A la vue de ces résultats, il semble que l'utilisation d'un cocktail d'anticorps radiomarqués, ciblant différents récepteurs présents à la surface des cellules tumorales soit nécessaire pour améliorer l'efficacité de la RIT- α .

Cette étude met donc en avant trois paramètres essentiels de la réussite d'un traitement, si l'on exclut les paramètres cités au début de cette partie :

- la géométrie de la tumeur (cellules isolées, micrométastases, nombre de cellules tumorales),
- la radiorésistance des cellules tumorales,
- les caractéristiques de la fixation des anticorps aux cellules.

Ces paramètres seront difficiles à caractériser *in vivo*. La résolution de l'imagerie traditionnelle est insuffisante pour fournir ce genre d'informations.

La simplicité de ce modèle notamment dans son traitement de la toxicité à la moelle ne permet pas de cerner entièrement le problème. La moelle est un organe complexe et les études dosimétriques sur la toxicité de la RIT sont encore trop peu nombreuses pour pouvoir la modéliser précisément. Ce modèle est un modèle statique qui suppose la diffusion et la fixation instantanée de l'anticorps sur les cellules tumorales. Il s'applique assez bien au ^{213}Bi qui possède une période très courte. Pour d'autres radioéléments et notamment l' ^{211}At dont la période est plus longue, un modèle dynamique sera nécessaire. Enfin, la pénétration des anticorps dans les micrométastases doit être mieux caractérisée.

Cette étude est un exemple des possibilités offertes par la dosimétrie cellulaire. Le modèle mathématique permet d'envisager le problème de la RIT- α dans sa globalité et de quantifier l'importance de certains paramètres limitants. Nous pensons que ces études peuvent fournir des informations utiles sur les voies d'optimisation possibles des traitements de RIT- α .

Bibliographie

1. G. Sgouros and H. Song, Cancer stem cell targeting using the alpha-particle emitter, ^{213}Bi : mathematical modeling and feasibility analysis. *Cancer Biother Radiopharm* **23**, 74-81 (2008).
2. R. Bataille and J. L. Harousseau, Multiple myeloma. *N Engl J Med* **336**, 1657-1664 (1997).
3. S. Supiot, A. Faivre-Chauvet, O. Couturier, M. F. Heymann, N. Robillard, F. Kraeber-Bodere, L. Morandau, M. A. Mahe and M. Cherel, Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer* **94**, 1202-1209 (2002).
4. P. R. Salacinski, C. McLean, J. E. Sykes, V. V. Clement-Jones and P. J. Lowry, Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal Biochem* **117**, 136-146 (1981).
5. J. S. Hendricks, MCNPX extensions version 2.5.0. LA-UR-04-0570, Los Alamos National Laboratory, 2004.
6. ICRP Publication 38, Radionuclide Transformations : Energy and Intensity of Emissions. Annals of the ICRP 11-13. Oxford : Pergamon Press (1983).
7. S. M. Goddu, R. W. Howell, L. G. Bouchet, W. E. Bolch, D. V. Rao, MIRD Cellular S

Values: Self-absorbed Dose per Unit Cumulated Activity for Selected Radionuclides and Monoenergetic Electron and Alpha Particle Emitters Incorporated into Different Cell Compartments. Reston, VA. Society of Nuclear Medicine (1997).

8. S. Supiot, Radioimmunothérapie alpha du myélome multiple. Thèse de doctorat (2005).
9. S. Palm, T. Back, I. Claesson, U. Delle, R. Hultborn, L. Jacobsson, I. Kopf and S. Lindegren, Effects of the alpha-particle emitter At-211 and low-dose-rate gamma-radiation on the human cell line Colo-205 as studied with a growth assay. *Anticancer Res* **18**, 1671-1676 (1998).
10. S. G. Martin, R. C. Miller, C. R. Geard and E. J. Hall, The biological effectiveness of radon-progeny alpha particles. IV. Morphological transformation of Syrian hamster embryo cells at low doses. *Radiat Res* **142**, 70-77 (1995).
11. M. R. Raju, Y. Eisen, S. Carpenter and W. C. Inkret, Radiobiology of alpha particles. III. Cell inactivation by alpha-particle traversals of the cell nucleus. *Radiat Res* **128**, 204-209 (1991).
12. N. A. Zyuzikov, K. M. Prise, M. Z. Zdzienicka, H. C. Newman, B. D. Michael and K. R. Trott, The relationship between the RBE of alpha particles and the radiosensitivity of different mutations of Chinese hamster cells. *Radiat Environ Biophys* **40**, 243-248 (2001).
13. E. Aurlien, R. H. Larsen, G. Akabani, D. R. Olsen, M. R. Zalutsky and O. S. Bruland, Exposure of human osteosarcoma and bone marrow cells to tumour-targeted alpha-particles and gamma-irradiation: analysis of cell survival and microdosimetry. *Int J Radiat Biol* **76**, 1129-1141 (2000).
14. M. T. Azure, R. D. Archer, K. S. Sastry, D. V. Rao and R. W. Howell, Biological effect of lead-212 localized in the nucleus of mammalian cells: role of recoil energy in the radiotoxicity of internal alpha-particle emitters. *Radiat Res* **140**, 276-283 (1994).
15. E. Aurlien, Y. Kvinnsland, R. H. Larsen and O. S. Bruland, Radiation doses to non-Hodgkin's lymphoma cells and normal bone marrow exposed in vitro. Comparison of an alpha-emitting radioimmunoconjugate and external gamma-irradiation. *Int J Radiat Biol* **78**, 133-142 (2002).
16. R. H. Larsen, O. S. Bruland, P. Hoff, J. Alstad, T. Lindmo and E. K. Rofstad, Inactivation of human osteosarcoma cells in vitro by 211At-TP-3 monoclonal antibody: comparison with astatine-211-labeled bovine serum albumin, free astatine-211 and external-beam X rays. *Radiat Res* **139**, 178-184 (1994).
17. R. W. Howell, M. T. Azure, V. R. Narra and D. V. Rao, Relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo at low doses. *Radiat Res* **137**, 352-360 (1994).
18. J. Elgqvist, P. Bernhardt, R. Hultborn, H. Jensen, B. Karlsson, S. Lindegren, E. Warnhammar and L. Jacobsson, Myelotoxicity and RBE of 211At-conjugated monoclonal antibodies compared with 99mTc-conjugated monoclonal antibodies and 60Co irradiation in nude mice. *J Nucl Med* **46**, 464-471 (2005).
19. S. H. Kurtzman, A. Russo, J. B. Mitchell, W. DeGraff, W. F. Sindelar, M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, A. M. Friedman, J. J. Hines, et al., 212Bismuth linked to an antipancreatic carcinoma antibody: model for alpha-particle-emitter radioimmunotherapy. *J Natl Cancer Inst* **80**, 449-452 (1988).
20. J. D. Shadley, J. L. Whitlock, J. Rotmensch, R. W. Atcher, J. Tang and J. L. Schwartz, The effects of radon daughter alpha-particle irradiation in K1 and xrs-5 CHO cell lines. *Mutat Res* **248**, 73-83 (1991).
21. D. J. Chen, K. Tsuboi, T. Nguyen and T. C. Yang, Charged-particle mutagenesis II. Mutagenic effects of high energy charged particles in normal human fibroblasts. *Adv Space Res* **14**, 347-354 (1994).
22. M. Durante, G. F. Grossi, G. Gialanella, M. Pugliese, M. Nappo and T. C. Yang,

- Effects of alpha-particles on survival and chromosomal aberrations in human mammary epithelial cells. *Radiat Environ Biophys* **34**, 195-204 (1995).
23. D.R. Fisher, The microdosimetry of monoclonal antibodies labeled with alpha emitters. Proceedings of the fourth international radiopharmaceutical dosimetry symposium, Oak Ridge, TN, eds. Schlafke-Stelson AT, Watson EE, Oak Ridge Assoc. Univ., TN, CONF-851113, 1767-1773 (1986).
24. R. H. Larsen, G. Akabani, P. Welsh and M. R. Zalutsky, The cytotoxicity and microdosimetry of astatine-211-labeled chimeric monoclonal antibodies in human glioma and melanoma cells in vitro. *Radiat Res* **149**, 155-162 (1998).
25. J. L. Humm, A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **13**, 1767-1773 (1987).
26. W. C. Roesch, Microdosimetry of internal sources. *Radiat Res* **70**, 494-510 (1977).
27. D. E. Charlton and M. S. Turner, Use of chord lengths through the nucleus to simulate the survival of mammalian cells exposed to high LET alpha-radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **69**, 213-217 (1996).
28. T. K. Hei, L. J. Wu, S. X. Liu, D. Vannais, C. A. Waldren and G. Randers-Pehrson, Mutagenic effects of a single and an exact number of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3765-3770 (1997).
29. J. M. Nelson, A. L. Brooks, N. F. Metting, M. A. Khan, R. L. Buschbom, A. Duncan, R. Miick and L. A. Braby, Clastogenic effects of defined numbers of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells. *Radiat Res* **145**, 568-574 (1996).
30. M. Pugliese, M. Durante, G. F. Grossi, F. Monforti, D. Orlando, A. Ottolenghi, P. Scampoli and G. Gialanella, Inactivation of individual mammalian cells by single alpha-particles. *Int J Radiat Biol* **72**, 397-407 (1997).
31. C. Soyland and S. P. Hassfjell, Survival of human lung epithelial cells following in vitro alpha-particle irradiation with absolute determination of the number of alpha-particle traversals of individual cells. *Int J Radiat Biol* **76**, 1315-1322 (2000).
32. T. G. Stinchcomb, C. Soyland, S. P. Hassfjell, J. Westman, S. J. Wang, J. L. Whitlock, R. C. Reba, J. Rotmensch and J. C. Roeske, Binary methods for the microdosimetric analysis of cell survival data from alpha-particle irradiation. *Cancer Biother Radiopharm* **18**, 481-487 (2003).
33. T. G. Stinchcomb, S. J. Wang and J. C. Roeske, Simulation of binary methods for the microdosimetric analysis of cell survival after alpha-particle irradiation: ability to distinguish between different models. *Radiat Res* **162**, 585-591 (2004).
34. K. Bernardeau, S. Gouard, G. David, A. L. Ruellan, A. Devys, J. Barbet, M. Bonneville, M. Cherel and F. Davodeau, Assessment of CD8 involvement in T cell clone avidity by direct measurement of HLA-A2/Mage3 complex density using a high-affinity TCR like monoclonal antibody. *Eur J Immunol* **35**, 2864-2875 (2005).
35. J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, I. M. Belyakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik and J. C. Morris, Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* **113**, 1515-1525 (2004).
36. W. M. Rigal, Uptake and incorporation of tritiated thymidine in in vitro culture. *Nature* **192**, 768 (1961).
37. M. Miederer, C. Seidl, G. J. Beyer, D. E. Charlton, S. Vranjes-Duric, J. J. Comor, R. Huber, T. Nikula, C. Apostolidis, et al., Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, terbium-149 and bismuth-213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-cadherin adhesion protein. *Radiat Res* **159**, 612-620 (2003).
38. P. R. Twentyman, G. A. Walls and K. A. Wright, The response of tumour cells to radiation and cytotoxic drugs--a comparison of clonogenic and isotope uptake assays. *Br J Cancer* **50**, 625-631 (1984).

39. J. P. Pouget and S. J. Mather, General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.* **28**, 541-561 (2001).
40. M. Cherel, F. Davodeau, F. Kraeber-Bodere and J. F. Chatal, Current status and perspectives in alpha radioimmunotherapy. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **50**, 322-329 (2006).
41. S. Supiot, S. Gouard, J. Charrier, C. Apostolidis, J. F. Chatal, J. Barbet, F. Davodeau and M. Cherel, Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7047s-7052s (2005).
42. H. Nagasawa and J. B. Little, Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* **52**, 6394-6396 (1992).
43. A. Deshpande, E. H. Goodwin, S. M. Bailey, B. L. Marrone and B. E. Lehnert, Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat. Res.* **145**, 260-267 (1996).
44. A. W. Hickman, R. J. Jaramillo, J. F. Lechner and N. F. Johnson, Alpha-particle-induced p53 protein expression in a rat lung epithelial cell strain. *Cancer Res.* **54**, 5797-5800 (1994).
45. S. A. Lorimore, M. A. Kadhim, D. A. Pocock, D. Papworth, D. L. Stevens, D. T. Goodhead and E. G. Wright, Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 5730-5733 (1998).
46. H. Zhou, G. Randers-Pehrson, C. A. Waldren, D. Vannais, E. J. Hall and T. K. Hei, Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 2099-2104 (2000).
47. C. Mothersill and C. Seymour, Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 421-427 (1997).
48. S. G. Sawant, W. Zheng, K. M. Hopkins, G. Randers-Pehrson, H. B. Lieberman and E. J. Hall, The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. *Radiat. Res.* **157**, 361-364 (2002).
49. T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, **367**:645 (1994).
50. M. Al Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:3983 (2003).
51. S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**:396 (2004).
52. M. Balic, H. Lin, L. Young, *et al.* Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* **12**:5615 (2006).
53. M. S. Wicha, Cancer stem cells and metastasis: Lethal seeds—commentary. *Clin Cancer Res* **12**:5606 (2006).
54. T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105 (2001).
55. M. Al Hajj, M. W. Becker, M. Wichal, *et al.* Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **14**:43 (2004).
56. R. T. Costello, F. Mallet, B. Gaugler, *et al.* Human acute myeloid leukemia CD34(+)/CD38(-) progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *CancerRes* **60**:4403 (2000).
57. H. Song, K. Shahverdi, J. Fox, *et al.* Targeting HER2/neu expressing micrometastases in HER2/neu transgenic mice using alpha-particle-emitting monoclonal antibody [(BI)-B-213-

- 7.16.4]. *Cancer Biother Radiopharm* **21**:396 (2006).
58. G. Sgouros, Bone marrow dosimetry for radioimmunotherapy: Theoretical considerations. *J Nucl Med* **34**:689 (1993).
59. G. Sgouros, M. C. Graham, C. R. Divgi, *et al.* Modeling and dosimetry of monoclonal antibody M195 (anti-CD33) in acute myelogenous leukemia. *J Nucl Med* **34**:422 (1993).
60. W. S. Snyder, M.J. Cook, E. S. Nasset, *et al.* Report of the task group on reference man, ICRP publication 23. Elmsford, NY. International Commission on Radiological Protection (1975).
61. G. Sgouros, A. M. Ballangrud, J. G. Jurcic, *et al.* Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle-emitter labeled antibody: ²¹³Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. *J Nucl Med* **40**:1935 (1999).
62. C. J. Watchman, D. W. Jokisch, P. W. Patton PW, *et al.* Absorbed fractions for alpha-particles in tissues of trabecular bone: Considerations of marrow cellularity within the ICRP reference male. *J Nucl Med* **46**:1171 (2005).
63. G. Sgouros, W. E. Bolch, A. Shah, *et al.* Relative biological effectiveness for efficacy and toxicity in leukemia patients of the alpha-particle emitter, bismuth-213. *Cancer Biother Radiopharm* **21**:397 (2006).
64. B. W. Wessels, W. E. Bolch, L. G. Bouchet, H. B. Breitz, G. L. Denardo, R. F. Meredith, M. G. Stabin and G. Sgouros, Bone marrow dosimetry using blood-based models for radiolabeled antibody therapy: a multiinstitutional comparison. *J Nucl Med* **45**, 1725-1733 (2004).
65. J. G. Jurcic, S. M. Larson, G. Sgouros, M. R. McDevitt, R. D. Finn, C. R. Divgi, A. M. Ballangrud, K. A. Hamacher, D. Ma, *et al.*, Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* **100**, 1233-1239 (2002).

Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis le développement d'un modèle microdosimétrique complet qui calcule les distributions d'énergie spécifique au niveau d'une cellule biologique ou de son noyau. Ce modèle repose sur une méthode de calcul analytique. Les dépôts d'énergie de la particule α dans la matière sont évalués en utilisant les approximations du ralentissement continu et du parcours rectiligne. C'est un outil de calcul très rapide qui peut simuler l'ensemble des situations d'irradiation rencontrées lors d'expérimentations *in vitro*. Un modèle radiobiologique, inclus dans le logiciel, permet de déterminer, à partir des spectres microdosimétriques calculés, la toxicité d'une irradiation.

L'algorithme de ce modèle a été validé lors d'une étude comparative avec deux codes Monte-Carlo généralistes : MCNPX et Geant4. Les spectres microdosimétriques calculés se superposent de façon satisfaisante pour tous les cas étudiés. Cette étude a mis en évidence que les fluctuations statistiques des dépôts d'énergie le long du parcours de la particule (straggling) et la production de rayonnement delta - deux éléments non pris en compte par notre modèle - n'avaient que peu d'influence sur la forme des distributions d'énergie spécifique. Elle a également souligné le gain important en termes de temps de calcul que permet notre algorithme basé sur une méthode analytique. Un facteur supérieur à 3 000 sépare les temps de calculs de notre modèle et les temps de calculs de la méthode Monte-Carlo.

Le domaine d'emploi de la microdosimétrie dans le cadre d'expériences d'irradiations cellulaires a été caractérisé. Il est défini par le critère de Kellerer et va dépendre de la taille de la cible considérée et de la dose absorbée par cette cible. L'intervalle de dose correspondant s'étend de 15 Gy à 2,8 Gy pour des noyaux cellulaires dont le rayon est compris entre 2 μm et 9 μm respectivement. Un second critère a été défini au cours de ce travail. Il vise à préciser le domaine pour lequel la microdosimétrie a un intérêt par rapport à la microdosimétrie pour la prédiction de la survie cellulaire. Ce domaine dépend de la taille de la cellule considérée, de la radiosensibilité de cette cellule et de la géométrie de l'irradiation.

Pour une cellule isolée, dont la radiosensibilité est faible ($z_0=1$ Gy), la microdosimétrie est recommandée lorsque le rayon du noyau de ces cellules est inférieur à 6 μm . Lorsque les cellules sont regroupées sous la forme de cluster, l'intérêt de la microdosimétrie pour le calcul de la survie cellulaire est plus grand. Pour des clusters de faibles rayons (< 50 μm), cette méthode est recommandée quelle que soit la taille de la cellule. Pour des clusters plus grands, elle s'avère indispensable lorsque le rayon du noyau de ces cellules est inférieur à 6 μm .

L'impact d'une distribution log-normale de l'activité au niveau cellulaire a également été évalué. Pour une cellule isolée, les courbes de survie vont être modifiées et ne seront plus linéaires. Des variations du taux de survie, pouvant atteindre 20%, seront observées si l'on tient compte de cette distribution.

Pour des clusters de cellules, il n'est pas utile de considérer cette distribution log-normale de l'activité fixée au sein d'une population cellulaire. Elle n'entraîne pas d'écart de survie important. Les hétérogénéités spatiales de la distribution de l'activité vont, en revanche, beaucoup influencer la survie cellulaire à l'intérieur d'un cluster. Les courbes de survie ne seront à nouveau plus linéaires. Ces hétérogénéités pourront, pour une même dose au sphéroïde, faire diminuer la toxicité du traitement de plus de 10%.

Le modèle a été appliqué à l'analyse des résultats de deux groupes d'expériences réalisées au sein du laboratoire.

La première série d'expériences a porté sur l'irradiation de cellules du cancer du myélome multiple par des anticorps radiomarqués par des émetteurs α et β . Une irradiation externe au

^{60}Co a permis, en outre, le calcul de l'EBR des particules γ et β . Cet EBR a été évalué à 0,9 pour les particules β et est compris entre 3 et 13 pour les particules α .

La seconde série d'expérience a mis en évidence l'augmentation de l'efficacité d'une irradiation α lorsque la spécificité de cette irradiation augmente. Cet effet a été expliqué par notre modèle. Lorsque la spécificité de l'irradiation est amplifiée, la dose moyenne absorbée reçue par les cellules va augmenter. Cela va se traduire par une diminution rapide du pourcentage des cellules qui ne sont traversées par aucune particule γ lors de l'irradiation.

Les courbes de survie des cellules irradiées non spécifiquement (par les anticorps radiomarqués restés libres en solution) et des cellules irradiées plus spécifiquement (i.e. une partie de l'activité va venir se fixer à la surface de ces cellules) se superposent lorsque la survie est représentée en fonction de la dose moyenne absorbée. Cette observation semble valider l'ensemble de l'étude dosimétrique : de la caractérisation des différents paramètres biologiques d'intérêt à la méthode de calcul dosimétrique.

Le calcul microdosimétrique a montré qu'une partie, parfois importante (jusqu'à 40%), des cellules tuées lors de cette irradiation, n'était pas traversée par une seule particule γ au niveau du noyau. En revanche, nous avons montré que le cytoplasme de ces cellules était traversé par des particules γ . Ce phénomène, mis à jour par le calcul microdosimétrique, semble indiquer une réponse cytoplasmique ou membranaire à l'irradiation α . Il peut également résulter d'un effet Bystander.

Une dernière étude a montré la faisabilité de la modélisation globale de l'administration d'un traitement de RIT- γ . Ce modèle simple permet d'évaluer l'efficacité d'anticorps radiomarqués au ^{213}Bi pour le traitement de cellules tumorales isolées ou de micrométastases mais aussi la toxicité relative à la moelle. Ce travail a mis en évidence l'importance de la densité de l'antigène ciblé à la surface des cellules tumorales pour le succès de la RIT- γ . Ce paramètre est un facteur limitant du succès d'un traitement de la RIT- γ et nous avons montré que cibler un antigène ou un marqueur cellulaire dont la densité est inférieure à 50 000 sites par cellule sera certainement inefficace. Cette valeur sera modulée de façon importante par le taux de pénétration des anticorps dans les micrométastases.

La microdosimétrie permet une modélisation phénoménologique des effets d'une irradiation. Nous avons étudié cette méthode car elle semblait appropriée dans un contexte d'applications cliniques ou pré-cliniques de la RIT- γ . La prise en compte de la variabilité statistique des dépôts d'énergie dans les cellules apparaissait essentielle pour étudier l'action de particules de haut TEL, ayant un faible parcours dans la matière. Cette étude avait deux buts : mieux comprendre les effets des particules γ sur les cellules biologiques et analyser les limitations et optimisations possibles de la RIT- α .

Ce travail de thèse a montré que, dans certaines situations, la microdosimétrie permet une meilleure modélisation de survie que la macrodosimétrie. Elle s'avère donc être un outil très utile dans la prédiction de l'efficacité d'un traitement. Toutefois, l'analyse de données expérimentales a montré que les incertitudes pesant sur la détermination de paramètres biologiques indispensables au calcul dosimétrique étaient une limite à son application pratique. En outre, une analyse mécanistique des effets des particules γ sur la survie des cellules semble requise pour préciser les paramètres dosimétriques pertinents à utiliser dans l'étude de la relation dose/effets. Il n'est pas encore clair, dans le cas d'une irradiation α , que la dose soit un paramètre plus approprié que le nombre de coups reçus par une cellule ou

l'énergie déposée dans cette cellule. Il convient également de mieux préciser l'action des particules α sur les molécules situées dans la membrane ou dans le cytoplasme des cellules. La méthode de l'analyse de traces sera, nous le pensons, indispensable pour améliorer la compréhension de ces phénomènes. Il est également essentiel de concevoir et de réaliser des expériences *in vitro* et *in vivo* dédiées spécifiquement à l'amélioration des modèles dosimétriques.

La dernière partie de ce travail de thèse a montré qu'une modélisation simple de la RIT- α était faisable en utilisant la microdosimétrie. Les limitations et optimisations possibles de cette modalité de traitement ont été déterminées. Le réel apport de cette méthode est de permettre une quantification de tous les paramètres importants pour évaluer l'efficacité et la toxicité d'un traitement de RIT- α . Cette modélisation et ces quantifications peuvent s'avérer importantes pour la meilleure compréhension d'un phénomène qui n'est pas observable globalement, chez l'homme, par les techniques d'imagerie classiques. Le développement de ce modèle passe par une modélisation dynamique de la cinétique des anticorps radiomarqués si l'on souhaite s'intéresser notamment à l' ^{211}At , qui possède une demi-vie plus longue que le ^{213}Bi . Une modélisation plus pertinente de la toxicité à la moelle devra être également réalisée. Enfin, une caractérisation plus précise de la relation ligand-récepteur devra être effectuée *in vivo* à l'aide de l'imagerie confocale ou de l'imagerie par bioluminescence.

Annexes

La dilution limite

La dilution limite est une méthode permettant de déterminer la fréquence de prolifération d'une cellule dans telle ou telle condition de culture et donc en particulier après irradiation. C'est une technique couramment utilisée en immunologie pour calculer la fréquence de prolifération d'une cellule capable d'engendrer un clone cytotoxique ou un clone d'un phénotype donné. Elle permet l'analyse d'une population cellulaire à partir d'un échantillonnage important plutôt qu'à l'aide de quelques rares clones. Outre les renseignements directs qu'elle apporte la connaissance d'une fréquence de clonage notamment sur la survie cellulaire après irradiation, cette technique permet d'obtenir relativement aisément des colonies monoclonales dans des conditions où les fréquences de prolifération sont faibles, clones qui pourront constituer un matériel cellulaire de choix pour des études biologiques (expression de gènes impliqués dans l'apoptose...) et radiobiologiques (radiosensibilité après une irradiation de cette colonie monoclonale...).

Principe

On s'intéresse à l'apparition d'un événement A et à son contraire A'. L'événement A est l'apparition d'une colonie après irradiation. On y associe une variable aléatoire X prenant la valeur 1 quand l'événement A est réalisé et la valeur 0 quand c'est l'événement contraire A' qui est réalisé.

La loi de probabilité de X est :

$$\begin{aligned} \text{Prob}(X = 1) &= p \\ \text{Prob}(X = 0) &= q \end{aligned} \quad \text{avec } p + q = 1 \quad (\text{éq.7})$$

Si on considère maintenant une série de n épreuves identiques, on appellera Y le nombre de réalisations de l'événement A au cours des n épreuves. Y est une variable aléatoire qui peut prendre les valeurs 0,1,2,...,n. Sa loi de probabilité est :

$$\text{Prob}(Y=k) = C \binom{n}{k} p^k Q^{n-k}$$

pour $k = 0, 1, 2, \dots, n$ (éq.8)

C'est une loi binomiale dont une très bonne approximation peut être obtenue au moyen d'une loi de Poisson de paramètre $m = np$ soit

$$\text{Prob}(X = k) = e^{-m} \frac{m^k}{k!}$$
 (éq.9)

Si dans une série de puits où sont placées n cellules, la fréquence de celles qui vont proliférer est F , alors la loi de probabilité qui régit l'apparition des clones est la suivante :

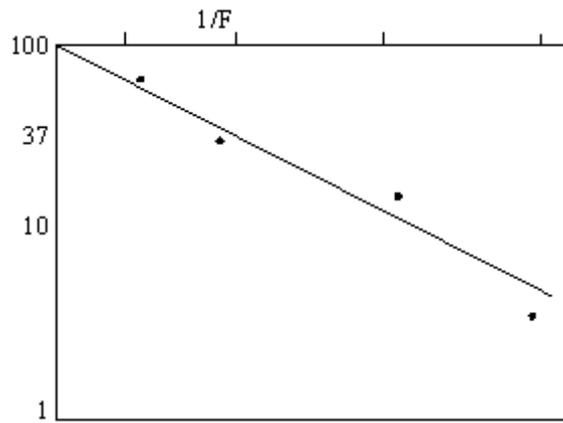
$$\text{Prob}(X = k) = e^{-F \cdot n} \frac{(F \cdot n)^k}{k!}$$
 (éq.10)

Pour des raisons pratiques, comme il n'est pas possible de distinguer au sein des puits "positifs" le nombre de clone initiaux ayant proliférer, on s'intéresse au terme 0 de cette loi de poisson, c'est à dire au nombre de puits vides dans chaque situation :

$$\text{Prob}(X = 0) = e^{-F \cdot n}$$
 (éq.11)

A chaque concentration cellulaire on note le nombre de puits vides, ce qui permet de déduire graphiquement la fréquence de clonage :

Conclusion générale



Pour $F.n = 1$, on a $F = 1/n$ avec $\text{Prob}(X=0) = 1/e = 0,37$

L'estimation du nombre de puits se fait à vue. Il faudra donc choisir un seuil à partir duquel les puits sont considérés comme vides pour les valeurs inférieures à ce seuil et pleins pour les valeurs supérieures. Ce seuil sera déterminé expérimentalement à partir de puits témoins.

Détermination du nombre de sites antigéniques des lignées par la méthode Scatchard

La fixation de l'anticorps sur une protéine antigénique est une étape importante de l'interaction antigène-anticorps. On peut mesurer expérimentalement la quantité d'anticorps lié à l'antigène en fonction de la quantité d'anticorps libre, ce qui permet de déduire la constante de dissociation K_d et le nombre de sites antigéniques. Ces paramètres sont des facteurs potentiellement limitatifs dans le cadre d'une RIT, car ils conditionnent en partie la quantité de radioactivité qui va pouvoir être délivrée à la cible tumorale.

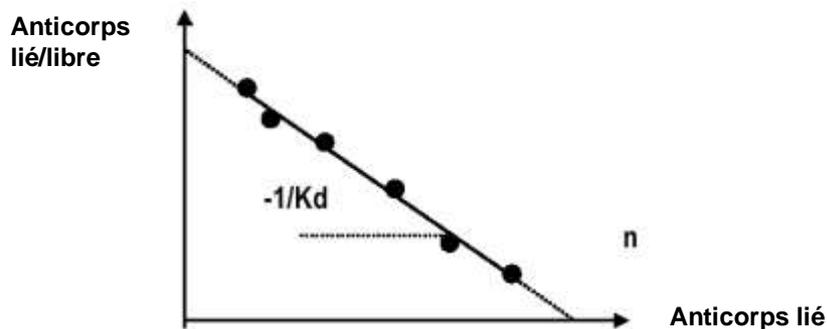
$$[Anticorps_{lié}] = [Anticorps_{lié}]_{max} \left(\frac{[Anticorps_{libre}]}{K_d + [Anticorps_{libre}]} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

où Anticorps lié = concentration anticorps-antigène
et K_d = constante de dissociation anticorps-antigène

On peut en déduire le rapport anticorps lié/anticorps libre selon la formule suivante :

$$\frac{[Anticorps_{lié}]}{[Anticorps_{libre}]} = \frac{[Anticorps_{lié}]_{max}}{K_d} - \frac{[Anticorps_{lié}]}{K_d} \quad \text{Eq. 2}$$

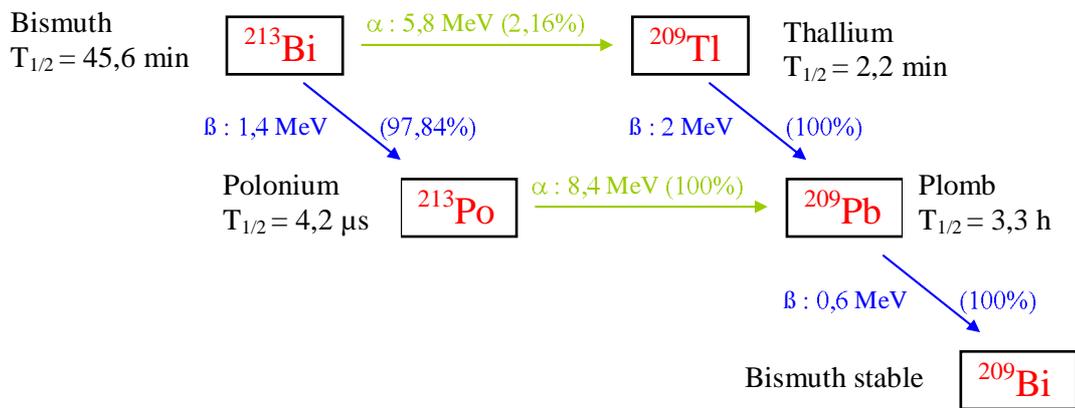
et en faire une représentation graphique selon la méthode de Scatchard, dans laquelle la pente de la droite donne le K_d et l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses (anticorps lié) donne le nombre maximal n de site antigénique.



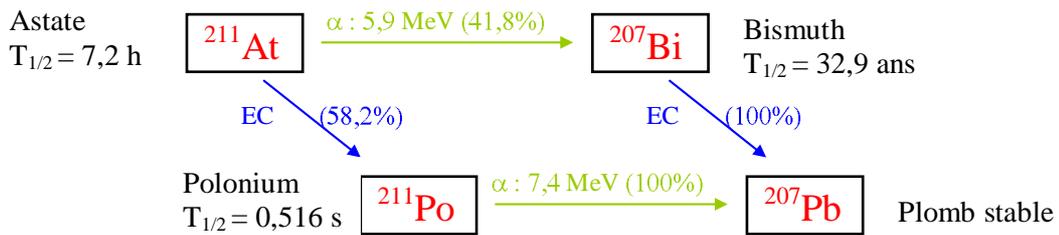
Représentation Scatchard de l'interaction anticorps-antigène.

Les différents radioéléments émetteurs α

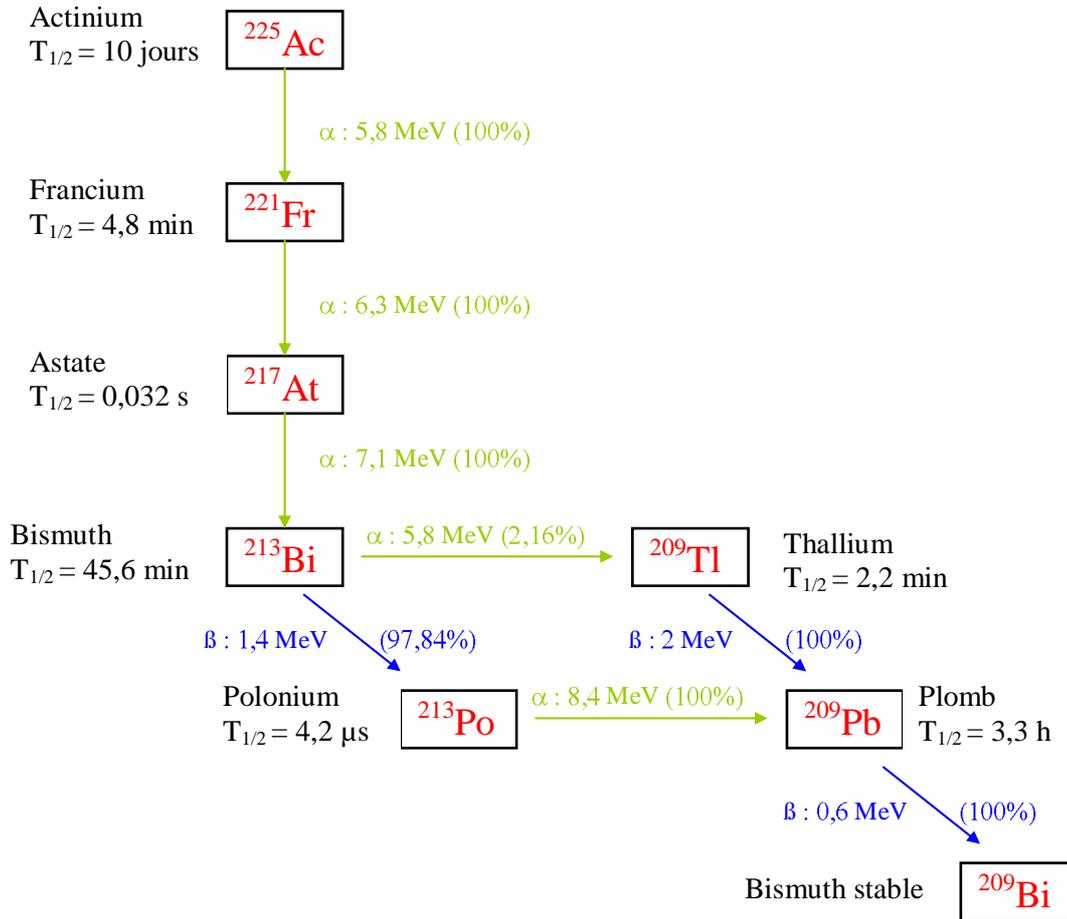
Bismuth 213 :



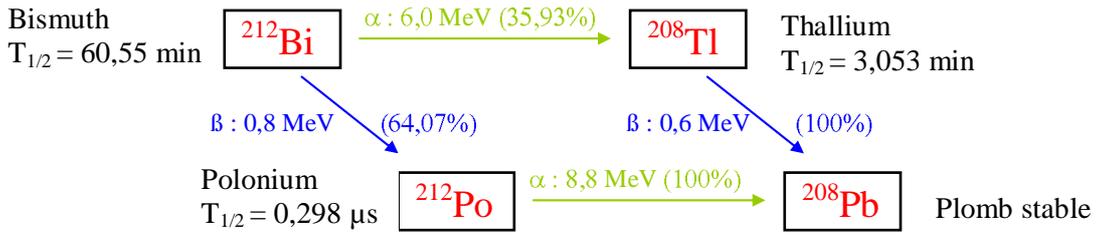
Astate 211 :



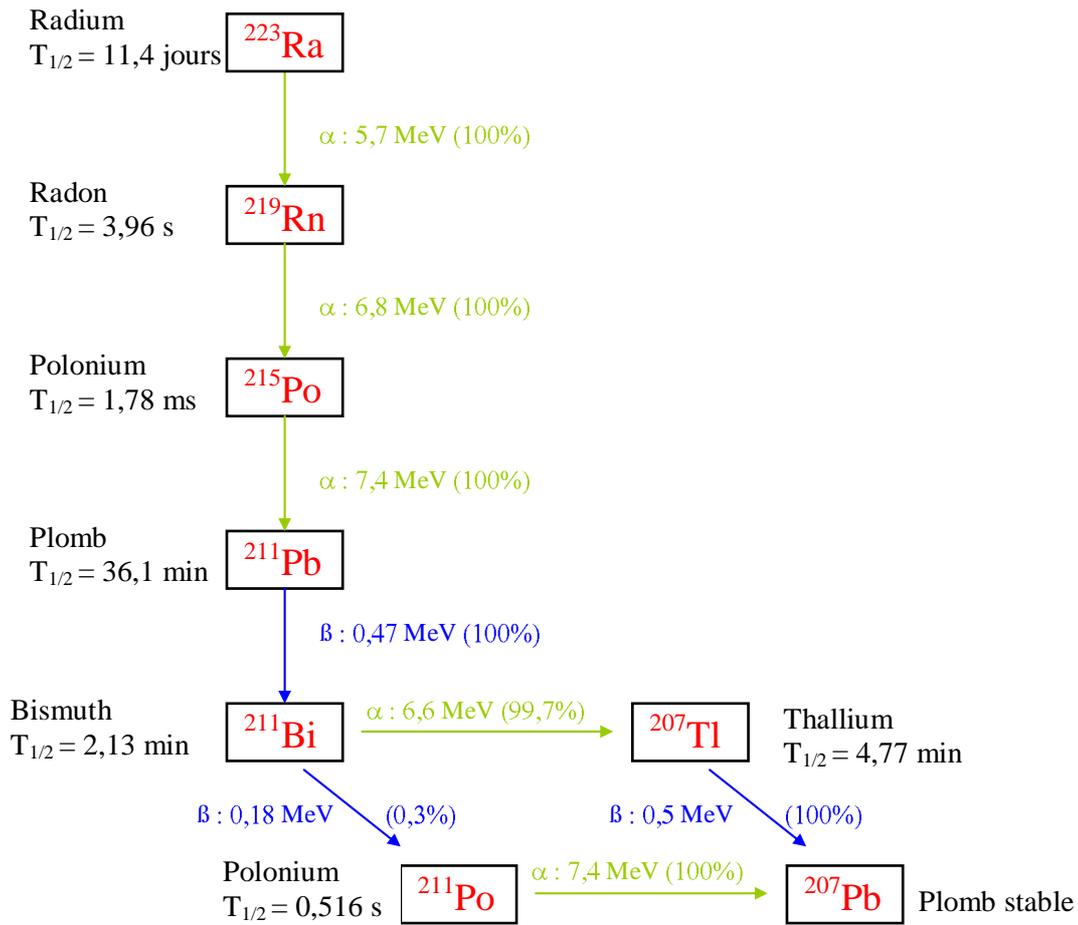
Actinium 225 :



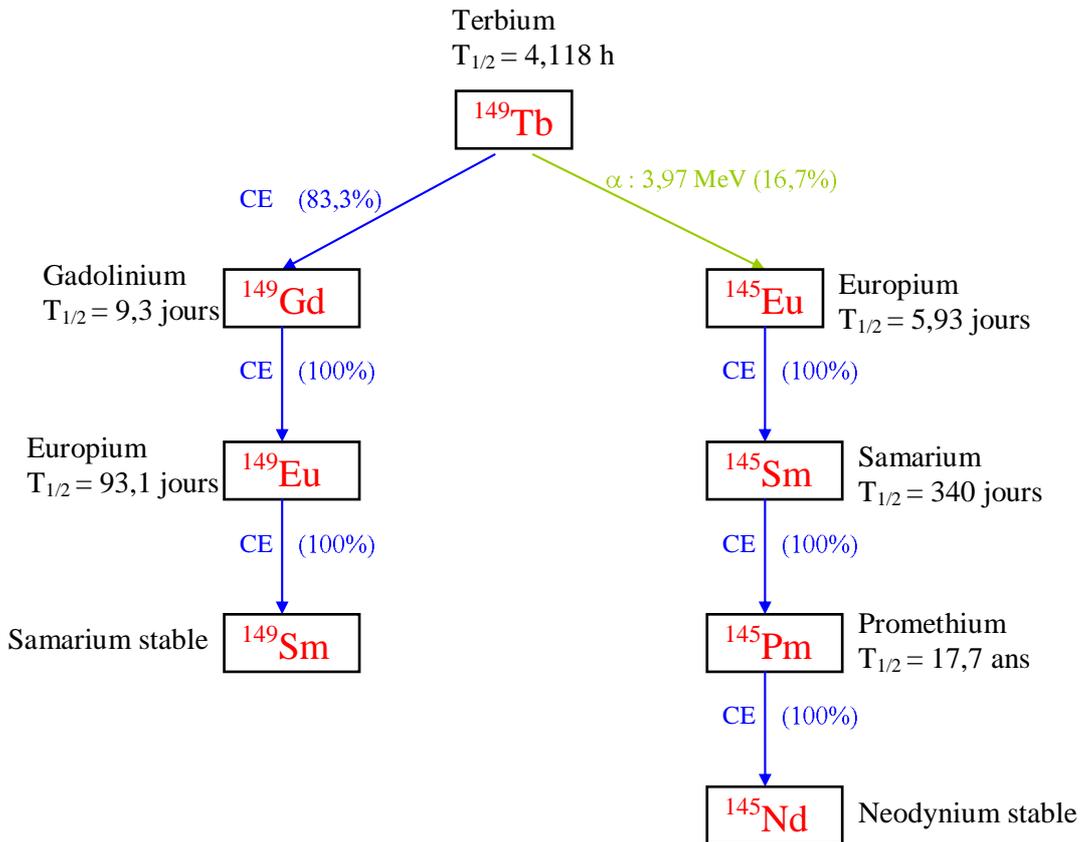
Bismuth 212 :



Radium 223 :



Terbium 149 :



Liste des Publications et congrès internationaux

Articles

N. Chouin, A. Bitar, A. Lisbona, M. Chérel, F. Davodeau, J. Barbet and M. Bardies, Implementation of a microdosimetric model for radioimmunotherapeutic alpha emitters. *Cancer Biother Radiopharm* **22**, 387-392 (2007).

N. Chouin, K. Bernardeau, F. Davodeau, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, M. Bourgeois, C. Apostolidis, A. Morgenstern, A. Lisbona and M. Bardiès, Evidence of extra-nuclear cell sensitivity to alpha irradiation using a microdosimetric model I. Presentation and validation of a new microdosimetric model. *Radiat. Res.*, en révision.

N. Chouin, K. Bernardeau, M. Bardiès, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, M. Bourgeois, C. Apostolidis, A. Morgenstern, A. Lisbona and F. Davodeau, Evidence of extra-nuclear cell sensitivity to alpha irradiation using a microdosimetric model II. Application of the new microdosimetric model to experimental results. *Radiat. Res.*, en révision.

L. Ferrer, **N. Chouin**, A. Bitar, A. Lisbona and M. Bardies, Implementing dosimetry in GATE: dose-point kernel validation with GEANT4 4.8.1. *Cancer Biother Radiopharm* **22**, 125-129 (2007).

J.-P. Pouget, L. Santoro, L. Raymond, **N. Chouin**, M. Bardiès, C. Bascoul-Mollevi, H. Huguet, D. Azria, P.-O. Kotzki, M. Pèlerin, E. Vivès and André Pèlerin, Cell membrane is a more sensitive target than cytoplasm to dense ionization produced by Auger electrons. *Radiat. Res.*, sous presse.

H. Uusijärvi, **N. Chouin**, P. Bernhardt, L. Ferrer, M. Bardiès and E. Forssell-Aronsson, Comparison of electron dose point kernels in water generated by the Monte Carlo codes PENELOPE, GEANT4, MCNPX and ETRAN. *Med. Phys.*, soumis.

Communications orales

N. Chouin, S. Supiot, M. Chérel, F. Davodeau, S. Gouard, A. Faivre-Chauvet, C. Apostolidis, A. Morgenstern, A. Lisbona, J. Barbet and M. Bardiès, Calculation of Relative Biological Effectiveness for α -particles. **18th IRIST (International Research group in Immuno-Scintigraphy and Therapy) congress**, Londres, Angleterre, Mai 2006.

N. Chouin, A. Lisbona, J. Barbet and M. Bardiès, Implementation and validation of a microdosimetric model for radioimmunotherapeutic alpha emitters. **19th Annual Congress of the EANM (European Association of Nuclear Medicine)**, Athènes, Grèce, Octobre 2006.

N. Chouin, K. Bernardeau, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, C. Apostolidis, A. Morgenstern, A. Lisbona, J. Barbet, F. Davodeau and M. Bardiès, Microdosimetric analysis of cell survival after alpha-particle irradiation. **19th Annual Congress of the EANM (European Association of Nuclear Medicine)**, Athènes, Grèce, Octobre 2006.

N. Chouin, K. Bernardeau, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, C. Apostolidis, A. Morgenstern, A. Lisbona, J. Barbet, J.-P. Pouget, F. Davodeau and M. Bardiès, Cellular dosimetry. **Quantitative Imaging and Dosimetry in Nuclear Medicine**, Berder, France, Octobre 2007.

N. Chouin, S. Supiot, A. Faivre-Chauvet, A. Morgenstern, A. Lisbona, M. Chérel and M. Bardiès, Dosimetric analysis of in vitro cell irradiation by γ -rays, β^- and α -particles. **20th Annual Congress of the EANM (European Association of Nuclear Medicine)**, Copenhague, Danemark, Octobre 2007.

N. Chouin, A. Lisbona and M. Bardiès, Dosimetric consequences of the non-uniform distribution of activity at the cell level. **20th Annual Congress of the EANM (European Association of Nuclear Medicine)**, Copenhague, Danemark, Octobre 2007.

N. Chouin, F. Davodeau and M. Bardiès, What is the minimal density of antigen sites needed to achieve tumor control in RIT- α ? **19th IRIST (International Research group in Immuno-Scintigraphy and Therapy) congress**, Cracovie, Pologne, Juin 2008.

L. Ferrer, **N. Chouin**, A. Lisbona and M. Bardiès, Photon Dose Point Kernel calculation with Geant4.8.1. **20th Annual Congress of the EANM (European Association of Nuclear Medicine)**, Copenhague, Danemark, Octobre 2007.

J.-P. Pouget, L. Santoro, B. Piron, S. Boutaleb, C. Mollevi, **N. Chouin**, M. Bardiès, E. Vives, P.-O. Kotzki, M. Pèlerin and A. Pèlerin, Radioimmunotherapy of small solid tumors using Auger electrons : *in vitro* and *in vivo* studies. **19th IRIST (International Research group in Immuno-Scintigraphy and Therapy) congress**, Cracovie, Pologne, Juin 2008.

Communications affichées

N. Chouin, K. Bernardeau, F. Davodeau, M. Chérel, S. Supiot, S. Gourad, M. Erzilbengoa and M. Bardiès. Outil microdosimétrique dans le cas d'études *in vitro* de la radioimmunothérapie alpha. **Congrès annuel de la Société Française de RadioProtection (SFRP)**. *Nantes, France, Juin 2005*.

N. Chouin, A. Lisbona, J. Barbet and M. Bardiès. Cellular microdosimetric evaluation of the influence of irradiation specificity in alpha radioimmunotherapy. **14th Symposium on Microdosimetry**. *Venise, Italie, Novembre 2005*.

L. Ferrer, A. Lisbona, N. Chouin, A. Bitar and M. Bardiès, Implementing dosimetry in Gate: beta dose point kernels validation with Geant4.8. **19th Annual Congress of the EANM (European Association of Nuclear Medicine)**. *Athènes, Grèce, Octobre 2006*.

N. Chouin, M. Bardiès, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, M. Bourgeois, C. Apostolidis, A. Morgenstern, A. Lisbona, J. Barbet, K. Bernardeau and F. Davodeau, Dosimetric evidence of cell extra nuclear sensitivity to alpha irradiation? **13th International Congress of Radiation Research**. *San Francisco, USA, Juillet 2007*.

TITRE : APPROCHE MICRODOSIMETRIQUE DE LA RADIOIMMUNOTHERAPIE ALPHA.

La radioimmunothérapie- α (RIT- α) est une modalité thérapeutique prometteuse contre les cancers diffus et les maladies résiduelles. Le court parcours des particules α permet une irradiation spécifique des cellules tumorales. Ce traitement est également efficace en raison de la forte cytotoxicité de ces particules. En revanche, la dose de rayonnements délivrée aux cellules d'une tumeur est distribuée de façon non-uniforme et peut avoir une grande influence sur le succès de cette thérapie. Un modèle microdosimétrique de calcul des dépôts d'énergie au sein de différentes cibles subcellulaires a été développé. Il permet le calcul rapide des distributions d'énergie spécifique dans les cibles considérées et la modélisation de la survie cellulaire après une irradiation α . L'apport de la méthode microdosimétrique sur la modélisation de la survie cellulaire a été comparé à une méthode macrodosimétrique. La microdosimétrie s'avère être un outil de modélisation beaucoup plus précis dans de nombreuses configurations rencontrées *in vitro*. La prise en compte de la distribution non-uniforme de l'activité lors du traitement de cellules isolées ou de groupes de cellules va modifier la forme des courbes de survie cellulaire et ne peut être négligée. L'application de ce modèle à des données *in vitro* a permis de vérifier la grande toxicité des particules α par rapport aux particules β . Un autre résultat important est la mise en évidence d'une réponse cellulaire à une irradiation α . Le modèle développé a permis de déterminer les paramètres clés du succès d'un traitement de RIT- α . Les indications quantitatives fournies par cette étude peuvent indiquer des voies d'optimisation de la RIT- α .

Mots-clé: Microdosimétrie, radioimmunothérapie, particules α , survie cellulaire.

TITRE : MICRODOSIMETRIC APPROACH OF THE ALPHA-RADIOIMMUNOTHERAPY ;

Alpha-radioimmunotherapy (α -RIT) is a promising therapeutic method against disseminated cancers and minimal residual diseases. The short range of α -particles allows for a specific irradiation of the tumor cells. The efficacy of this treatment is also high due to the observed cytotoxicity of these particles. On the other hand, the radiation dose delivered to the tumor cells can be distributed non-uniformly and this can have a great impact on the success of this therapeutic method. A microdosimetric model that calculates energy depositions within numerous cellular or subcellular targets has been developed. It allows for the fast calculations of the distributions of specific energy within considered targets and the evaluation of the cell survival after an α -irradiation. The impact of the microdosimetric method on cell survival prediction has been evaluated and compared with a macrodosimetric method. Microdosimetry reveals to be a more precise tool for numerous configurations encountered *in vitro*. Taking into account the non uniform distribution of activity at the cell level modified the shape of survival curves and this phenomenon was identified as an important parameter for treatment outcomes. The application of this model to *in vitro* data has confirmed the high cytotoxicity of α -particles in comparison with β -particles. The second important result is the demonstration of a cellular response to α -irradiation. The developed tool was also used to determine the key parameters of α -RIT success. Quantitative values calculated in this study could provide indications on the way of optimizing α -RIT.

Keywords: Microdosimetry, radioimmunotherapy, α -particles, cell survival.

CHOUIN Nicolas
INSERM U892
9, Quai Moncousu
44093 Nantes