

THÈSE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physique et Chimie des Matériaux

Présentée par

M. François Trompier

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Développement de méthodes de dosimétrie des rayonnements ionisants pour  
le tri de population : application de la spectroscopie par résonance  
paramagnétique électronique à la mesure sur les ongles**

soutenue le 29 mars 2012

devant le jury composé de :

Mr. Didier Gourier Directeur de thèse

Mmes Catherine Luccioni et Valérie Belle Rapporteurs

Mrs. Christian Bonhomme, Hervé Vezin, François Quéinnec Examineurs



## Liste des abréviations

ABS : acrylonitrile-butadiène-styrène

AMOLED : Active-matrix organic light-emitting diode

App : Amplitude pic à pic

« BG » : Background, signal « bruit de fond »

CBM : Cytokinesis Block Micronucleus

Dsat : Dose de saturation

ESEEM : Electron Spin Echo Envelope Modulation

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

Gy : Gray, unité de dose absorbée

HYSCORE : Hyperfine Sublevel CORElation spectroscopy

IAEA : International Atomic Energy Agency

IRD : Improvised Radiation Device

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

LCD : Liquid Crystal Display

MIS : Mechanical Induced Signals

NRBC : Nucléaire Radiologique Bactériologique et Chimique

PC : polycarbonate

PCC : Premature Chromosome Condensation

PET : polyéthylène téréphtalate

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

PADC : Poly-Allyl-Diglycol-Carbonate

RED : Radiation Exposure Device

RIS : Radio-Induced Signal

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

TFT : Thin-Film Transistor

UNSCEAR : United Nation Scientific Committee on the Effect of Atomic Radiation



## *Table des matières*

Introduction .....	19
Chapitre I : Contexte et Objectifs	
A. Les accidents radiologiques .....	25
B. La dosimétrie d'accident radiologique .....	27
B.1 Introduction .....	27
B.2 Les signes cliniques.....	28
B.3 La dosimétrie biologique.....	29
B.4 La dosimétrie physique .....	30
C. Du risque accidentel au risque terroriste .....	33
D. Spécificité de la gestion des événements insidieux – tri de population .....	34
E. Potentiel et apport de la dosimétrie physique pour le tri de population .....	38
E.1 Potentiel pour le tri de la mesure des tissus calcifiés par RPE.....	40
E.2 Potentiel pour le tri de la mesure des tissus kératinisés humains par RPE .....	42
E.3 Potentiel pour le tri de la mesure de matériau biologique non humain par RPE .....	43
E.4 Potentiel pour le tri de la mesure des verres minéraux par RPE .....	44
E.5 Potentiel pour le tri de la mesure des polymères par RPE .....	45
E.6 Conclusion.....	46
F. Objectifs du travail de thèse.....	47
G. Références .....	48
Chapitre II : Matériels et méthode et état de l'art sur les ongles	
A. Introduction.....	57
B. Principe général de la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique.....	57
B.1 Rappel d'électromagnétisme .....	58
B.2 Etats énergétiques- effet Zeeman .....	61
B.3 La résonance.....	63
B.4 La relaxation.....	64
B.5 Forme des raies d'absorption .....	66

B.6	Anisotropie spectrale.....	66
B.7	Structure hyperfine.....	67
B.8	Eclatement à champ nul et structure fine.....	69
B.9	Description des différentes techniques et spectromètres RPE utilisées.....	72
C.	Spectroscopie RPE en onde continue.....	73
C.1	Description des éléments d'un spectromètre en onde continue.....	74
C.2	Paramètres d'acquisition d'un spectre RPE.....	77
D.	Spectroscopie RPE pulsée : ESEEM et HYSCORE.....	80
E.	Principe général de la dosimétrie des rayonnements ionisants par RPE.....	83
F.	Description de la méthodologie des tests pour établir un protocole d'estimation des doses.....	84
F.1	Préparation des échantillons.....	84
F.2	Optimisation des paramètres de mesure.....	84
F.3	Etude du signal.....	86
F.4	Réponse en fonction de la dose.....	87
F.5	Evaluation de la dose.....	87
G.	Description des moyens d'irradiation.....	90
H.	Description des ongles et état de l'art en dosimétrie.....	91
H.1	Description histologique des ongles.....	91
H.2	Biochimie des ongles.....	93
H.3	Composition des ongles.....	97
H.4	État de l'art de la RPE des ongles.....	98
H.5	Conclusion sur l'utilisation des ongles en dosimétrie.....	102
I.	Références.....	103
Chapitre III : Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle		
A.	Introduction.....	109
B.	RPE de $Mn^{2+}$ et $Fe^{3+}$ dans les ongles.....	109
B.1	Rappel sur les ions métalliques $d^5$ .....	109
B.2	Signaux RPE liés au manganèse.....	113
B.3	Signaux RPE liés à la présence de fer.....	132
B.4	Conclusions générales sur les signaux intrinsèques.....	136
C.	Signaux RPE parasites.....	137

C.1	Problématique liée aux ongles vernis.....	137
C.2	Présentation des spectres RPE d'ongles vernis .....	138
C.3	Efficacité et effet de dissolvants sur les composantes RPE parasites des ongles vernis .....	141
C.4	Conclusions sur les signaux parasites .....	142
D.	Conclusion générale.....	143
E.	Références.....	143

#### Chapitre IV : Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

A.	Introduction.....	149
B.	Etude et description des différentes composantes du MIS .....	149
B.1	Mise en évidence des principales composantes du MIS .....	149
B.2	Etude et description du MIS1 .....	155
B.3	Etude et description du MIS3 .....	177
B.4	Etude et description du MIS4.....	181
B.5	Etude et description de la composante isotrope autour de $g=2$ .....	186
B.6	Processus de formation des différents composantes du MIS .....	201
C.	Conclusions et perspectives sur les effets du stress mécanique .....	205
D.	Références.....	206

#### Chapitre V : Les signaux induits par irradiation dans les ongles

A.	Introduction.....	211
B.	Etudes des signaux radio-induits .....	212
B.1	Description du RIS 1 .....	214
B.2	Description du RIS 3 .....	216
B.3	Description du RIS 4 .....	217
B.4	Etude et description du RIS 2.....	218
B.5	Etude et description du RIS 5 : composante stable du RIS .....	227
B.6	Conclusion sur le RIS5.....	240
C.	Conclusion-Perspectives.....	240
D.	Références.....	241

## Chapitre VI : Développement des protocoles de mesure et applications

A. Introduction.....	245
B. Elaboration des nouveaux Protocoles .....	246
B.1 Principe général basé sur le RIS5.....	246
B.1.1 Protocole n°1 .....	246
B.1.2 Protocole n°2.....	247
B.2 Prélèvement des échantillons .....	247
B.3 Stockage et transport des échantillons .....	247
B.4 Préparation des échantillons.....	247
B.5 Choix de la technique de mesure (Bande X ou Q).....	248
B.6 Protocoles de mesure des ongles irradiés.....	249
B.6.1 Positionnement de l'échantillon .....	249
B.6.2 Optimisation des paramètres de mesure.....	251
B.7 Méthodes d'estimation des doses.....	252
B.7.1 Méthode d'estimation des doses avec le protocole 1 .....	252
B.7.2 Méthode d'estimation des doses avec le protocole 2 .....	254
C. Application à des cas réels d'accidents .....	256
C.1 Accident de gammagraphie survenu à Radés (Tunisie, 2008).....	256
C.2 Accident de gammagraphie survenu au Gabon (2010) .....	258
D. Bilan et perspectives pour l'optimisation des protocoles .....	260
D.1 Les protocoles développés au cours de ce travail .....	260
D.2 Perspectives en matière d'optimisation des protocoles.....	260
D.2.1 Paramètres à considérer.....	260
D.2.2 Amélioration de la sensibilité.....	261
D.2.3 Mesure sélective du BG et du RIS5 .....	263
E. Conclusion .....	263
F. Références.....	264
Conclusion générale .....	265
Annexe I : Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	269
Annexe II : Mesure des temps de relaxation par RPE pulsée.....	273
Annexe III : Liste et caractéristiques des acides aminés .....	275

# Tables des Figures

## Chapitre I : Contexte et Objectifs

Figure I.1 : Installation de radiologie à la fin du XIX <sup>ème</sup> siècle, à l'arrière de la patiente le tube à rayons X (Image : Radiology Centennial, Inc.).....	25
Figure I.2 : Exemples de conséquences d'une irradiation localisée : a) dépigmentation avec halo hyperpigmentation Dose>5Gy b) et c) desquamation humide Dose>20 Gy d) nécrose Dose>25Gy – (images IRSN).....	26
Figure I.3 : évolution de la concentration lymphocytaire en fonction du temps après exposition et en fonction de la sévérité de l'irradiation (illustration IRSN).....	28
Figure I.4 : représentation schématique des types d'aberrations chromosomiques et exemple d'un dénombrement de chromosomes dicentriques dans le noyau cellulaire au stade de métaphase (Illustration IRSN).....	29
Figure I.5 : Mannequin anthropomorphe équivalent tissu de type Alderson-Rando. Ce fantôme constitué de tranches permet le positionnement de dosimètres (points blancs) dans tout le volume du fantôme permettant ainsi de réaliser une cartographie de dose.....	30
Figure I.6 : Représentation 3D d'un fantôme mathématique, d'un fantôme voxelisé et exemple de modélisation 3D d'une géométrie d'irradiation (Illustration IRSN).....	31
Figure I.7 : système de RPE in vivo dit corps entiers utilisés pour des applications en dosimétrie des rayonnements ionisants et en oxymétrie (image : Williams et al., 2010).....	41

## Chapitre II : Matériels et méthode et état de l'art sur les ongles

Figure II.1 : Schéma des niveaux d'énergie pour l'électron libre fonctions du champ magnétique appliquée avec absorption RPE.....	61
Figure II.2 : Représentation schématique de la précession des moments magnétiques individuels autour de $B_0$ et de la résultante selon l'axe Z.....	64
Figure II.3 : Spectres RPE « de poudre » correspondant à une symétrie axiale 1) et à une symétrie rhombique 2). Les spectres (a) correspondent à des spectres d'absorption idéaux, les spectres (b) correspondent à des spectres d'absorption réels, les spectres (c) correspondent à la première dérivée de (b).....	67
Figure II.4 : Niveaux d'énergie et transition pour un système avec un électron non apparié et deux noyaux équivalent de spin $I = \frac{1}{2}$ ayant la même constante de couplage hyperfin ( $A_0$ ). k, l et m correspondent aux transitions autorisées.....	68
Figure II.5 : Couplage théorique de l'interaction hyperfine de protons, pour une contribution équivalente de 2 et 3 protons (Ikeya, 1993).....	69
Figure II.6 : Schéma des niveaux d'énergie et effet sur la résonance dans le cas d'un état triplet ( $S=1$ ). .....	70
Figure II.7 : Schéma des niveaux d'énergie et effet sur la résonance dans le cas de l'ion $Mn^{2+}$ ( $d^5$ , $S=5/2$ ). .....	71
Figure II.8 : Représentation schématique de la variation angulaire de la position des raies de la structure fine pour $S=5/2$ .....	71

Figure II.9 : Spectre d'absorption du rayonnement micro-onde, et sa dérivée première.....	74
Figure II.10 : Ensemble des éléments d'un spectromètre.....	74
Figure II.11 : Effet de la modulation du champ magnétique sur l'allure d'une raie RPE. L'allure de la raie (cadre a) est celle qu'on obtiendrait si le spectre était mesuré en détection directe. En appliquant une modulation de champ de petite amplitude comparée à la largeur de raie, on obtient un signal oscillant. L'amplitude des oscillations dépend de la pente du spectre au champ considéré. Elle est mesurée par la détection synchrone et on obtient un spectre (cadre b) qui est proche de la dérivée par rapport au champ du spectre obtenu sans détection directe. ....	76
Figure II.12 : Exemple du comportement d'une raie homogène (lorentzienne) et d'une raie complètement inhomogène (en général gaussienne) en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde.....	79
Figure II.13 : Effet de la modulation d'amplitude sur le spectre RPE. ....	79
Figure II.14 : Obtention d'un écho. La première impulsion permet de faire basculer l'aimantation initialement orientée parallèlement à Z dans le plan transverse XY, soit d'un angle $\pi/2$ . Dans le temps $\tau$ entre les deux impulsions, les spins précessent selon leur propre fréquence. L'application du deuxième pulse orientée selon l'axe X qui permet de faire basculer le moment magnétique des spins d'un angle $\pi$ dans le plan XY permet de refocaliser les spins sur l'un des axes qui permet d'obtenir un écho. ....	81
Figure II.15 : Détermination des fréquences nucléaires de modulation à partir de la mesure de la décroissance de l'écho de spin en fonction du temps $\tau$ : la partie de la décroissance modulée par les interactions est obtenue par soustraction de la ligne de base (partie non modulée), le spectre en fréquence est ensuite obtenu par transformée de Fourier. ....	82
Figure II.16 : Séquence des pulses utilisée lors de l'expérience de type ESEEM-4P pour $T_a=T_b$ et HYSCORE lorsque $T_a$ et $T_b$ varie de manière indépendante. ....	82
Figure II.17 : Exemple de mesure d'intensité du signal par la méthode dite de l'amplitude « pic à pic » ou App. ....	85
Figure II.18 : Exemple de détermination de la dose absorbée sur un os humain (accident de Lia, Georgie 2001) par la méthode des ajouts dosés .....	88
Figure II.19 : Représentation schématique des différentes parties anatomiques d'un ongle normal. 1) bourrelet unguéal, 2) racine, 3) limbe, 3a éponychium ou cuticule, 3b lunule, 3c bord libre, 4 plateau unguéal, 5) matrice unguéale, 6a) cuticule, 6b) lunule, 7) lit unguéal, 8) hyponychium, 9) derme.....	91
Figure II.20 : Représentation schématique des ongles humains montrant la structure multicouches. (a) couche dorsale, (b) couche intermédiaire, (c) couche ventrale. ....	92
Figure II.21 : Image de microscopie électronique de la tranche d'un ongle fracturé (Farren et al., 2004). ....	93
Figure II.22 : formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés (alanine et serine.) ....	94
Figure II.23 : Polarisation du groupe motif amide.....	94
Figure II.24 : Représentation des liaisons hydrogènes de la chaîne principale de l'hélice. ....	94
Figure II.25 : Représentation schématique des hétérodimères, protofilaments et microfibrilles constituant l'architecture de l'ongle. (D. Boet et J.G. Boet, 2005).....	95
Figure II.26 : Représentation schématique des liaisons SS dans les trois couches (d'après Achten, 1963). ....	96
Figure II.27 : Spectre RPE d'un échantillon stressé mécaniquement mesuré en bande X à 77 K (d'après Symons, 1988).....	99

Figure II.28 : Spectre RPE en bande X d'un échantillon d'ongle de pied irradié à forte dose (Gordy & Shields, 1958). La flèche indique $g=2,000$ les marques en abscisses correspondent à des $\Delta B$ de 6,8 mT. ....	100
Figure II.29 : Spectre RPE d'un échantillon d'ongle irradié aux rayonnements gammas ( $^{60}\text{Co}$ ) à température ambiante pour une dose inférieure à 100 Gy ( Symons et al., 1995). Le « BG » présente des caractéristiques spectrales identiques. ....	100

### Chapitre III : Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle

Figure III.1 : schéma des situations de haut spin et de bas spin pour des ions $d^5$ .....	110
Figure III.2 : exemple de diagramme de niveau d'énergie d'un ion $d^5$ avec $D$ et $E \ll hv$ .....	112
Figure III.3 : Spectre de $\text{Mn}^{2+}$ dans $\text{MgO}$ mesuré en bande X à température ambiante. Ce spectre est constitué de six quintuplets. ....	112
Figure III.4 : diagramme de niveau d'énergie d'un ion $d^5$ avec $D \gg hv$ (cas du $\text{Fe}^{3+}$ ), la seule transition observable se situe entre les niveaux $\pm 1/2$ .....	113
Figure III.5 : Spectre RPE de l'étalon interne de $\text{Mn:MgO}$ utilisé dans la cavité en bande X, mesuré à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW .....	115
Figure III.6 : Spectre RPE d'un prélèvement d'ongle non irradié mesuré en bande Q à température ambiante (après hydratation et séchage) à une puissance micro-onde de 2 mW. ....	116
Figure III.7 : Spectre RPE d'un prélèvement d'ongle irradié à 43 Gy (après humidification et séchage) mesuré en bande Q à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW. ....	116
Figure III.8 : Valeur de la constante de couplage hyperfin du $^{55}\text{Mn}$ en fonction de l'ionocité du site cristallin (d'après Title, 1963) .....	117
Figure III.9 : Spectres RPE d'un prélèvement d'ongle irradié à 43 Gy (après humidification et séchage) mesuré en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW. Les mesures ont été réalisées avec la surface de l'ongle perpendiculaire et parallèle à la direction du champ magnétique.....	118
Figure III.10 : spectre RPE en bande X de $\text{Mn}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$ en solution aqueuse (Bernards et al., 2005).....	122
Figure III.11 : Comparaison d'un spectre RPE en bande X d'un prélèvement d'ongle mesuré à température ambiante avec des simulations de spectre RPE du $\text{Mn}^{2+}$ réalisées avec le logiciel Symphonia avec $A_{xx} = A_{yy} = 9,6 \text{ mT}$ , $A_{zz} = 9,8 \text{ mT}$ , $E = 0 \text{ MHz}$ , et $D = 1710 \text{ MHz}$ (tracé rouge) et $D = 0 \text{ MHz}$ (tracé bleu). ....	123
Figure III.12 : Spectres RPE en bande Q d'un prélèvement d'ongle non irradié mesuré à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW.....	124
Figure III.13 : Spectres RPE du $\text{Mn}^{2+}$ simulé à l'aide du logiciel Symphonia avec les paramètres suivants : avec $A_{xx} = A_{yy} = 9,6 \text{ mT}$ , $A_{zz} = 9,8 \text{ mT}$ , $E = 0 \text{ MHz}$ , $D = 1710 \text{ MHz}$ et une fréquence micro-onde de 9,8 et 34 GHz pour la bande X et la bande Q.....	125
Figure III.14 : détails de la structure fine sur la raie du $\text{Mn}^{2+}$ sur un spectre simulé en bande X, avec $E = 0 \text{ MHz}$ et $D = 1710 \text{ MHz}$ .....	125
Figure III.15 : Détail de la structure fine du spectre RPE du $\text{Mn}^{2+}$ présent dans les ongles au niveau de la première résonance du $\text{Mn}^{2+}$ .....	126
Figure III.16 : Spectres RPE bande X de deux prélèvements d'ongles non irradiés mesurés à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW et avec une modulation d'amplitude de 0,3 mT, a) échantillon 1 sur une largeur de champ de 30 mT b) échantillon 2 sur une largeur de champ de 20 mT.....	127

<i>Figure III.17 : Spectres RPE bande Q de prélèvement d'ongles non irradiés mesurés à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW et une modulation d'amplitude de 0,3 mT. Les spectres sont normalisés par le nombre d'acquisitions réalisées et la masse des échantillons.</i>	128
<i>Figure III.18 : variations de l'intensité des raies du <math>Mn^{2+}</math> en fonction de la dose pour des prélèvements de 2 donneurs. Les mesures ont été réalisées en bande Q à température ambiante et à une puissance micro-onde de 1 mW.</i>	129
<i>Figure III.19 : Spectres RPE de prélèvements d'ongles provenant de différents donneurs et spectre RPE du tube vide mesurés en bande X à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2mW avec une cavité de type SHQ sur une largeur de champ de 500 mT.</i>	134
<i>Figure III.20 : Spectres RPE bande X d'un prélèvement d'ongle du donneur 4 mesuré à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2mW selon deux orientations de l'échantillon. La surface de l'ongle est orientée a) perpendiculairement à B (courbe noire), b) parallèlement à B (courbe rouge).</i>	135
<i>Figure III.21 : Spectres RPE autour de <math>g=2</math> des ongles vernis (vernis n°1 de couleur rose et vernis n°2 violet), mesurés en bande X à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW.</i>	139
<i>Figure III.22 : spectres RPE d'un prélèvement d'ongle vernis n°2 (violet) mesuré à température ambiante a) en bande X et b) en bande Q, avec une puissance <math>\mu</math>-onde de 2 mW.</i>	139
<i>Figure III.23 : Effet de l'orientation de l'échantillon dans le champ magnétique sur le spectre RPE d'une coupe d'ongle (vernis n°2) dont le plan principal est soit orienté parallèlement à B (<math>0^\circ</math>) soit perpendiculairement à B (<math>90^\circ</math>).</i>	140
<i>Figure III.24 : Effet du dissolvant sur le spectre RPE bande X d'ongle vernis (vernis n°2), spectres mesurés à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW. L'intensité du spectre de l'ongle a été divisée par 100.</i>	142
<i>Figure III.25 : Effet du dissolvant sur le spectre RPE bande X autour de <math>g=2</math>. L'échantillon a été mesuré avant vernissage, avec le vernis n°2 et après nettoyage au solvant (bain de 5 minutes).</i>	142

## Chapitre IV : Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

<i>Figure IV.1 : Spectre RPE d'un ongle coupé mesuré en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW immédiatement après coupe de l'ongle, après un délai de 24 heures et après une troisième coupe.</i>	150
<i>Figure IV.2 : Spectres RPE d'ongle stressé mécaniquement mesuré en bande Q et à température ambiante pour différentes valeurs de puissance micro-onde.</i>	151
<i>Figure IV.3 : Evolution du spectre RPE d'un ongle coupé en fonction du temps écoulé après la première coupe, mesure réalisée en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW.</i>	152
<i>Figure IV.4 : Décroissance de la composante à <math>g=2,004</math> mesurée à température ambiante en bande X sur des ongles prélevés moins de dix minutes avant la mesure. L'intensité du signal a été mesurée en quadrature de phase pour s'affranchir de la composante <math>g_3</math> du MIS1.</i>	153
<i>Figure IV.5 : Comparaison des spectres RPE mesuré en bande X à température ambiante, 6 heures après la première coupe et 6 heures après une deuxième coupe.</i>	153
<i>Figure IV.6 : Evolution du spectre RPE d'un ongle en fonction du temps écoulé après coupe multiple. Mesure réalisée en bande X à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW.</i>	153

<i>Figure IV.7 : Spectre RPE de cystine irradiée à 20 Gy mesuré en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 20 mW.</i>	155
<i>Figure IV.8 : Spectres RPE mesurés en bande Q à température ambiante de griffes de rats coupés à température ambiante.</i>	156
<i>Figure IV.9 : Variation de l'amplitude pic à pic du MIS1 et des composantes du MIS autour de <math>g=2</math> en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde mesurée en bande X avec la cavité haute sensibilité (Courbe publiée dans Reyes et al. 2008 dans le cadre de la collaboration avec USUHS).</i>	157
<i>Figure IV.10 : Isolation de la composante MIS1 par la méthode d'Ignatiev et al. (1996).</i>	158
<i>Figure IV.11 : Spectres RPE d'un prélèvement d'ongle fraisé mesuré en bande Q à 10 mW avec des phases respectivement égales à <math>0^\circ</math> et <math>90^\circ</math> et une fréquence de modulation de 100 kHz.</i>	159
<i>Figure IV.12 : Mesure en première et deuxième harmonique d'un ongle stressé mécaniquement réalisé en bande X à température ambiante.</i>	160
<i>Figure IV.13 : Spectre RPE d'ongle stressé mécaniquement à température ambiante mesuré en bande Q à une température de 200 K à 0,2 mW.</i>	161
<i>Figure IV.14 : Spectre HYSORE mesuré sur la composante <math>g_2</math> du spectre du MIS1 à 4 K pour <math>\tau = 200</math> ns.</i>	162
<i>Figure IV.15 : Mode opératoire pour l'étude de la variation d'intensité du MIS1 en fonction de la longueur de coupe.</i>	163
<i>Figure IV.16 : Variation de l'intensité du MIS1 en fonction de la longueur de coupe dans l'échantillon d'ongle.</i>	164
<i>Figure IV.17 : Schéma indiquant les deux axes de coupes réalisés sur les prélèvements d'ongles.</i>	164
<i>Figure IV.18 : Comparaison de l'intensité du signal d'origine mécanique pour deux orientations de coupe de l'ongle : parallèle et perpendiculaire au bord libre. La longueur de coupe totale pour les deux orientations est de 1,6 cm avec une mesure réalisée dans un délai inférieur à 1 minute après la coupe.</i>	165
<i>Figure IV.19 : Schéma décrivant la rupture des liaisons disulfures selon l'axe perpendiculaire au bord libre.</i>	166
<i>Figure IV.20 : Effet sur le spectre RPE mesuré juste après coupe, d'une humidification in vivo des ongles d'une durée de 5 et 10 minutes préalablement au prélèvement. Mesures réalisées en bande X à température ambiante et à une puissance micro-onde de 20 mW. Les raies du <math>Mn^{2+}</math> proviennent d'un étalon de MgO:Mn placé dans le bas de la cavité.</i>	168
<i>Figure IV.21 : Comparaison de la décroissance du MIS1 a) pour un ongle normalement hydraté b) pour un ongle déshydraté. Mesures réalisées à température ambiante en bande X à une puissance de 20 mW.</i>	169
<i>Figure IV.22 : Effet d'une humidification de quelques secondes d'un ongle stressé mécaniquement, mesure réalisée en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW a) humidification du bord de coupe, b) humidification de toute la masse de l'ongle.</i>	170
<i>Figure IV.23 : Humidification du bord de coupe à l'aide d'un pinceau humide.</i>	170
<i>Figure IV.24 : Courbe de décroissance isotherme du MIS1 en fonction de durée de chauffage des ongles (courbe isothermale). Chauffage réalisé à <math>40^\circ C</math>, <math>60^\circ C</math> et <math>100^\circ C</math>. Mesures réalisées en bande X à une puissance micro-onde de 20 mW.</i>	172
<i>Figure IV.25 : Courbe de décroissance isochrone de l'amplitude du MIS1. Mesures réalisées à température ambiante en bande X à une puissance micro-onde de 20 mW avec des durées de chauffage de 10 minutes.</i>	172

Figure IV.26 : Comparaison d'un spectre RPE d'ongle stressé mécaniquement mesuré en bande X en présence d'un étalon interne de MgO:Mn avec un spectre simulé du radical perthiyl calculé avec le logiciel SimFonia.	176
Figure IV.27 : Spectre RPE d'un ongle mesuré en bande Q à température ambiante pour une puissance micro-onde de 0,5 mW, 5 minutes et 15 minutes après son prélèvement et sans aucun traitement additionnel. L'intensité du signal après 15 minutes a été multipliée par un facteur 4.	178
Figure IV.28 : Représentation de la structure d'un radical centré sur un carbone en $\alpha$ sur la chaîne polypeptidique.	179
Figure IV.29 : Radical envisagé pour expliquer la présence de doublet dans des protéines irradiées ne contenant pas de glycine.	179
Figure IV.30 : Mesures en première et deuxième harmonique d'un ongle stressé mécaniquement réalisées en bande Q à température ambiante à une puissance micro-onde de 10 mW, une fréquence de modulation de 100 kHz et une modulation d'amplitude de 0,3 mT. L'intensité du signal en deuxième harmonique a été multipliée par 20.	182
Figure IV.31 : Spectres RPE mesurés en bande Q à température ambiante à une puissance de 10 mW, pour un échantillon stressé et mesuré d'une part à atmosphère normale et d'autre part sous atmosphère inerte.	183
Figure IV.32 : Simulation des spectres des radicaux RSO° et RSS° en bande Q.	184
Figure IV.33 : Simulation des spectres des radicaux RSO° et RSS° en bande X.	184
Figure IV.34 : Spectre RPE d'un ongle coupé mesuré en bande X à température ambiante 5 et 45 minutes après coupe.	185
Figure IV.35 : Mesure d'un ongle stressé après stabilisation des signaux induits après coupe (en noir) et après une humidification de 10 minutes dans de l'eau distillée suivi de 12 heures dans un dessiccateur (en rouge). Mesures réalisées en bande Q à une puissance de 1 mW à température ambiante.	187
Figure IV.36 : Variation de l'amplitude pic à pic du MIS1 et du MIS2 en fonction du nombre de fragments dans l'échantillon d'ongle.	188
Figure IV.37 : Variation de l'amplitude pic à pic du « BG » en fonction du nombre de fragments dans l'échantillon d'ongle.	188
Figure IV.38 : Variation de l'amplitude au cours du temps du MIS2 pour différentes températures de stockage.	190
Figure IV.39 : Variation de l'amplitude au cours du temps du BG pour différentes températures de stockage.	190
Figure IV.40 : Variation de l'amplitude pic à pic du BG et du MIS2 selon un traitement thermique isochrone ( $\Delta T=20^{\circ}\text{C}$ , $\Delta t= 20 \text{ min}$ ).	191
Figure IV.41 : Variation de l'intensité du signal mesuré à la valeur de g du « BG » en fonction du temps écoulé après humidification d'un échantillon d'ongle et stockage à l'air libre (Courbe publiée dans Reyes et al., 2008).	192
Figure IV.42 : Variation de l'intensité du signal mesuré à la valeur de g correspondant au « BG » en fonction du nombre de bains dans l'eau et du délai après humidification. Pour les mesures sans indications de délai, les mesures sont réalisées 12 heures après humidification et les ongles sont conservés dans ce délai dans un dessiccateur sous vide.	192
Figure IV.43 : Spectres RPE mesurés en bande Q, 12 heures et 2 jours après humidification.	193
Figure IV.44 : Représentation de l'effet de l'eau sur les radicaux associés au « BG ».	194

<i>Figure IV.45 : Effet d'un traitement aux ultrasons (35 kHz) à l'eau distillée sur le signal RPE d'origine mécanique, mesure réalisée avec une puissance micro-onde de 2 mW et une amplitude de modulation de 0,3 mT.</i>	195
<i>Figure IV.46 : Mesure du « BG » en bande Q avec une concentration relativement importante de Mn<sup>2+</sup> dans les ongles. Mesure réalisée à température ambiante à une puissance micro-onde de 1 mW.</i>	197
<i>Figure IV.47 : Mesure du « BG » en bande Q avec une concentration relativement faible de Mn<sup>2+</sup> dans les ongles. Mesure réalisée à température ambiante à une puissance micro-onde de 1 mW.</i>	197
<i>Figure IV.48 : Variation de l'amplitude pic à pic du « BG » en fonction du temps écoulé entre le prélèvement et la mesure des ongles. Les échantillons sont humidifiés après prélèvements. Graphique réalisé d'après les données publiées dans Romanyukha et al. (2009).</i>	198
<i>Figure IV.49 : Comparaison des spectres RPE de la cystéine et de la cystine irradiées à forte dose mesurés en bande X à température ambiante.</i>	202

## Chapitre V : Les signaux induits par irradiation dans les ongles

<i>Figure V.1 : évolution du spectre RPE d'ongle irradié en fonction de la dose d'irradiation, irradiations et mesures en bande X réalisées à température ambiante.</i>	213
<i>Figure V.2 : comparaisons de spectres du MIS et du RIS (10 kGy) mesurés en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 20 mW.</i>	215
<i>Figure V.3 : spectre RPE d'ongle irradié à 10 kGy mesuré en bande Q à température ambiante et à une puissance de 23 mW.</i>	218
<i>Figure V.4 : spectres RPE mesurés en bande Q d'un échantillon d'ongle irradié à une dose de 20 Gy, préalablement humidifié. Les mesures ont été réalisées après l'irradiation, et après humidification de l'échantillon irradié à température ambiante et à une puissance de 23 mW.</i>	219
<i>Figure V.5 : Influence du taux d'humidité de l'ongle exprimé en % de la masse de l'ongle sur la décroissance du RIS2. Mesures réalisées à température ambiante en bande X. Echantillons irradiés à 100 Gy par des rayons <math>\gamma</math> (<sup>60</sup>Co).</i>	220
<i>Figure V.6 : perte de masse d'un prélèvement d'ongle en fonction de la durée écoulée après prélèvement (température 20°C et 40% d'humidité).</i>	221
<i>Figure V.7 : décroissance du RIS2 en fonction de la température de stockage des ongles (Isotherme). Mesure réalisées en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW.</i>	223
<i>Figure V.8 : variation de l'amplitude du RIS2 en fonction de la dose pour des ongles irradiés pour différents délais après prélèvements (DP), dans des délais inférieurs ou supérieurs à 24 heures (Courbes réalisées à partir des données publiées dans Reyes et al., 2009).</i>	224
<i>Figure V.9 : représentation schématique du radical associé au RIS2.</i>	226
<i>Figure V.10 : Variation de l'amplitude du signal résiduel mesuré en fonction de la dose délivrée. Les ongles sont humidifiés et séchés après chaque irradiation. Mesures réalisées en bande Q à température ambiante. Courbe réalisée avec le nouveau protocole de mesure (chapitre VI).</i>	227
<i>Figure V.11 : courbe de chauffage isochrone (<math>\Delta t=10</math> min) d'un ongle irradié à 60 Gy, humidifié et séché avant mesure. Mesure réalisée en bande Q à température ambiante et à une puissance micro-onde de 1 mW.</i>	229

<i>Figure V.12 : effet de bains répétés dans de l'eau distillée sur le signal mesuré à <math>g=2</math> (« BG »+ RIS5. Mesures réalisées à température ambiante en bande Q sur un échantillon irradié à 55 Gy. ....</i>	<i>230</i>
<i>Figure V.13 : variation de l'amplitude du signal mesuré à <math>g=2,004</math> en fonction de la dose. Mesures réalisées en bande Q à température ambiante à une puissance micro-onde de 1 mW. ....</i>	<i>233</i>
<i>Figure V.14 : courbe d'étalonnage établie en RPE bande Q avec des échantillons d'émail dentaire de masse environ égale à 5 mg. A chaque point de la courbe correspond un échantillon irradié à une dose donnée.....</i>	<i>236</i>
<i>Figure V.15 : principe d'estimation des fortes doses à partir de la valeur de saturation en dose. La prédose correspond à la dose reçue par les ongles avant prélèvement.....</i>	<i>238</i>
<i>Figure V.16 : variation de l'amplitude du RIS5 en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde comparée à celles du « BG » . ....</i>	<i>239</i>

## Chapitre VI : Développement des protocoles de mesure et applications

<i>Figure VI.1 : variation de l'intensité du signal mesuré en bande Q en fonction du facteur de qualité de la cavité. Mesures réalisées sur des ongles irradiés .....</i>	<i>251</i>
<i>Figure VI.2 : effets au niveau des mains d'irradiations localisées avec des fortes doses .....</i>	<i>254</i>
<i>Figure VI.3 : courbes de saturation en dose obtenues sur les deux échantillons d'ongle .....</i>	<i>257</i>
<i>Figure VI.4 : exemples de courbe de saturation de dose obtenue sur deux prélèvements d'ongle de l'accident survenu au Gabon en 2010 .....</i>	<i>258</i>
<i>Figure VI.5 : cartographie des doses estimées par RPE sur les ongles avec le protocole n°2.....</i>	<i>259</i>

## Annexe II : Mesure des temps de relaxation par RPE pulsée

<i>Figure AII.1 : Principe de formation d'un écho (selon Carr et Purcell, 1954).....</i>	<i>274</i>
<i>Figure AII.2 : Séquence d'inversion recouvrement .....</i>	<i>275</i>

## Liste des Tableaux

Tableau II.1 : Récapitulatif des composantes de la matrice $g$ suivant les environnements possibles dans un réseau cristallin. ....	67
Tableau II.2 : Classification des bandes de fréquence. ....	73
Tableau IV.1 : Principales valeurs de $g$ issues de la littérature pour des ongles stressés mécaniquement ou irradiés ainsi que celles de composés soufrés irradiés avec l'espèce radicalaire associée. ....	175
Tableau VI.1 : effet de la normalisation de l'amplitude pic à pic du signal ( $A_{pp}$ ) par le facteur de qualité, mesuré sur l'écart-type d'une série de mesures. Mesures réalisées en bande $Q$ sur un mini dosimètre d'alanine irradié à 100 Gy.....	252
Tableau VI.2 : principaux paramètres utilisés pour mesurer les différentes composantes du signal selon le protocole utilisé pour une mesure en bande $X$ avec la cavité $SHQ$ .....	253
Tableau VI.3 : résultats des estimations de dose réalisées par RPE sur les biopsies osseuses et les ongles.....	256



## *Introduction*

L'Institut de Radioprotection et de Sûreté nucléaire (IRSN) est régulièrement impliqué depuis de nombreuses années dans la gestion de victimes d'irradiation accidentelle, en tant que support technique pour l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) ou pour les autorités françaises, et également en tant que support aux équipes médicales françaises qui prennent en charge ces victimes. Au plan de la gestion médicale, les équipes de l'IRSN interviennent pour l'aide à l'établissement du diagnostic, notamment via l'estimation des doses reçues, ainsi qu'au niveau thérapeutique par la mise à disposition de traitements innovants. Concernant les aspects dosimétriques, la variété des domaines de recherche de l'IRSN a favorisé une approche multi-technique et multidisciplinaire, avec une concentration de moyens qui reste rare parmi ses homologues internationaux. Les moyens opérationnels de l'IRSN comprennent ainsi des techniques aussi variées que la cytogénétique, les analyses radio-toxicologiques des excréta (techniques de spectrométrie  $\alpha$ , scintillation liquide et spectrométrie de masse), l'anthroporadiométrie (spectrométrie gamma), les techniques de reconstitutions dosimétriques expérimentales et numériques ainsi que les techniques de dosimétrie physique telles que l'activation neutronique et la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (RPE). Au cours de ces quinze dernières années, la quasi totalité des accidents dits sévères, c'est-à-dire avec des doses reçues ayant un effet à court terme sur la santé des victimes et nécessitant une prise en charge médicale, était liée à une irradiation externe. L'exposition dite interne, c'est-à-dire par inhalation ou ingestion, nécessite assez rarement une hospitalisation<sup>1</sup>.

Le plateau technique de l'IRSN fait l'objet d'actions continues de recherches et de développements qui s'enrichissent de l'expérience acquise sur la gestion de chaque cas, avec pour objectif de répondre au mieux à l'ensemble des scénarios d'exposition possible.

Si, pour la plupart des accidents radiologiques, le nombre de victimes avérées est habituellement faibles ( $< 10$ )<sup>2</sup>, l'évolution du contexte international, notamment la menace terroriste non conventionnelle de type NRBC<sup>3</sup>, a nécessité de reconsidérer les paramètres des accidents, en incluant désormais des scénarios avec un nombre significativement plus élevé de victimes avérées et potentielles. Dans ces cas, les victimes avérées seraient à identifier parmi une population potentiellement importante, à l'échelle d'une mégapole par exemple. Concernant les scénarios d'exposition externe, les techniques de dosimétrie d'accident utilisées en routine ne permettent pas actuellement de répondre, en termes de capacité, aux exigences de ces nouveaux scénarios. Ces scénarios impliquent en effet des capacités de mesure très importantes dans des délais de réponse courts, de l'ordre de quelques jours. Pour

---

<sup>1</sup> Exception faite du cas Alexander Litvinenko avec un empoisonnement au Polonium (année à préciser)

<sup>2</sup> Exception faite de l'accident de Tchernobyl ou de Fukushima

<sup>3</sup> NRBC : Nucléaire Radiologique Bactériologique et Chimique

pouvoir répondre à ces nouvelles situations d'urgence, différents programmes de recherche nationaux ou européens ont été mis en place ces dernières années. Certains programmes portent sur les aspects organisationnels de la gestion de crise et du développement de réseau d'expertise, il s'agit par exemple de projets financés par la communauté européenne dans le cadre du 7<sup>ème</sup> PCRD<sup>4</sup> tels que les projets MASH<sup>5</sup> et TENEB<sup>6</sup>). D'autres programmes, tels que les projets européens Booster et Multibiodose<sup>7</sup> ou encore le projet italien DOSSIER, sont, quant à eux, orientés vers le développement de nouvelles techniques d'évaluation de la dose ou l'adaptation de techniques existantes (automatisation, adaptation des seuils de détection, etc.).

Il apparaît clairement qu'une seule technique ne pourra pas répondre à l'ensemble des exigences des nouveaux scénarios de crise. C'est la raison pour laquelle, il a été recommandé par un comité scientifique international d'experts, qui s'est réuni lors de l'édition 2006 du congrès EPRBiodos<sup>8</sup>, de mettre en œuvre une approche multidisciplinaire et multi-techniques pour le tri (Alexander et al., 2007). Compte tenu notamment du caractère non spécifique des indicateurs biologiques de l'irradiation d'un individu, un tri effectué sur la seule base de ces indicateurs serait très incertain. C'est pourquoi les techniques de dosimétrie physique, notamment la spectroscopie RPE, ont été également considérées par ce comité. La spectroscopie RPE est également mentionnée comme technique complémentaire aux techniques de dosimétrie biologique dans différents rapports ou ouvrages traitant de cette problématique (Rapport du « Advisory Group of Ionizing Radiation » (AGIR), Grande Bretagne (HPA, 2009) ; Rapport du groupe de travail n°9 du projet européen MASH ; TMT-handbook (Rojas-Palma et al., 2009). Il faut noter que d'autres techniques de dosimétrie sont également envisagées pour le tri ou la dosimétrie rétrospective. Les techniques de luminescence stimulées thermiquement ou optiquement appliquées sur les verres ou les composants des objets électroniques personnels ont par exemple été identifiées comme présentant un intérêt pour les applications de tri et font par ailleurs l'objet de programmes de recherche, notamment à l'IRSN (Inrig et al., 2008 ; Woda et al., 2009 ; Bassinet et al., 2010 ). Cette thèse s'inscrit dans cette démarche et vise à étudier les possibilités de la spectroscopie RPE comme technique de dosimétrie rétrospective physique pour une application au tri de population à très grande échelle, ou, à défaut, pour l'estimation des doses des victimes avérées qui pourraient se compter par centaines ou par milliers.

---

<sup>4</sup> 7<sup>ème</sup> PCRD : 7ème Programme Cadre de Recherche et Développement

<sup>5</sup> <http://www.mashproject.com>

<sup>6</sup> <http://teneb.eu>

<sup>7</sup> <http://multibiodose.eu>

<sup>8</sup> EPRBiodos, congrès international de dosimétrie par RPE et de biodosimétrie

## REFERENCES

- Alexander G. A., Swartz H. M., Amundson S. A., Blakely W. F., Buddemeier B., Gallez B., Dainiak N., Goans R. E., Hayes R. B., Lowry P. C., Noska M. A., Okunieff P., Salner A. L., Schauer D. A., Trompier F., Turteltaub K. W., Voisin P., Wiley Jr, A. L. & Wilkins R. (2007) BiodosEPR-2006 meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents. *Radiat. Meas.*, 42, 948-971.
- Bassinet C., Trompier F. & Clairand I. (2010) Radiation accident dosimetry on electronic components by OSL. *Health Phys.*, 98(2), 440-445.
- Health Protection Agency (2009) High dose radiation effect and tissue injury, Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation. HPA, Chilton, UK.
- Inrig E. L., Godfrey-Smith D. I. & Khanna S. (2008) Optically stimulated luminescence of electronic components for forensic, retrospective, and accident dosimetry. *Radiat. Meas.*, 43(2-6), 726-730.
- Rojas-Palma C., Liland A., Jerstad A.N., Etherington G., Del Rosaria Pérez M., Rahola T. & Smith K. (2009) *TMT Handbook*, (Norway, NRPA), (<http://www.tmthandbook.org/>).
- Woda C., Bassinet C., Trompier F., Bortolin E., Della Monaca S., Fattibene P. (2009) Radiation-induced signals analysed by luminescence. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 45(3), 251-259.



# *Chapitre I*

## *Contexte et objectifs*

A. Les accidents radiologiques .....	25
B. La dosimétrie d'accident radiologique .....	27
C. Du risque accidentel au risque terroriste .....	33
D. Spécificité de la gestion des événements insidieux – tri de population .....	34
E. Potentiel et apport de la dosimétrie physique pour le tri de population.....	38
F. Objectifs du travail de thèse .....	47
G. Références .....	48



## **A. LES ACCIDENTS RADIOLOGIQUES**

Seulement un an après la découverte des rayons X par Röntgen en 1895, les rayons X ont été appliqués avec succès dans le domaine médical pour le traitement de tumeurs cancéreuses et pour l'imagerie dentaire et du squelette. Avec l'essor de ces premières applications médicales qui donnera rapidement naissance à la radiothérapie et à la radiologie (Fig. I.1), les effets secondaires des niveaux associés d'expositions de l'époque au niveau de la peau, à savoir des radiodermites et des érythèmes, sont rapidement décrits. Inévitablement, avec un développement aussi rapide et dans des disciplines aussi jeunes, des premiers cas de surexposition accidentelle sont très vite constatés. L'un des premiers cas de radionécrose a été décrit suite à un acte de radiologie à Chicago en 1896 (Berlin, 2001)<sup>1</sup>.



*Figure I.1 : Installation de radiologie à la fin du XIXème siècle, à l'arrière de la patiente le tube à rayons X (Image : Radiology Centennial, Inc.).*

Les accidents d'irradiation sévères liés au développement des premières armes atomiques et surtout l'emploi de ces armes sur des populations civiles, a conduit à considérer le risque radiologique et nucléaire comme un sujet majeur pour la sécurité des états et des populations, notamment du fait de la multiplication des applications tant dans le domaine militaire que pour la production d'énergie ou encore dans les domaines industriel et médical. Néanmoins, cette prise de conscience vis-à-vis des risques associés aux différentes applications a été lente et n'a évolué qu'avec l'étude des conséquences des cas d'accidents connus, aussi bien du point de vue sanitaire, social ou encore environnemental. Depuis 1945, d'après les dernières analyses de l'UNSCEAR<sup>2</sup>, 201 accidents radiologiques<sup>3</sup> ont été répertoriés dans le monde conduisant à 157 décès dus à un syndrome aigu d'irradiation (UNSCEAR, 2011). Ces chiffres

---

<sup>1</sup> On peut retrouver traces de ces accidents dans les arrêtés des cours de justice de l'époque (e.g. <http://www.oscn.net/applications/oscn/deliverdocument.asp?citeid=418141>)

<sup>2</sup> United Nation Scientific Committee on the Effect of Atomic Radiation

<sup>3</sup> Ces chiffres ne prennent pas en compte les explosions nucléaires d'Hiroshima et Nagasaki, ni les victimes de l'accident de Tchernobyl

## Chapitre I Contexte et objectifs

sont probablement très en dessous de la réalité, dans la mesure où ces accidents ne sont pas systématiquement déclarés au niveau international, et certains ne sont même pas identifiés comme étant des accidents radiologiques. Les accidents conduisant à une exposition radiologique aigue peuvent être dus à des sources radioactives orphelines (IAEA, 1988 et 2000) mal sécurisées ou insuffisamment identifiées (Clairand et al., 2003 ; IAEA, 1998a), à la perte accidentelle de sources (IAEA, 2004a et 2009), au dysfonctionnement d'installations industrielles d'irradiation (IAEA, 1996 ; Huet et al., 2008), à la libération de substances radioactives accidentelle ou volontaire (IAEA, 1988 ; Harrison et al., 2007), à des accidents de criticité (IAEA, 2001a) ou enfin à une mauvaise utilisation de dispositifs médicaux utilisés en radiologie, radiologie interventionnelle (Koenig et al., 2001 ; Mettler et al., 2002 ; Vliestra et al., 2004 ; Rehani & Lopez, 2006 ; IRSN, 2007), en curiethérapie ou encore en radiothérapie (IAEA, 1998b, 2001b et 2004b, Trompier et al., 2007). Ces accidents sont généralement classés selon le mode d'exposition, les effets et les contre-mesures étant généralement très différents selon que l'on considère une **exposition interne**, suite par exemple à l'inhalation ou à l'ingestion de substances radioactives, ou une **exposition externe** pour laquelle la source d'émission de rayonnements est localisée à l'extérieur de l'organisme. Dans ce dernier cas, la source peut être répartie ou localisée dans l'environnement de la victime (source orpheline, radiothérapie, sols contaminés, etc.) ou directement sur la victime, on parle alors de contamination externe. L'exposition accidentelle liée à une **exposition externe** est le mode d'exposition le plus fréquemment rencontré (84% des accidents). Dans deux tiers des cas, l'exposition est dite **localisée ou partielle** car elle ne concerne qu'une partie du corps tandis que, dans un tiers des cas, l'exposition concerne l'ensemble du corps de l'individu. Dans le cas d'une irradiation localisée, les doses peuvent être potentiellement élevées et des effets similaires aux brûlures thermiques sont observés au niveau de la peau. Quelques exemples des conséquences au niveau de la peau d'irradiations localisées à différents niveaux de dose sont donnés sur la [Figure I.2](#).

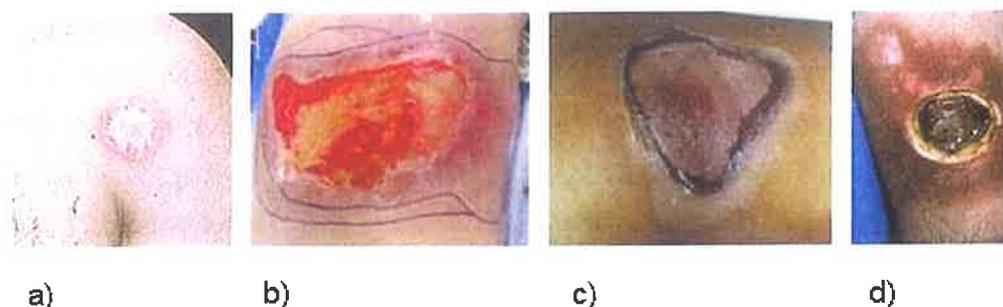


Figure I.2 : Exemples de conséquences d'une irradiation localisée : a) dépigmentation avec halo hyperpigmentation Dose > 5Gy b) et c) desquamation humide Dose > 20 Gy d) nécrose Dose > 25Gy – (images IRSN).

Il faut souligner que, dans le cas des irradiations de l'ensemble du corps, la distribution de dose dans l'organisme de la victime est le plus souvent hétérogène. Compte tenu de cette

hétérogénéité, il faut donc bien comprendre que la notion de dose est un concept qu'il faut manipuler avec précaution. Si l'on peut estimer la dose moyenne à l'organisme, ce n'est pas pour autant la donnée la plus pertinente pour les équipes médicales en charge des victimes d'irradiation. Plus que la dose, c'est sa distribution dans l'organisme ou encore la dose dans des organes ou des points bien précis, qu'il est important de connaître, notamment parce que les organes présentent des radiosensibilités très différentes. Alors que le cerveau est l'un des organes les plus radio-résistants, les centres hématopoïétiques peuvent présenter des défaillances pour des doses de l'ordre de quelques Gy. Dans le cas des centres hématopoïétiques, compte tenu qu'ils sont répartis dans l'organisme (sternum et crêtes iliaques en particulier.), la connaissance de la distribution de dose revêt un caractère crucial pour le diagnostic et le choix du traitement. Ainsi, selon le volume de moelle osseuse exposé et la dose reçue, on pourra recommander une réinjection massive de facteurs de croissance pour aider à la reprise des fonctions hématopoïétiques de production des cellules sanguines, ou, dans le cas d'une absence de reprise de l'hématopoïèse sous traitement cytokinique<sup>4</sup> pendant une période de 21 jours, une greffe de moelle osseuse pourra être envisagée (Gorin et al., 2006). On comprend tout l'enjeu de la prescription lorsque l'on sait qu'une greffe prescrite à mauvais escient peut avoir des conséquences néfastes pour le patient.

Les accidents d'irradiation impliquent toutes les catégories de la population : **travailleurs**, **patients** et **personnes du public**. La prise en charge médicale de ces personnes est spécifique puisqu'elle dépend du mode d'exposition (interne et/ou externe, localisée et/ou globale) mais aussi de la nature du rayonnement (photon, neutron, etc.). Ainsi, avec l'expérience acquise au cours des années, cette gestion sanitaire s'est considérablement améliorée du point de vue du diagnostic (Fliedner et al., 2001), mais également du point de vue des différentes thérapeutiques, par le développement de nouveaux traitements ou de nouvelles stratégies (Bey et al., 2010).

## **B. LA DOSIMETRIE D'ACCIDENT RADIOLOGIQUE**

### ***B.1 Introduction***

De manière à pouvoir poser le meilleur diagnostic possible et donc à adapter au mieux le traitement des victimes d'irradiation, plusieurs techniques et méthodes peuvent être mises en œuvre pour estimer les atteintes à l'organisme ou à défaut la distribution de la dose dans l'organisme ou dans des organes d'intérêt spécifique comme, par exemple, les centres hématopoïétiques, le système gastro-intestinal et la peau.

---

<sup>4</sup> Les cytokines sont des facteurs de croissance

## B.2 Les signes cliniques

Lorsque l'apparition d'effets dans l'organisme et leurs sévérités sont conditionnées par des niveaux de dose, on parle d'effet déterministe. Cette notion s'oppose aux effets stochastiques dont l'apparition n'est pas liée à des effets de seuil et pour lesquels il est seulement possible d'associer une probabilité d'occurrence. Les seuils d'apparition d'effets sont très différents d'un organe à l'autre, c'est pourquoi il est possible, sur la base des symptômes observés mais également de leur délai d'apparition d'estimer un niveau d'exposition. En effet, les syndromes d'une irradiation aiguë se manifestent selon plusieurs phases. Généralement la première phase, phase prodromique, dure de quelques heures à quelques jours et se manifeste le plus souvent par les symptômes suivants : diarrhée, nausée, vomissement, anorexie (manque d'appétit), érythème (rougeurs de la peau). Il s'ensuit une période de latence, d'apparente rémission, d'autant plus courte que l'irradiation a été sévère ; elle dure de quelques heures à quelques semaines. Enfin, survient la phase aiguë, qui se manifeste par un vaste spectre de symptômes possibles, qui peuvent mener au décès de la victime. Les symptômes les plus fréquents sont liés à des troubles hématopoïétiques (production des cellules sanguines), gastro-intestinaux, cutanés, respiratoires et cérébraux-vasculaires (Annexe I). La méthode METREPOL<sup>5</sup> (Fliedner et al., 2001) permet, en classifiant et pondérant les différents indicateurs des atteintes aux systèmes hématopoïétique, gastro-intestinaux, neurologiques et cutanés, d'évaluer la gravité d'une irradiation par rapport à une échelle qui, comporte quatre niveaux : faible, modéré, sévère et fatal. La réalisation d'examens hématologiques réguliers dans les heures et les jours suivant l'irradiation permet, en suivant **l'évolution de la formulation sanguine** (numération des lymphocytes, leucocytes et plaquettes en particulier), d'estimer la sévérité de l'irradiation (Silini & Guskova, 1991). A titre d'exemple, la **Figure I.3**, donne l'évolution de la pente lymphocytaire en fonction du temps après exposition et en fonction de la sévérité de l'irradiation.

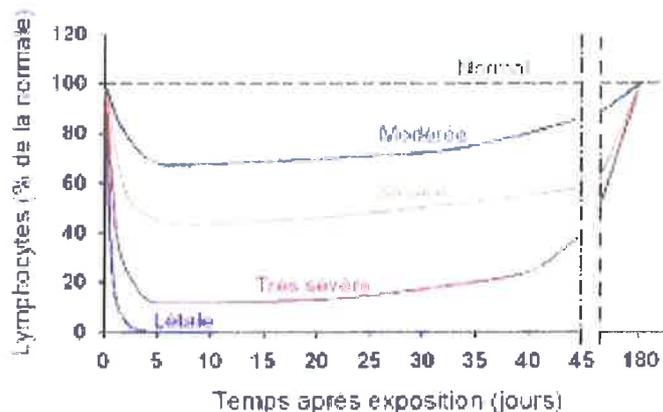


Figure I.3 : évolution de la concentration lymphocytaire en fonction du temps après exposition et en fonction de la sévérité de l'irradiation (illustration IRSN).

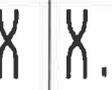
<sup>5</sup> Cette méthode a été transcrite dans un logiciel disponible sur le site suivant <http://www.remm.nlm.gov/ars.html>

## Chapitre I Contexte et objectifs

Le monitoring **d'indicateurs biologiques**, telle que la protéine Flt3-ligand par exemple, donne également des informations précieuses quant à l'atteinte des centres hématopoïétiques et a une fonction prédictive sur l'évolution d'une forte aplasie (Bertho et al., 2008). D'autres indicateurs biologiques, telles que la citrulline et l'amylase du sérum, donnent respectivement des informations quand à l'atteinte de la muqueuse de l'intestin grêle et des glandes parotides (Guipaud & Benderitter, 2009). Des prélèvements réguliers peuvent ainsi être effectués pour suivre l'évolution de ces paramètres dans le temps et permettent également de renseigner sur les altérations fonctionnelles des organes cibles. En complément, sont mis en œuvre des techniques de reconstitution d'accident ou de dosimétries rétrospectives, biologiques ou physiques. Il n'y a pas de méthode « standard » ou plus pertinente qu'une autre d'un point de vue universel. Ces techniques sont bien souvent complémentaires et leur mise en œuvre dépend du type d'accident (exposition localisée ou au niveau de l'ensemble du corps), du type de rayonnement (cas spécifique avec les neutrons pour l'activation), du délai après irradiation, de l'accès possible au site de l'accident et/ou aux patients pour la biodosimétrie (prélèvements biologiques), et à la connaissance des circonstances et des paramètres de l'accident.

### B.3 La dosimétrie biologique

Concernant la dosimétrie biologique, les techniques de **cytogénétiques** sont de loin les plus répandues. Parmi ces techniques, le dénombrement des **chromosomes dicentriques** dans les lymphocytes, phénomène induit par un échange de matériel génétique entre deux chromosomes (Fig. I.4), est utilisé en routine à l'IRSN et dans quelques autres laboratoires dans le monde (Roy et al., 2007 ; Blakely et al., 2009) depuis plusieurs dizaines d'années et a fait l'objet d'une standardisation par l'ISO (ISO, 2004).

Atteinte					
Type d'aberrations chromosomiques					
	Restauration	Fragment	Anneau Inversion	Dicentrique	Translocation

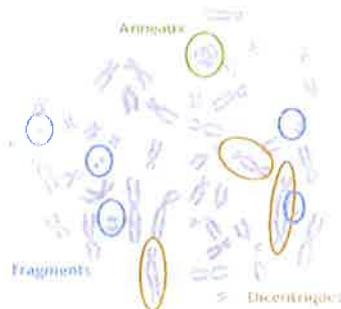


Figure I.4 : représentation schématique des types d'aberrations chromosomiques et exemple d'un dénombrement de chromosomes dicentriques dans le noyau cellulaire au stade de métaphase (Illustration IRSN).

## Chapitre I Contexte et objectifs

D'autres techniques de dosimétrie biologique sont également disponibles ou en cours de développement pour répondre aux différents types de scénarios d'accident (exposition ancienne, tri de population, etc.). On peut notamment citer pour la cytogénétique, les techniques de **FISH** (Fluorescence In Situ Hybridization), le **CBM** (Cytokinesis Block Micronucleus), le **PCC** (Premature Chromosome Condensation). En plus de ces techniques bien établies, de nombreux travaux sont menés avec des techniques de génétiques (mutations somatiques et expression de gènes) et d'analyse de protéines ( $\gamma$ -**H<sub>2</sub>AX**, C Reactive Proteine, etc.). Plusieurs articles récents en font une revue détaillée avec comparaison des performances et des principales caractéristiques (Alexander et al., 2007 ; Fattibene & Wojcik, 2009, Ainsbury et al. 2011). Les techniques de dosimétrie biologique permettent d'estimer la dose dans le sang circulant qui peut être assimilé à la dose moyenne reçue par l'organisme. Pour les dicentriques, des modèles statistiques (Dolphin et Qdr) permettent d'évaluer un degré d'hétérogénéité de la distribution de la dose pour des volumes irradiés dépassant 20% du volume corporel total (Dolphin, 1969 ; Sasaki & Myata, 1968 ; Voisin et al., 2000).

### B.4 La dosimétrie physique

Les seules techniques permettant aujourd'hui d'estimer la distribution de la dose dans le cas où cette distribution est hétérogène ou localisée sont les techniques de reconstitution dosimétrique d'accident ou de dosimétrie physique. Les **techniques de reconstitution dosimétrique d'accident** consistent à reproduire le plus fidèlement possible l'accident par une **expérience** ou par une **simulation numérique** pour estimer la distribution de dose dans l'organisme ou dans des organes ciblés. Les **techniques expérimentales** consistent à irradier dans des conditions similaires à celle de l'accident des fantômes anthropomorphes constitués d'un matériau équivalent tissu que l'on équipe de détecteurs actifs ou passifs (Fig. I.5) pour estimer les doses aux points désirés<sup>6</sup>.

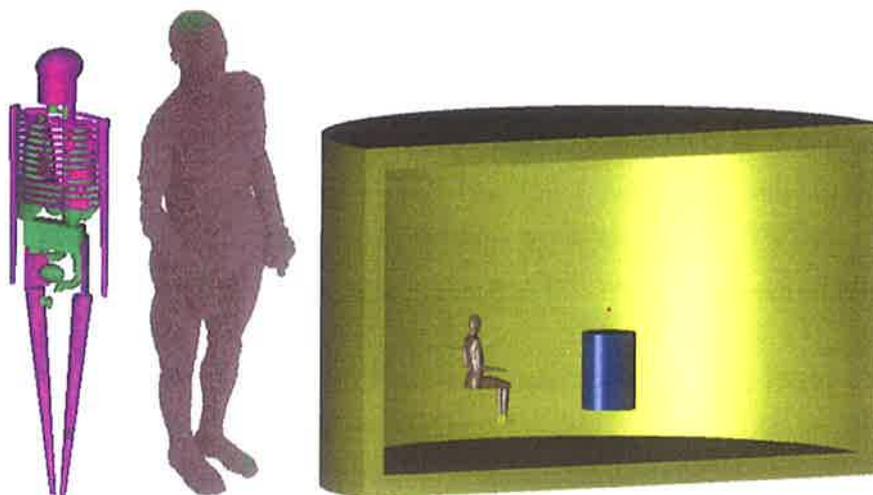


*Figure I.5 : Mannequin anthropomorphe équivalent tissu de type Alderson-Rando. Ce fantôme constitué de tranches permet le positionnement de dosimètres (points blancs) dans tout le volume du fantôme permettant ainsi de réaliser une cartographie de dose.*

<sup>6</sup> Des techniques de moulage de main en matériau équivalent tissu peuvent être également mise en œuvre dans le cas d'exposition des mains (e.g. préemption de source)

## Chapitre I Contexte et objectifs

Les **techniques numériques**, mettent en œuvre des codes de calcul permettant de simuler le transport des particules et les dépôts d'énergie dans la matière. Ces codes sont généralement basés sur la méthode **Monte Carlo** (Buffon, 1777) et associés à des fantômes numériques qui permettent de modéliser la géométrie et les matériaux du corps humain (Williams et al., 1986). Ces fantômes numériques sont, soit élaborés à l'aide d'équations mathématiques qui délimitent le volume des organes (fantôme mathématique), soit reconstitués à partir d'images d'examen tomodensitométriques ou IRM par segmentation en voxels (fantôme voxelisé) (Fig. I.6).



*Figure I.6 : Représentation 3D d'un fantôme mathématique, d'un fantôme voxelisé et exemple de modélisation 3D d'une géométrie d'irradiation (Illustration IRSN).*

Ces techniques de reconstitution d'accident sont très puissantes, car elles permettent d'estimer la distribution de la dose dans l'organisme, mais elles impliquent une très bonne connaissance des circonstances et des paramètres de l'accident. Les techniques expérimentales, quant à elles, nécessitent de pouvoir reproduire les conditions d'exposition (Frank et al., 2006). Dans la pratique, les reconstitutions expérimentales sont assez rarement utilisées, au profit des techniques numériques. Néanmoins, dans certains cas, l'approche expérimentale peut être plus facilement mise en place qu'une approche par calculs, en particulier lorsque l'installation est complexe à simuler. De manière générale, il est bien souvent difficile de disposer d'une description précise de l'accident, notamment en ce qui concerne les durées d'exposition et la distance entre la source d'irradiation et la victime, ceci même si les témoignages peuvent être recueillis rapidement. Les données d'entrée utilisées pour la reconstitution tiennent compte des témoignages, mais également de paramètres physiques de l'exposition (activité de la source, nombre de fissions, présence d'écran, etc.), de l'apparition des signes cliniques et des résultats de la dosimétrie biologique. Même si la durée de l'exposition est inconnue, il est possible néanmoins de calculer une distribution relative qui peut être normalisée par exemple par rapport aux résultats de la dosimétrie biologique (Huet et al., 2008) ou à la mesure de la

## **Chapitre I Contexte et objectifs**

dose en un ou plusieurs points de l'organisme par des techniques de dosimétrie rétrospective (Clairand et al., 2006). Ces techniques de reconstitution dosimétrique d'accident, quelles sont expérimentales ou numériques, sont utilisées en routine à l'IRSN en cas d'accident.

Les **techniques de dosimétrie rétrospective** qui ont été utilisées pour les accidents radiologiques sont principalement basées sur la **spectroscopie par résonance paramagnétique électronique** (RPE) (Wu et al., 1998 ; Trompier et al. 2009) mais également sur la **thermoluminescence** (TL) (Wu et al., 1998 ; Woda et al., 2009) et la **mesure de l'activation neutronique** dans le cas spécifique d'une irradiation neutronique (Delafield, 1988). Ces techniques permettent de mesurer de manière absolue des doses sur des prélèvements biologiques de la victime (émail dentaire et tissus osseux mesurés par RPE ; prothèse dentaire par TL ; cheveux, ongles, sang par spectroscopie gamma ou comptage beta pour l'activation), des matériaux provenant des effets personnels de la victime (verre de montre par TL ou RPE, médicaments et confiseries par RPE, pièces métalliques activées par spectrométrie gamma, etc.) ou sur des matériaux provenant de l'environnement de la victime (céramique par TL, sucres par RPE, etc.). Il est à noter que l'éventail de matériaux pour lesquels il est a priori possible d'estimer une dose à partir d'une mesure RPE est relativement large (Greenstock & Trivedi, 1992 ; Trompier et al., 2009). La plupart des matériaux présentant des signaux radio-induits (ongles, cheveux, plâtre, polymères, textiles, etc.) n'ont pas, ou peu, été étudiés pour des applications en dosimétrie d'accident ou du moins aucun protocole de mesure validé n'est disponible ou n'a été publié à ce jour, à notre connaissance.

**La spectroscopie par RPE** onde continue en bande X (7-12 GHz) est la technique la plus couramment utilisée en dosimétrie, parce qu'elle présente le meilleur compromis entre sensibilité et reproductibilité de la mesure et qu'elle présente peu de difficultés à mettre en œuvre. La spectroscopie RPE consiste à observer l'absorption d'une micro-onde par des électrons non appariés placés dans un champ magnétique intense. La quantité d'énergie absorbée est proportionnelle à la quantité d'espèces paramagnétiques (ion, radical libre, défaut, etc.) présents dans l'échantillon. Sous l'effet d'une irradiation, des espèces paramagnétiques sont parfois produites en proportion de la dose absorbée dans l'échantillon, ce qui permet donc, à partir de l'évaluation de la quantité produite, d'estimer une dose. Cette technique est utilisée en routine sur des biopsies de tissus calcifiées pour la dosimétrie d'accident. Il s'agit principalement des tissus osseux, matériaux le plus pertinent dans les cas d'irradiations localisées et parfois d'émail dentaire ou de dentine. Les autres matériaux (verres, sucres, etc.) sont rarement disponibles et parfois sans pertinence au regard de leur localisation par rapport à une irradiation hétérogène. La spectroscopie RPE s'est imposée au fil des années comme une technique de référence, bien souvent incontournable pour la dosimétrie rétrospective d'accident. Cette technique est opérationnelle à l'IRSN sur les tissus calcifiées (émail dentaire, tissus osseux et dentine) (IAEA, 2000 et 2004a, Ivannikov et al., 2004 ; Wieser et al., 2005 ; Clairand et al ; 2006 et 2008 ; Trompier et al., 2007, 2008), les

sucres (sucrose, lactose, glucose, etc.) et des additifs alimentaires tels que l'acide ascorbique ou le sorbitol (Hervé et al., 2006).

### C. DU RISQUE ACCIDENTEL AU RISQUE TERRORISTE

Pour la plupart des cas d'accidents répertoriés, le nombre de victimes présentant des syndromes d'irradiation aiguë est généralement faible, au maximum de l'ordre de quelques individus, ce qui n'exclut pas des scénarios de plus grande ampleur (Tchernobyl - Ukraine 1986 ; Goiânia - Brésil, 1987). Goiânia<sup>7</sup> est à ce jour, après Tchernobyl, l'un des accidents les plus graves en termes de conséquences sanitaires (IAEA, 1988). La dissémination de 51 TBq de Cs-137 dans un quartier de la ville de Goiânia a entraîné 4 décès, des brûlures radiologiques sévères pour 28 personnes, 249 cas de contamination interne et a conduit à contrôler 112000 personnes, ce qui a nécessité la mise en place d'une organisation et d'une logistique très conséquente. Cet exemple illustre bien quelles pourraient être les conséquences d'un acte de terrorisme radiologique, tant en termes de dommages aux victimes, qu'en termes de désorganisation socio-économique et également les moyens et l'organisation de gestion de la crise à mettre en place. On comprend bien que, compte tenu des conséquences potentielles d'un acte de malveillance, des plans d'actions d'urgence ont été ou sont mis en place pour tenter de parer aux différents scénarios envisageables. Si l'ampleur de cette menace est nouvelle, de nombreux cas d'acte de malveillance ont été déjà répertoriés ; empoisonnement (affaire Alexander Litvinenko, Harrison et al., 2007), dispersion de radionucléides, meurtre par exposition à une source radioactive (homicide de Vladimir Kaplun, Moscou, 1993, (Ilyin et al., 2004) et tentative d'homicide à Irkutsk, 1991 (Krasniouk, 2004)), attaques de sites nucléarisés<sup>8</sup>, actes de sabotage sur des installations nucléaires<sup>9</sup>, etc.

Ces différents exemples montrent toute l'étendue des menaces possibles, sans oublier la menace d'un engin thermonucléaire, prise très au sérieux outre atlantique (Gougelet, 2010). On peut classifier les différents scénarios en deux grandes familles ; les **scénarios** dits « **événementiels** » et ceux dits « **insidieux** » (de Revel, 2005). L'exemple emblématique du scénario événementiel est celui de la « bombe sale ». Le lieu et l'instant de l'évènement étant connu, les victimes sont facilement identifiées et la gestion en est facilitée car elles sont localisées au même moment sur un même lieu. En France, la doctrine de l'emploi des moyens de secours et de soins suite à « la mise en évidence de la dispersion volontaire d'un agent radiologique potentiellement contaminant » est décrite dans la circulaire 800<sup>10</sup>. Les équipes d'interventions des services de l'état sont régulièrement entraînées à la gestion de tels événements (Giordan, 2006). Cette circulaire ne concerne pas les autres types de

<sup>7</sup> L'accident de Fukushima, n'a pas entraîné à ce jour de décès liés à des syndromes d'irradiation aiguë

<sup>8</sup> cf. <http://www.johnstonsarchive.net/nuclear/radcrit.html>

<sup>9</sup> cf. <http://www.johnstonsarchive.net/nuclear/radcrit.html>

<sup>10</sup> Circulaire n°800/SGDN/PSE/PPS du 18 février 2011 disponible sur <http://www.circulaires.gouv.fr/>

scénarios possibles d'usage malveillant de substances radioactives. Pour les autres scénarios, il n'y a pas de circulaire décrivant de manière précise la gestion de crise et la mise en œuvre des moyens, mais ce sont les principes généraux de gestion d'une crise NRBC décrit dans le plan gouvernemental « Pirate NRBC<sup>11</sup> » qui s'applique.

Dans les scénarios dits « insidieux », il n'y a plus ni unité de lieu, ni unité de temps, la découverte de l'événement n'est pas immédiate et peut être fortuite. Elle passe par l'identification des conséquences sanitaires, mais qui peuvent être réalisées à différents endroits par différents professionnels de santé et traitées de manière individuelle jusqu'à ce que l'incidence des cas amène les autorités à envisager et identifier un scénario de malveillance insidieux. Du temps nécessaire à identifier la ou les sources d'exposition dépendra le nombre de victimes, victimes qui devront être identifiées parmi la population. A titre d'exemple, en 2005, à Mumbai (Inde) un déséquilibré mental a transporté dans un train une source d'Ir-192 provenant d'un gammagraphe (IAEA, 2005). La source était de faible activité et l'homme l'a rapidement jeté par la fenêtre du train. On peut facilement imaginer les conséquences dans la gare de Mumbai, deuxième au monde en termes de trafic voyageurs (1,2 millions de voyageurs par jour), si la source avait été de plus forte activité et abandonnée dans la gare. Si les scénarios insidieux recouvrent également d'autres possibilités, notamment la dispersion de contaminations radioactives (dans l'eau de boisson, système de ventilation de bâtiment, par voie aérienne, etc.), **le travail de cette thèse se rapporte principalement au type de scénario présenté ci-dessus, à savoir, l'utilisation d'une source « isolée » dans un lieu public.** Ce type de scénario, qualifié de RED (Radiation Exposure Device) ou IRD (Improvised Radiation Device) dans le projet européen MASH est identifié comme nécessitant un travail important en termes d'organisation, de coordination, de développement des communications, de capacité de traitement et également en termes de méthodes d'identification des victimes (Baker et al., 2011).

## D. SPECIFICITE DE LA GESTION DES EVENEMENTS INSIDIEUX – TRI DE POPULATION

La gestion de scénarios événementiels de type bombe sale est abondamment décrite dans la littérature spécialisée et intégrée dans les plans d'urgence nationaux. A l'inverse, pour les scénarios de type insidieux, les choses semblent moins bien établies et il est difficile de trouver des documents les détaillant et des informations quant aux ordres de grandeur attendus de victimes ou de personnes à trier. A titre d'exemple, sur la totalité du TMT handbook<sup>12</sup>, ouvrage de référence en la matière (Rojas-Palma C. et al, 2009), seules quelques pages y sont consacrées, la difficulté de répondre à ces situations et le manque de techniques

---

<sup>11</sup> Les données du plan Pirate NRBC sont classées

<sup>12</sup> Guide de référence sur les méthodes de Tri, de Monitoring et de Traitement des victimes (<http://www.tmthandbook.org/>)

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

de tri disponibles y est particulièrement soulignée. Dans les documents techniques produits par l'AIEA, aucune référence n'est faite à ce type de crise, (IAEA, 1997 ; IAEA, 1999).

La problématique du tri pour les scénarios dits insidieux amène les questions suivantes :

- quel sera le temps nécessaire pour détecter un acte de malveillance ? et sur quelles durées le public sera-t-il exposé ?
- quel sera le nombre de personnes à accueillir dans les services de santé et quel sera le nombre de victimes avérées par grade d'exposition ?
- est-il possible d'effectuer un tri suffisamment précis uniquement sur les signes cliniques et l'hématologie ?
- quelle est la capacité de tri du système de santé ?
- à partir de quelle phase sont utilisées les techniques de dosimétrie rétrospective pour le tri et la gestion des victimes potentielles ou avérées d'irradiation ?

Le paramètre principal qui conditionne tous les autres paramètres dans ce type de scénario est le temps au bout duquel l'acte de malveillance sera détecté. Le nombre de personnes potentiellement ou réellement exposées dépend directement de ce paramètre clé. Selon que la ou les sources sont juste déposées (sur le sol ou dans une poubelle par exemple) ou parfaitement dissimulées, il est vraisemblable que la détection se fera de manière différente et dans des délais extrêmement variables.

Dans le premier cas, la découverte et l'identification devraient être relativement rapides, les rames ou wagons étant nettoyés quotidiennement et les poubelles vidées régulièrement, ce qui impliquerait une durée d'exposition du public relativement courte, de quelques heures à une journée environ, et ce indépendamment du type de source ou de son activité. C'est le cas qui correspond aux scénarios les plus étudiés.

Si par contre, les sources sont bien dissimulées, alors la détection se fera vraisemblablement par l'identification de symptômes d'irradiation dans la population. Donc, la détection dans ce cas précis, dépend lui-même d'autres paramètres, comme le délai d'apparition des symptômes et leur sévérité, de la réactivité du corps médical et des autorités pour interpréter les symptômes, croiser les données, déclencher l'alerte et au final localiser et identifier l'origine de l'exposition. L'apparition des symptômes est elle-même conditionnée par deux principaux paramètres ; les débits de dose à proximité de la source et plus particulièrement aux emplacements où peuvent stationner des personnes (liés aux caractéristiques de la source et à sa localisation) et le temps passé à proximité de la source. Par exemple, selon qu'il s'agisse d'une rame de métro, d'un train de banlieue ou encore d'un train grande ligne par exemple, la durée d'exposition variera de l'ordre de quelques minutes à quelques heures.

L'activité, le type d'émission radiative, le conditionnement, de la source ou des sources utilisées, vont conditionner les débits de dose. Selon qu'il s'agisse d'une source de relativement faible activité ou non, émettant des gammas ou des betas, la cartographie de débits de dose sera radicalement différente, ce qui a un impact direct sur le nombre de

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

personnes exposées (périmètre autour de la source) et sur la sévérité des symptômes (à durée égale d'exposition). Au final, le délai d'alerte sera dépendant des niveaux maximum d'exposition. En dessous d'une certaine valeur d'exposition, disons entre 1 et 3 Gy, il n'est pas certain que ce type d'attaque puisse être détectée ou du moins dans des délais courts par l'unique analyse des symptômes, spécialement en période hivernale, ou les symptômes peuvent être confondus avec ceux des maladies saisonnières (grippes, gastroentérites, etc.). On peut rappeler que dans le cas de l'accident de Fleurus (Belgique, 2006), la victime avait reçu une dose moyenne corps entier de l'ordre de 4,5 Gy, et bien que celle-ci ait des connaissances en matière de radioprotection et travaillait effectivement quotidiennement à proximité de sources fortement radioactives, n'a commencé à envisager une possible surexposition qu'au bout de trois semaines, lorsque les premiers signes d'alopecie se sont manifestés (Huet et al., 2008). De manière générale, dans la plupart des accidents radiologiques impliquant des sources orphelines ou perdues, le délai d'alerte était généralement au mieux de quelques semaines, malgré des symptômes parfois importants. Bien entendu, si le nombre de victimes est élevé, cela peut constituer un élément favorable à la détection par recoupement d'un scénario insidieux.

Ainsi, plus les symptômes seront de grade important et plus la détection sera rapide, ce qui jouera dans le sens d'une réduction du nombre de personnes exposées. Dans le cas de sources de faible activité placées dans le métro (durée de trajet courte, 15 minutes en moyenne) par exemple, il est peu probable que l'exposition entraîne des symptômes ou donne lieu à des effets déterministes à court terme.

Au final, il n'est pas du tout certain que la détection d'un tel événement puisse intervenir dans des délais courts (< 48 heures). Hors, dans ce type de scénario, la gestion médicale et le tri sur la base des symptômes et d'examens hématologiques (pente lymphocytaire, neutropénie, etc.), sont optimales dans les 48 premières heures après exposition, (Gourmelon et al., 2010). Si les délais sont de l'ordre de plusieurs semaines, quelle sera l'efficacité des examens hématologiques ? Pour des doses élevées (> 4-5 Gy), les victimes devraient être relativement facilement identifiables, même dans des délais supérieurs à ceux envisagés habituellement. Mais pour des doses comprises entre 1 et 2 Gy, niveaux pour lesquels des soins immédiats ne sont pas forcément nécessaires, les victimes devront tout de même être identifiées pour mettre en place un suivi médical à plus long terme. L'identification des victimes sera également importante pour rassurer les personnes encore plus faiblement exposées.

Il apparait que les réflexions sur ces scénarios et la mise en place de contre mesures sont encore peu avancées. La place et le rôle des techniques de tri basées sur les techniques de dosimétrie rétrospective n'ont pas encore été pleinement pensées et dépendront directement du nombre de victimes potentielles et avérées. Il est fort probable qu'une organisation souple à géométrie variable sera nécessaire. Si le nombre de personnes à trier est de l'ordre de la centaine ou du millier, on peut imaginer que ces techniques seront mises en œuvre en

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

parallèle avec les techniques d'hématologie et pourront être utilisées pour affiner les estimations de doses dans une deuxième phase pour les victimes avérées.

L'un des paramètres clés de cette réflexion est le dimensionnement du dispositif à mettre en place. Ce dimensionnement dépend du nombre de sources utilisées<sup>13</sup>, du délai nécessaire à leur découverte, de leurs caractéristiques physiques (activité, énergie et type de rayonnement) et, bien sûr, du ou des lieux où elles auront été placées. Le délai de découverte des sources peut être particulièrement long si ces sources ne sont pas uniquement abandonnées mais par exemple déplacées de manière régulière d'un lieu à un autre multipliant ainsi les lieux d'expositions. On comprend aisément que le nombre de personnes potentiellement exposées et devant être triées peut alors être très supérieur, de plusieurs ordres de grandeur, au nombre de victimes estimées pour un scénario de type « bombe sale ».

L'aspect psychologique est un autre paramètre à prendre en compte dans ce type d'événement. Les retours d'expérience de l'accident radiologique de Goiânia ou de l'attentat au gaz sarin dans la ville japonaise de Matsumoto en juin 1994 et dans le métro de Tokyo en mars 1995 sont très intéressants de ce point de vue. Un nombre important de personnes présentait des nausées et des vomissements, qui sont l'un des premiers symptômes d'une irradiation ou d'une intoxication au sarin, bien qu'elles n'aient pas été exposées (IAEA, 1988 ; Okumura et al., 1988). Pour les attentats de grande ampleur de type NRBC, si l'on s'intéresse au taux de personnes exposées, sur celles qui ont fait l'objet d'un examen médical de tri, c'est le radiologique qui entraîne le taux le plus important. Ce taux était de 1:400 pour Goiânia, de 1:100 pour l'attaque à l'anthrax aux USA en 2001 et de 1:4 pour l'attaque au sarin à Tokyo (IAEA, 1988 ; Okumura et al., 1988 ; Blank et al., 2003). Cet afflux massif de personnes non exposées vers les services d'urgence est un paramètre important qui devra entrer en ligne de compte dans le dimensionnement des capacités de tri. Le seul calcul du nombre de victimes, d'après des paramètres physiques (débit de dose, durée moyenne à distance et fréquentation) mènera à une sous-estimation des besoins. Dans le doute, nombreux sont ceux qui, de bonne foi, ressentiront ces symptômes du fait du stress ou d'autres facteurs. Nombreux seront ceux qui auront par ailleurs besoin d'une réassurance psychologique, qui ne pourra être en partie donnée que par le résultat d'un examen médical négatif. Le pourcentage acceptable de faux négatifs, c'est-à-dire de victimes avérées non prises en charge, ou de faux positifs, personnes traitées alors qu'elles n'avaient pas été exposées, est également un élément à prendre en compte. En effet, une proportion importante de faux positifs aurait un impact direct sur la gestion des victimes avérées, les stocks de traitement (facteurs de croissance par exemple). Quel sera alors le rôle de la dosimétrie rétrospective ? Sera-t-elle utilisée en

---

<sup>13</sup> Depuis le 11 septembre, la plupart des attentats majeurs visaient de manière simultanée plusieurs cibles (attentats du 11/09/01 avec 4 avions, Madrid 11/03/04 10 bombes dans 4 trains, Londres 7/07/05 4 bombes dans 3 stations de métro et un bus). Cette technique a été très utilisée également en Irak.

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

complément dès la première phase de tri, et/ou alors en deuxième ligne défense pour affiner le tri et estimer les doses pour les victimes les plus atteintes ?

Plusieurs articles de comité d'experts ont recommandé de développer un ensemble de tests permettant de répondre à l'ensemble des cas possibles d'irradiation (localisées, hétérogènes, etc.), mais également, de mettre à disposition des tests simples et rapides, afin de disposer de capacités de tri élevées dans des délais les plus courts.

En résumé, les scénarios insidieux, du fait de leur spécificité, seront les plus difficiles à gérer, tant par leur ampleur que par la multiplicité des scénarios qui ne permettent pas d'établir des plans de réaction précis. En effet, l'absence d'information, du moins dans les premières phases de la gestion de la crise, sur le début, la durée de l'événement, le nombre de sources, le nombre de victimes, rend compliquée la gestion d'une telle crise, dont la complexité sera encore accrue par l'aspect psychosocial et socio-économique. La gestion de ces scénarios demandera de la souplesse et de la réactivité mais également tout un ensemble de techniques de dosimétrie rétrospective qui reste à développer, sans compter l'aspect organisationnel, les opérations de tri et de prise en charge, compte tenu du nombre de personnes à trier, ne pouvant pas être a priori centralisées en un lieu unique.

## **E. POTENTIEL ET APPORT DE LA DOSIMETRIE PHYSIQUE POUR LE TRI DE POPULATION**

Le développement de nouvelles techniques de dosimétrie biologique ou l'amélioration des capacités des techniques existantes font l'objet depuis de nombreuses années d'importants travaux de recherches nationaux ou internationaux. Afin de développer les capacités de ces techniques, de nombreuses initiatives visent à la mutualisation des moyens et à la création de réseaux nationaux, régionaux (projet européen TENEB (Wojcik et al., 2009)) ou internationaux (RANET (IAEA, 2010) ; Biodosnet (Blakely et al ; 2009)). L'intérêt pour les techniques de dosimétrie physique est plus récent. Ces techniques, bien qu'elles aient prouvé à de multiples occasions leur efficacité et leur pertinence, n'en demeurent pas moins confidentielles, du fait du faible nombre de laboratoires possédant les compétences requises, de l'absence de protocoles établis et surtout par le caractère habituellement invasif des prélèvements réalisés pour ce type d'expertise. En effet, la plupart des expertises réalisées ces dernières années l'ont été sur des biopsies de **tissus osseux et d'émail dentaire par spectroscopie RPE**. Les tissus osseux et l'émail dentaire sont les matériaux les plus souvent utilisés dans le cadre **d'expertises dosimétriques** du fait de la très grande stabilité des signaux RPE radio-induits et d'une bonne sensibilité aux rayonnements ionisants. Ces caractéristiques ont ainsi permis de déterminer des doses liées à des expositions accidentelles anciennes, mais également celles dues à des expositions faibles et chroniques<sup>14</sup>. Les expertises

---

<sup>14</sup> Les limites de détection de l'émail dentaire sont de l'ordre de 30 à 50 mGy pour les meilleurs laboratoires

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

dosimétriques sont réalisées, dans le meilleur des cas, plusieurs semaines après l'exposition et plus généralement des mois ou des années plus tard. De ce fait, les matériaux présentant des signaux instables (polymères, cheveux, ongles, cotons, etc.) avec des demi-vies de plusieurs jours ou semaines, sont donc difficilement utilisables. Pratiquement aucun cas d'application n'a d'ailleurs été reporté dans la littérature internationale. D'autres matériaux, tels que **les sucres ou les verres**, bien que présentant de très bonnes propriétés dosimétriques, tant en stabilité qu'en sensibilité, n'ont été utilisés qu'à de très rares occasions. En effet, il est également nécessaire que ces matériaux soient disponibles dans les effets personnels des victimes ou dans leur environnement immédiat. Le retour d'expérience sur ces 30 dernières années montre que ces matériaux étaient en fait rarement disponibles et/ou récupérables. A deux reprises des sucres ont permis d'estimer des doses aux victimes (Sagstuen et al., 1983; Shirashi et al., 2002a) et dans deux autres cas d'estimer les doses à la population suite aux accidents de Tchernobyl et de Tokai Mura (Nakajima et al., 1994 ; Shirashi et al., 2002b). Sur l'ensemble des accidents dans lesquels l'IRSN a été jusqu'à présent impliqué, aucune des victimes n'avait sur elle des matériaux contenant des sucres ou édulcorants par exemple. Pour les verres, un seul exemple d'utilisation est répertorié. Il s'agissait d'un accident en Chine et la dose avait été estimée par spectroscopie RPE et également par TL sur le verre de la montre d'une des victimes (Wu et al., 1998).

Si l'utilisation de la spectroscopie RPE est considérée comme une technique pertinente pour la dosimétrie d'accident radiologique, l'application pour la thématique du tri semble être plus délicate si l'on se limite aux techniques et matériaux actuellement opérationnels. Cependant, il convient de prendre en compte les éléments spécifiques de contexte liés à la thématique du tri, les progrès des techniques de mesure RPE, et l'évolution des matériaux ou l'apparition de nouveaux matériaux dans les objets de la vie quotidienne.

Concernant **le contexte du tri**, il faut souligner, que pour un certain nombre de scénarios envisagés, étant donné que les prélèvements des matériaux irradiés seront probablement réalisés dans des délais relativement courts, c'est-à-dire de quelques jours à quelques semaines, la décroissance du signal RPE radio-induit dans le temps n'est plus forcément un critère rédhibitoire pour le choix des matériaux mesurables par RPE, comme cela l'était pour les cas classiques d'accident radiologiques pour lesquels les délais étaient souvent supérieurs à plusieurs semaines ou mois (cf. polymères, ongles, etc.).

Concernant **l'évolution des techniques de mesure RPE**, il faut considérer le développement de nouvelles approches pour la mesure de l'émail dentaire, qui reste le meilleur matériau pour la dosimétrie RPE. D'une part, la mise au point de spectromètre RPE in vivo (bande L, 1-2 GHz) pour la mesure in situ des dents et d'autre part la maîtrise de la spectroscopie RPE haute fréquence (bande Q, 33-50 GHz ou bande K 18-26,5 GHz) sur l'émail dentaire qui permet de mesurer des échantillons de petite masse (1 à 10 mg) avec une bien meilleure sensibilité que la conventionnelle RPE bande X en onde continue, bien que la mauvaise reproductibilité de

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

mesure limite encore ce type d'application et implique des limites de détection encore élevées de ce fait. Les techniques de mesures RPE ont par ailleurs évolué ces dernières années, tant du point de vue de la sensibilité de mesure que de la variété des techniques d'analyses (RPE pulsée, ENDOR, RPE haute fréquence, RPE in vivo), il semble donc opportun de revisiter les matériaux les plus pertinents pour la dosimétrie, tels que les ongles, d'autant plus que les travaux réalisés jusqu'alors étaient parfois succincts ou contradictoires.

Les **progrès dans le domaine de la technologie des matériaux**, notamment dans les objets de la vie courante, nécessitent de reconsidérer un certain nombre d'objets. Ainsi, si les verres minéraux ne sont presque plus utilisés en optique ophtalmique et en joaillerie pour les glaces de montre, ils sont dorénavant présents dans tous les objets électroniques personnels (téléphone portable, lecteur, MP3, tablette numérique, etc.) principalement dans les constituants des écrans et sont par ailleurs très largement diffusés dans la population. De plus, l'apparition de nouveaux matériaux technologiques dans les objets de la vie courante (téléphone, carte, textile, etc.), notamment de nouveaux matériaux synthétiques biodégradables, recyclables ou minimisant les rejets toxiques lors de l'incinération peut justifier la réalisation de mesures préliminaires pour juger du potentiel de ces matériaux.

**Le premier travail de cette thèse a consisté à réexaminer toute la littérature sur les matériaux présentant des signaux RPE radio-induits en fonction de ces nouveaux critères d'application et éventuellement, si nécessaire, à réaliser des tests préliminaires permettant d'orienter les travaux de recherches menées dans la suite de la thèse.** La synthèse de cette revue de littérature a été récemment publiée dans le cadre d'un ouvrage de synthèse sur les techniques de tri (Trompier et al., 2009).

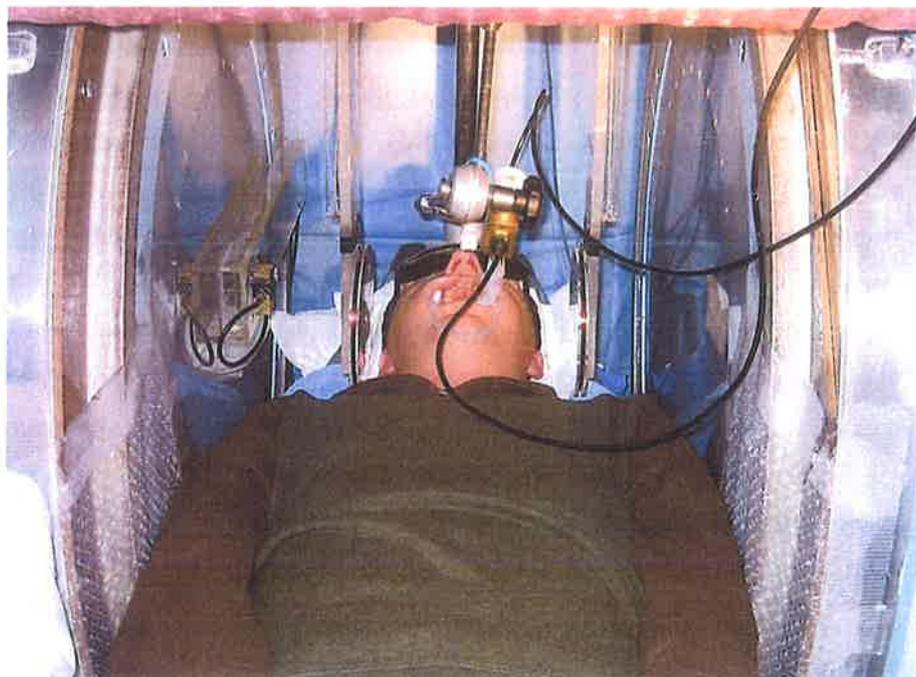
On peut classer les matériaux mesurés par spectroscopie RPE en deux familles principales, d'une part, les **matériaux biologiques humains** (tissus calcifiés, ongles et cheveux) et, d'autre part, les **matériaux technologiques** ou provenant des **effets personnels** des victimes (verres, sucres, polymères, textiles, cuirs, cellulose, produits pharmaceutiques, ivoire, perles naturelles, cuirs, etc.). Les matériaux biologiques présentent l'avantage d'être, par définition, les matériaux les plus disponibles, même si l'on prend en compte les calvities ou les prothèses dentaires. Parmi les **matériaux biologiques**, des protocoles de mesure validés existent essentiellement pour les tissus calcifiés.

### ***E.1 Potentiel pour le tri de la mesure des tissus calcifiés par RPE***

**Les tissus calcifiés**, d'un point de vue dosimétrique, répondent à l'ensemble des critères (pas de perte de signal, bonne sensibilité et faible variabilité interindividuelle). Cependant, leur mesure par les techniques conventionnelles de RPE (spectroscopie RPE bande X en onde continue) se fait sur des biopsies qui nécessitent un prélèvement invasif. Il est donc difficilement envisageable d'utiliser les procédures existantes pour un tri de masse. Néanmoins, deux solutions technologiques ont été proposées pour limiter ou s'affranchir du caractère invasif du prélèvement. D'une part, l'utilisation de spectromètre RPE fonctionnant à

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

plus haute fréquence (bande Q ou K) pour la mesure de mini-biopsies d'émail dentaire. En effet, l'utilisation de la bande Q nécessite des biopsies de l'ordre de quelques mg seulement, à comparer aux dizaines de mg nécessaires en bande X (Romanyukha et al., 2007 ; Gomez et al., 2011). Des tests pratiqués très récemment à l'IRSN en spectroscopie bande Q montrent que le temps de mesure est de l'ordre de la minute pour une limite de détection inférieure au Gy. Cette technique pourrait être directement applicable au tri, sous réserve que le fait de prélever un petit éclat d'émail soit validé par des professionnels de santé. Cependant, outre que la maîtrise de ces spectromètres pour des mesures précises de dosimétrie est toute récente, les spectromètres équipés en bande Q étant peu répandus sur le plan international, cela limite à court terme la capacité opérationnelle en réseau. Une autre approche est basée sur l'utilisation des basses fréquences RPE (bande L, 1,2 GHz) pour réaliser des mesures in vivo, directement dans la cavité buccale des individus (Ishi & Ikeya, 1990, Ikeya, 1993). Cette approche, a été principalement développée ces dernières années au Dartmouth College Medical School (Hannover, USA). Avec des temps d'acquisition de l'ordre de 5 minutes, les résultats publiés par cette équipe indiqueraient que des doses de l'ordre de 2 Gy sont mesurables (Williams et al., 2010). Des tests préliminaires pratiqués par l'IRSN sur l'un des spectromètres du Dartmouth College ne se sont pas avérés concluants principalement du point de vue de la reproductibilité des mesures, des incertitudes associées et de la difficulté de différencier avec un taux acceptable de faux positif ou négatif des dents non irradiées de celles irradiées à 2 ou 3 Gy. Ce spectromètre était équipé d'un aimant permanent dit corps entier (Fig. I.7).



*Figure I.7 : système de RPE in vivo dit corps entiers utilisés pour des applications en dosimétrie des rayonnements ionisants et en oxymétrie (image : Williams et al., 2010).*

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

Si l'on considère que les limites de détection associées à la technique peuvent être compatibles avec les critères du tri, il n'en reste pas moins que toute l'approche méthodologique pour estimer une dose à partir d'un signal mesuré constitue un travail énorme et complexe, si l'on considère le nombre de paramètres pouvant influencer sur le résultat. Du choix de l'antenne de surface (forme, dimension, etc.), à son positionnement (reproductibilité, choix des dents mesurées, et influence du signal provenant des dents voisines.), influence des dents cariées, des plombages ou des résines polymérisés par UV et surtout au choix d'une méthode pour étalonner le système ou générer une courbe d'étalonnage.

De plus les systèmes actuels sont en fait des instruments non mobiles. Dans l'hypothèse de mesures *in vivo*, c'est l'instrumentation qui doit se déplacer vers les lieux d'accueil, le tri étant directement effectué sur ces sites. La mobilité de l'instrumentation devient alors un critère incontournable. A ce jour, plusieurs prototypes de spectromètres mobiles ont été étudiés par l'équipe du Dartmouth College, mais aucun n'a pu atteindre les limites de détection requises à ce jour. Si un tel équipement était disponible, il pourrait être utilisé de la même manière que les moyens mobiles (camions ou trains) actuellement disponibles pour la mesure de la contamination interne.

### *E.2 Potentiel pour le tri de la mesure des tissus kératinisés humains par RPE*

Si l'émail dentaire pose des problèmes du point de vue du prélèvement ou de la mesure *in vivo*, **les ongles et les cheveux** présentent l'énorme avantage d'être très facilement prélevables et mesurables dans les spectromètres les plus courants (onde continue, bande X). Néanmoins, ces matériaux ayant été peu étudiés jusqu'alors, un travail de caractérisation reste à accomplir afin de proposer des protocoles de mesure. Compte tenu du potentiel de ces matériaux (disponibilité et facilité de prélèvement), même si les quelques études datant d'une vingtaine d'années ne sont pas toutes concluantes, il semble intéressant de se pencher à nouveau sur ces matériaux. En effet, les études précédentes n'étaient pas très détaillées et le matériel de mesure a, depuis, considérablement évolué avec des gains significatifs en sensibilité de mesure.

Trivedi & Greenstock avaient identifié les cheveux comme un matériau pertinent pour la dosimétrie d'accident avec une limite de détection de l'ordre du Gy et un délai d'applicabilité du fait de la perte de signal compris entre quelques jours à quelques semaines (Trivedi & Greenstock, 1993 ; Greenstock & Trivedi, 1992). Néanmoins, d'autres travaux ont modéré cette appréciation en mettant en évidence le rôle de l'humidité dans la décroissance du signal radio-induit (Kundynski et al., 1994 ; Remy-Kornak et al., 2006). La principale difficulté dans l'utilisation des cheveux réside dans l'effet de l'humidité sur le signal radio-induit. L'irradiation de cheveux humides n'induit pas de signal RPE et l'humidité ambiante induit une décroissance rapide du signal RPE radio-induit. Le signal radio-induit est détruit lorsque les cheveux sont humidifiés même légèrement. Ces résultats ont été récemment confirmés par une étude détaillée réalisée par Çolak & Özbey (2011) Pour autant, il n'est pas impossible

qu'une composante stable du signal radio-induit et peu intense soit néanmoins présente après humidification, mais cette dernière est sans nul doute difficile à mesurer ou à mettre en évidence du fait du signal RPE intense provenant de la présence de mélanine dans les cheveux.

Les **ongles**, composés de kératine comme les cheveux, ne comportent, par contre, pas de mélanine. De ce fait, les ongles semblent être un bien meilleur candidat pour mettre en évidence une éventuelle composante stable du signal radio-induit. Il faut cependant signaler que le stress mécanique produit lors de la coupe d'un ongle génère des radicaux libres avec un spectre RPE qui se superpose au signal radio-induit (Chandra & Symons, 1987). Pour autant, la signature spectrale de cette composante « mécanique » du spectre RPE des ongles était décrite comme étant différente de celle radio-induite et d'intensité du même ordre de grandeur. **S'il s'avère que l'étude d'un matériau tel que les ongles humains pour des applications en dosimétrie sera sans nul doute complexe, l'enjeu de l'utilisation de ce matériau est très important si l'on considère sa grande disponibilité et la relative facilité de son prélèvement. De plus, il faut également considérer que dans le cas d'irradiations localisées au niveau des mains ou des pieds, situation accidentelle courante (préhension de source), il n'y a à ce jour pas d'autres moyens que de mesurer des biopsies osseuses pour estimer les doses.**

### ***E.3 Potentiel pour le tri de la mesure de matériau biologique non humain par RPE***

Les autres matériaux d'origine naturelle comme **le coton, la laine, la soie ou le cuir** ont été relativement peu étudiés. Ces matériaux d'origine naturelle présentent des signaux radio-induits avec des limites de détection dans le meilleur des cas de l'ordre de 10 Gy. Les signaux radio-induits sont instables et décroissent rapidement à température ambiante. Du fait de la variété des origines de ces matériaux ainsi que des traitements qui peuvent leur être appliqués, une grande variabilité est attendue sur les caractéristiques du spectre RPE avant irradiation et également sur la sensibilité à la dose. Dans ce type d'application, les matériaux mesurés par spectroscopie RPE conventionnelle ou par de nouvelles techniques RPE doivent permettre d'atteindre des limites de détection de l'ordre du Gy, mais surtout ces matériaux doivent être largement présents sur les victimes et avec une variabilité de leurs principales propriétés aussi faible que possible. Il faut signaler que les quelques travaux qui ont été réalisés portaient sur des matériaux neufs. L'expérience du laboratoire sur les tissus provenant de vêtements portés par les victimes d'irradiation montre que des tissus souillés (poussières, graisses, etc.) sont difficilement exploitables et que les signaux RPE avant irradiation en sont fortement affectés (Trompier & Clairand, 2006). La persistance de détergents utilisés dans les poudres de lavage peut également affecter l'analyse par RPE. Il a été montré que le simple fait de manipuler la laine par exemple induit une augmentation du taux de décroissance du signal radio-induit (Pielesz, 2006). De plus, s'il était possible d'isoler une composante stable du signal radio-

## *Chapitre I Contexte et objectifs*

La littérature sur l'étude par RPE de polymères irradiés est abondante, particulièrement dans le domaine des très fortes doses et pour la compréhension des mécanismes de polymérisation ou le développement de nouveaux matériaux. Dans le domaine de doses correspondant aux accidents radiologiques, on peut trouver mention de quelques matériaux polymères (PVC, PE, Nylon) dans deux articles (Dalgarno et Mc Clymont, 1989 ; Wieser et al., 1994). Les conclusions de ces travaux montrent que, tant du point de vue de la stabilité du signal que de la sensibilité dosimétrique, ces matériaux ne semblent pas présenter d'intérêt pour la dosimétrie d'accident ou le tri. Néanmoins, compte tenu de la variété de ces matériaux et de leur constante évolution et de leur utilisation en grand nombre dans la vie courante, il semblait pertinent de réaliser une nouvelle étude sur ces matériaux. Nous en avons ainsi réalisé un certain nombre principalement sur les matériaux présents dans les téléphones portables. Si la plupart de ces matériaux donnent des signaux radio-induits, même à des doses inférieures à 10 Gy, voire de l'ordre de quelques Gy pour certains (PC par exemple), les matériaux les plus courants exhibent une décroissance du signal RPE radio-induit importante dans le temps, le signal dosimétrique principal n'étant a priori plus détecté passé un délai de 5 à 7 jours après irradiation à la température ambiante du laboratoire (20°C) (Trompier et al., 2010). Pour un type de matériau, nous avons néanmoins mis en évidence, un signal radio-induit stable mais de très faible intensité. Ces données ont permis en juin 2011, de réaliser à l'IRSN une première expertise dosimétrique sur le téléphone d'une victime d'irradiation accidentelle. Cependant, après avoir étudié plus d'une centaine de téléphones portables, la variété des matériaux polymères et la variabilité de leur propriétés ne semblait pas indiquer que ces matériaux soient les plus adaptés pour les applications de tri. De plus, comme c'est le cas pour les verres, l'évolution des matériaux, notamment par rapport aux contraintes de recyclage ou d'élimination, induit une évolution des matériaux utilisés dans les éléments constitutifs des téléphones. De ce fait, ces matériaux n'ont pas fait l'objet d'étude plus détaillée et les résultats obtenus ne sont pas présentés dans ce mémoire de thèse.

*Les polymères présents dans les objets électroniques portables, notamment dans les téléphones portables ne sont pas a priori, les matériaux les plus adaptés pour le tri de population.*

### ***E.6 Conclusion***

Au final, parmi tous les matériaux susceptibles d'être envisagés en dosimétrie RPE, les ongles, de part leur présence sur toutes les personnes et leur potentiel d'un point de vue dosimétrique semblent être le matériau le plus prometteur pour les aspects de tri de population. S'il s'avérait que les ongles ne permettent pas d'atteindre les critères liés au tri, d'autres matériaux pourraient être alors envisagés, tels que les verres minéraux et les polymères.

## **F. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire a pour objectif de tenter d'établir la spectroscopie par RPE comme technique de dosimétrie rétrospective utilisable pour le tri de population. D'autres techniques, principalement les techniques de luminescence, font par ailleurs l'objet d'études similaires. Plusieurs autres matériaux (verres minéraux, polymères, émail dentaire) ont été également envisagés au début du travail de thèse et ont fait l'objet d'étude, soit du point de vue de la faisabilité technique (RPE *in vivo*) ou de la variabilité des propriétés (verre minéraux et polymères). Au final, sur la base de ces résultats, des résultats préliminaires obtenus sur les ongles et compte tenu de l'évolution rapide des matériaux utilisés dans les objets électroniques (verres et polymères), les ongles semblaient le matériau le plus pertinent pour les applications de tri.

Dans un premier temps, les études présentées ici avaient pour but d'améliorer la compréhension des différents mécanismes de production et de recombinaison des radicaux libres ou des défauts paramagnétiques mis en jeu aussi bien lors du prélèvement de l'ongle que lors de l'irradiation et dans les heures ou jours suivants. Les premières études ont été menées en RPE bande X en onde continue, qui est la méthode de référence utilisée en dosimétrie RPE des rayonnements ionisants. Néanmoins, un certain nombre de phénomènes ne pouvait être appréhendés uniquement avec cette seule technique de mesure. Ainsi, il a été nécessaire pour progresser dans la compréhension des phénomènes mis en jeu à l'échelle des radicaux ou des défauts d'avoir recours à des techniques RPE dite avancées, RPE pulsée (ESEEM et HYSCORE), à l'utilisation de la RPE en onde continue en bande Q, ainsi qu'à la mesure en onde continue bandes X et Q à basse température.

Le mémoire de thèse est divisé en six chapitres.

Le **chapitre I**, le présent chapitre, présente le contexte et les objectifs de ce travail de thèse.

Le **chapitre II** présente les généralités sur le paramagnétisme et sur la résonance paramagnétique électronique et fait une description des techniques de spectrométrie utilisées. Dans ce chapitre sont également donnés quelques éléments sur la dosimétrie des rayonnements ionisants par spectroscopie RPE ainsi que sur la méthodologie utilisée pour étudier les différents types de signaux RPE mesurés dans les ongles (intrinsèques, parasites, mécano-induits et radio-induits). Une revue des principales propriétés des ongles du point de vue histologique et biochimique est également donnée dans ce chapitre ainsi qu'un état de l'art sur les études portant sur la dosimétrie des ongles par RPE réalisées préalablement à ce travail.

Le **chapitre III** est consacré à l'identification et à l'étude des signaux dits intrinsèques et parasites, c'est-à-dire les signaux présents avant le prélèvement de l'ongle. De manière générale, il est nécessaire en spectroscopie de connaître les caractéristiques de ces signaux car ils peuvent se superposer aux signaux d'intérêt. De plus, ces signaux peuvent éventuellement

## Chapitre I Contexte et objectifs

avoir un intérêt du point de vue dosimétrique. Il n'est pas exclu que l'intensité des signaux présents avant tout stress extérieur (mécanique ou irradiation par exemple), soit modifiée par ces stress et d'une manière telle qu'on pourrait en déduire une relation entre la quantité de stress (dose par exemple) et la variation d'intensité des signaux intrinsèques. Ainsi, par exemple dans les verres, l'intensité des signaux RPE du  $Fe^{3+}$ , pour certaines compositions de verres, peut être modifiée après irradiation (Griscom, 1998).

Les signaux dits parasites sont définis comme ne provenant pas de l'ongle, mais par exemple des vernis ou autres substances chimiques appliqués sur les ongles. L'étude a uniquement porté sur les vernis de cosmétique, mais certaines activités professionnelles (manipulation de peintures, ciments, etc.) ou certaines habitudes (tabagie par exemple) peuvent mener à des contaminations de l'ongle par voie externe qui sont susceptibles d'induire également des signaux RPE parasites, notamment dans le cas d'ions métalliques.

Etant donné que ces signaux peuvent interférer avec les signaux radio-induits, et parfois en empêcher toute mesure, il était nécessaire d'identifier ces signaux et de préciser leur nature pour le cas échéant proposer des méthodes visant à leur élimination.

Les **chapitres IV et V** portent respectivement sur l'identification et l'étude des composantes du signal induites par le stress mécanique (MIS) et par l'irradiation (RIS). Comme le MIS se superpose aux composantes radio-induites, il est important d'avoir une compréhension des différentes composantes du MIS et du RIS ainsi qu'une description détaillée de la stabilité des radicaux associés vis-à-vis notamment de la température et de l'humidité. Des études plus spécifiques ont également été menées pour soit minimiser la production de MIS, soit essayer de minimiser ou éliminer de manière sélective les contributions du MIS lors de l'évaluation du RIS.

Le **chapitre VI** est dédié à la mise au point de protocoles pour l'estimation des doses. Comme cette étude vise à produire des protocoles opérationnels, sur la base de l'ensemble des données produites concernant le RIS et le MIS, il s'agissait de définir les conditions optimales de prélèvement, de préparation des échantillons et de mesure. Deux protocoles ont été définis et des premiers cas d'applications sur des ongles prélevés sur des victimes d'irradiation aiguë prises en charge par l'IRSN et l'Hôpital Percy sont également décrits.

## G. REFERENCES

- Ainsbury E.A., Bakhanova E., Barquinero J.F., Brai M., Chumak V., Correcher V., Darroudi F., Fattibene P., Gruel G., Guclu, I., Horn S., Jaworska A., Kulka U., Lindholm C., Lloyd D., Longo A., Marrale M., Monteiro Gi, O., Oestreicher U., Pajic J., Rakic B., Romm H., Trompier F., Veronese I., Voisin P., Vral A., Whitehouse C.A., Wieser A., Woda C., Wojcik A., Rothkamm K. (2011) Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiat. Prot. Dosim.*, 47(4), 573-592.

## Chapitre I Contexte et objectifs

- Alexander G. A., Swartz H. M., Amundson S. A., Blakely W. F., Buddemeier B., Gallez B., Dainiak N., Goans R. E., Hayes R. B., Lowry P. C., Noska M. A., Okunieff P., Salner A. L., Schauer D. A., Trompier F., Turteltaub K. W., Voisin P., Wiley Jr, A. L. & Wilkins R. (2007) BiodosEPR-2006 meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents. *Radiat. Meas.*, 42, 948-971.
- Baker D., Watson S., Mobbs S., Murray V. (2011) MASH Work Package 9 Report: Foresight into Needs, Possibilities and Information Requirements for the Future, HPA report, Chilcot, UK, ISBN 978-0-85951-680-8.
- Bassinet C., Trompier F. & Clairand I. (2010) Radiation accident dosimetry on electronic components by OSL. *Health Phys.*, 98(2), 440-445.
- Berlin L. (2001) Malpractice issues in radiology: Radiation-induced skin injuries and fluoroscopy. *American Journal of Roentgenology*, 177, 21-25.
- Bertho J. M., Roy L., Souidi M., Benderitter M., Gueguen Y., Lataillade J. J., Prat M., Fagot T., De Revel T. & Gourmelon P. (2008) New biological indicators to evaluate and monitor radiation-induced damage: An accident case report. *Radiat. Res.*, 169, 543-550.
- Bey E., Prat M., Duhamel P., Benderitter M., Brachet M., Trompier F., Battaglini P., Ernou I., Boutin L., Gourven M., Tissedre F., Créa S., Mansour C.A., de Revel T., Carsin H., Gourmelon P., Lataillade J.J. (2010) Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations *Wound Repair Regen.*, 18 (1), 50-8.
- Blakely, W.F., Carr, Z., Chu, M.C.-M., Dayal-Drager, R., Fujimoto, K., Hopmeir, M., Kulka, U., Lillis-Hearne, P., Livingston, G.K., Lloyd, D.C., Maznyk, N., Perez, M.D.R., Romm, H., Takashima, Y., Voisin, P., Wilkins, R.C., Yoshida, M.A., 2009. WHO 1st Consultation on the Development of a Global Biodosimetry Laboratories Network for Radiation Emergencies (BioDoseNet). *Radiat. Res.*, 171, 127-139.
- Blank S., Moskin L.C., Zucker J.R. (2008) An ounce of prevention is a ton of work: Mass antibiotic prophylaxis for anthrax, New York city, 2001. *Emerg. Infect. Dis.*, 9 (6), 3-118.
- Buffon G. (1777) Essai d'arithmétique morale, *Supplément à la naturelle*, 4.
- Chandra H. and Symons C.R. (1987) Sulphur radicals formed by cutting  $\alpha$ -keratin. *Nature*, 328, 833-834.
- Clairand I., Trompier F., Bottollier-Depois J-F. & Gourmelon P. (2006) Ex vivo ESR measurements associated with Monte Carlo calculations for accident dosimetry: Application to the 2001 Georgian accident. *Radiat. Prot. Dosim.*, 120(1-4), 500-505.
- Clairand I., Huet C., Trompier F. & Bottollier-Depois J. F. (2008) Physical dosimetric reconstruction of a radiological accident due to gammagraphy equipment that occurred in Dakar and Abidjan in summer 2006. *Radiat. Meas.*, 43(2-6), 698-703.
- Çolak S., Özbey T., An ESR study on biological dosimeters: Human hair. *Radiat. Meas.* 46, 465-472.
- Dalgarno B.G. & McClymont J.D. (1989) Evaluation of ESR as a radiation accident dosimetry technique. *Appl. Radiat. Isot.*, 40(10-12), 1013-1020.
- Delafield H.J. (1988) Nuclear accident dosimetry - an overview. *Radiat. Prot. Dosim.* 23, 143-149.

## Chapitre I Contexte et objectifs

- De Revel T., Gourmelon P., Vidal D. & Renaudeau C. (2005) Menace Terroriste Approche Médicale, *Nucléaire Radiologique Biologique Chimique*, (Esher, John Libbey Eurotext).
- Dolphin G. (1969) Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. Handling of radiation accidents. *Proceedings of an International Symposium, Vienna, IAEA 149*: 215–224
- Engin, B., Aydas, C. & Demirtas, H. (2006) ESR dosimetric properties of window glass. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. Section B*, 243(1), 149-155.
- Fattibene P., Wojcik A. (Eds.) Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 2009; 45(3).
- Franck D., Quéinnec F., Asselineau B., De Carlan L., Clairand I., Huet C., Lacoste V., Monnin-Parietti C., Trompier F. & Van-Ryckeghem L. (2006) La dosimétrie à l'IRSN. *Radioprotection*, 41(5), S227-252.
- Flidner T.M., Friesecke I., Beyrer K., British Institute of Radiology (eds) (2001) Medical management of radiation accident—manual on the acute radiation syndrome (METREPOL European Commission concerted action). Oxford, pp 1–66; compendium pp C1–C21.
- Gancheva, V., Yordanov, N. D. & Karakirova, Y. (2006) EPR investigation of the gamma radiation response of different types of glasses. *Spectrochimica Acta A*, 63(4), 875-878.
- Giordan D., (2006). Plan Piratome : Etude des procédures et moyens de décontamination. *Radioprotection*, 41, 151-167.
- Gómez, J.A., Kinoshita, A., Leonor, S.J., Belmonte, G.C., Baffa, O. (2011) Retrospective biodosimetry with small tooth enamel samples using K-Band and X-Band. *Radiat. Meas.*, 46, 754-759.
- Gorin N.C., Flidner T., Gourmelon P., Ganser A., Meineke V., Sirohi B., Powles R., Apperley J., (2006) Consensus conference on European preparedness for haematological and other medical management of mass radiation accidents. *Ann. Hemat.*, 85, 671-679.
- Gougelet R. M., Rea M. E., Nicolalde R. J., Geiling J. A., Swartz H. M. (2010) The view from the trenches: Part 1-emergency medical response plans and the need for EPR screening. *Health Phys.*, 98(2), 118-127.
- Gourmelon P., Benderitter M., Bertho J.M., Huet C., Gorin N.C., de Revel P. (2010) European consensus on the medical management of acute radiation syndrome and analysis of the radiation accident in Belgium and Senegal. *Health Phys.* 98, 835-832.
- Greenstock and Trivedi (1992) Free radicals measurement in bio-organic substances using an electron spin resonance technique, *Proceedings of 8<sup>th</sup> International Congress of IRPA, Montréal*, pp. 455-458.
- Griscom D.L., Merzbacher C.I., Bibler N.E., Imagawa H., Uchiyama, S., Namiki A., Marasinghe G.K., Mesko M., Karabulut M. (1998) On the structure and radiation chemistry of iron phosphate glasses: New insights from electron spin resonance, Mössbauer, and evolved-gas mass spectroscopy. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, 141, 600-615.
- Guipaud O., Benderitter M., 2009. Protein biomarkers for radiation exposure: towards a proteomic approach as a new investigation tool. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 45, 278-286.
- Harrison J., Leggett R., Lloyd D., Phipps A. & Scott B. (2007) Polonium-210 as a poison. *J. Radiol. Prot.*, 27, 17-40.

## Chapitre I Contexte et objectifs

- Herve M. L., Trompier F., Tikunov D. D., Amouroux V. & Clairand I. (2006) Study of materials for mixed field dosimetry by EPR spectroscopy. *Radiat. Prot. Dosim.*, 120(1-4), 205-209.
- Huet C., Clairand I., Trompier F., Bey E., Bottollier-Depois J.F. (2007). Monte Carlo dose reconstruction in case of a radiological accident: application to the accident in Chile in december 2005. *Radioprotection*, 42, 489-500.
- Huet C., Trompier F., Clairand I., Queinnec F., Bottollier-Depois J.F., 2008. Physical dosimetric reconstruction of a radiological accident at Fleurus (Belgium) on 11 March 2006. *Radiat. Meas.*, 43, 845-848.
- Ikeya M. (Ed.) (1993) New applications of Electron Spin Resonance: Dating, dosimetry and microscopy, Singapore, New jersey, London, Hong kong, World Scientific Publishing Co.
- Ilyin L. A., Soloviev V. Yu., Baranov A. E., Guskova A. K., Nadezhina N. M., and Gusev I. A., May 2004, "Early medical consequences of radiation incidents in the former URRS territory," Proceedings of 11<sup>th</sup> International Congress of IRPA, Madrid, Spain, IRPA on line, <http://irpa11.irpa.net/pdfs/7c20.pdf>.
- International Atomic Energy Agency. (1988) The radiological accident in Goiânia. IAEA STI/PUB/P815.
- International Atomic Energy Agency. (1996) The radiological accident at the irradiation facility in Nesvizh. IAEA STI/PUB/P1010.
- International Atomic Energy Agency (1997) Method for the development of emergency response preparedness for nuclear or radiological accidents, IAEA-TECDOC-953 (IAEA, Vienna).
- International Atomic Energy Agency. (1998a) The radiological accident in Tammiku IAEA STI/PUB/P1053, (IAEA, Vienna).
- International Atomic Energy Agency. (1998b) Accidental overexposure of radiotherapy patients in San José, Costa Rica. IAEA STI/PUB/P1027, (IAEA, Vienna).
- International Atomic Energy Agency (1999) Generic procedures for monitoring in a nuclear or radiological emergency, IAEA-TECDOC-1092, IAEA, Vienna.
- International Atomic Energy Agency. (2000) The radiological accident in Lilo IAEA STI/PUB/P1087, IAEA, Vienna.
- International Atomic Energy Agency. (2001a) The radiological accident in Sarov. IAEA STI/PUB/P1106, IAEA, Vienna.
- International Atomic Energy Agency. (2001b) Investigation of an accidental exposure of radiotherapy patients in Panama. IAEA STI/PUB/P1114, IAEA, Vienna.
- International Atomic Energy Agency. (2004a) The radiological accident in Cochabamba IAEA STI/PUB/P1199, IAEA, Vienna.
- International Atomic Energy Agency. (2004b) Accidental overexposure of radiotherapy patients in Bialystok, IAEA STI/PUB/P1180, IAEA, Vienna.
- International Atomic Energy Agency. (2005) INES-NEWS Events, theft of source pigtail containing Ir-192 radiography source, <http://www-news.iaea.org/news/>, accessed: 2005-09-23
- International Atomic Energy Agency. (2009) The radiological accident in Nueva Aleda IAEA STI/PUB/P1389, IAEA, Vienna.

## Chapitre I Contexte et objectifs

- International Atomic Energy Agency. (2010) IAEA Assistance and Response Network, Incident and Accident Center, IAEA, [http://www-pub.iaea.org/MTCDD/publications/PDF/Ranet2010\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCDD/publications/PDF/Ranet2010_web.pdf)
- International Standardisation Organisation, (2004) Radiation protection -- Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics ISO 19238.
- Ishii H. and Ikeya M. (1990) An electron spin-resonance system for in vivo human tooth dosimetry. *Japanese J. Appl. Phys. Part 1*, 29, 871-875.
- Ivannikov A.I., Gaillard-Lecanu E., Tromprier F., Stepanenko V.F., Skvortsov V.G., Yermakova N., Tikunov D., Petin D.V., 2004. Dose reconstruction by EPR spectroscopy of tooth enamel: application to the population of Zaborie village exposed to high radioactive contamination after Chernobyl accident. *Health Phys.*, 86, 121-134.
- Krasniouk, V. I., May 2004, Radiation injuries in man after criminal exposure, Proceedings of 11<sup>th</sup> IRPA Congress, Madrid, Spain, IRPA on line, <http://irpa11.irpa.net/papers/papers.php?ses=7&ses1=g>
- Koenig T.R., Mettler F.A., Wagner L.K. (2001) Skin Injuries from Fluoroscopically Guided Procedures: Part 2, Review of 73 Cases and Recommendations for Minimizing Dose Delivered to Patient. *Am. J. Roentgenol.*, 177, 13-20.
- Mamedov S.V., Aktas B., Cantürk M., Aksakal B., Alekperov V., Bülbül F., Yilgin R., and Aslanov R.B. (2002) The ESR signals in silk fibroin and wool keratin under both the effect of UV-irradiation and without any external effects and the formation of free radicals. *Biomat.*, 23, 3045-3412.
- Mettler F.A. Jr, Koenig T.R., Wagner L.K., Kelsey C.A. (2002) Radiation injuries after fluoroscopic procedures. *Semin Ultrasound CT MR.*, 23, 428-442.
- Nakajima T., Fujimoto K. & Hashizume T. (1973) New gamma-ray exposure estimation method for radiation accident. *J. Nucl. Sc. Tech.*, 10(4), 202-206.
- Nakajima T. (1994) Estimation of adsorbed dose to evacuees at Pripjat-city using EPR measurements of sugar and exposure rate calculations. *Appl. Radiat. Isot.*, 45(1), 113-120.
- Okumura T., Suzuki K., Fukuda A., Kohama A., Takasu N., Ishimatsu S. & Hinohara S. (1998) The Tokyo subway sarin attack: Disaster management, part 2: Hospital response. *Acad. Emerg. Med.*, 5, 618-624.
- Pielez A. (2006) Studies of wool keratin by EPR spectroscopy. *J Appl Polym Sci.*, 102 (2), 1959-65.
- Rehani M.M., Ortiz-Lopez P. (2006). Radiation effects in fluoroscopically guided cardiac interventions-keeping them under control. *Int. J. Cardiol.*, 109, 147-151.
- Remy-Kornak L., Calas C., Tromprier F. (2006) Protocols for emergency dosimetry based on EPR spectrometry with nails and hairs *Proc. 2<sup>nd</sup> Eur. IRPA Congr.*, Paris, pp. 415.
- Rojas-Palma C., Liland A., Jerstad A.N., Etherington G., Del Rosaria Pérez M., Rahola T. & Smith K. (2009) *TMT Handbook*, (Norway, NRPA), (<http://www.tmthandbook.org/>).
- Romanyukha AA, Mitchell CA, Schauer DA, Romanyukha L, Swartz H.M. (2007) Q-band EPR biodosimetry in tooth enamel microsamples: feasibility test and comparison with X-band. *Health Phys.*, 93(6), 631-635.
- Roy L., Roch-Lefevre S., Vaurijoux A., Voisin P., Martin C., Grégoire E., Voisin P. (2007) Optimization of cytogenetic procedures for population triage in case of radiological emergency. *Radiat. Meas.*, 42, 1143-1146.

## Chapitre I Contexte et objectifs

- Sagstuen E., Theisen H. & Henriksen T. (1983) Dosimetry by ESR spectroscopy following a radiation accident. *Health Phys.*, 45(5), 961-968.
- Sasaki M, Miyata H. (1968) Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*, 220 1189–1193
- Shiraishi K., Wanisuksombut W., Chinudomsut K., Suzuki G. & Nishizawa K. (2002a) ESR dose estimation of the radiological accident in Samut Prakarn Thailand using sugar samples and an ESR method. *Advances in ESR Applications*, 18, 207-209.
- Shiraishi K., Iwasaki M., Miyazawa C., Yonehara H. & Matsumoto M. (2002b) ESR dosimetry in the JCO criticality accident. *Advances in ESR Applications*, 18, 203-206.
- Silini G. and Gousskova A. (1991) Biological dosimetry at Chernobyl. In *New Horizons in Biological Dosimetry* (B. L. Gledhill and F. Mauro Eds), pp 129-144, Wiley-Liss, New York.
- Trivedi A., Greenstock C.L. (1993) Use of sugars and hair for ESR emergency dosimetry. *Appl. Radiat. Isot.*, 44, 85.
- Trompier F. et Clairand I. (2006) Accident de gammagraphie survenu au Chili le 15 décembre 2005 – Bilan des résultats de dosimétrie par RPE, Rapport interne IRSN, IRSN/DRPH/SDE n°2006-7.
- Trompier F., J. Sadlo, J. Michalik, W. Stachowicz, A. Mazal, I. Clairand, J. Rostkowska, W. Bulski, A. Kulakowski, J. Slusznik, S.Gozdz & A. Wojcik (2007) EPR dosimetry for actual and suspected overexposures during radiotherapy treatments in Poland. *Radiat. Meas.*, 42, 1025-1028.
- Trompier F., Battaglini P., Bey E. (2008) EPR Dosimetry in Recent Radiation Accident Cases. *Radioprotection* 43, 148
- Trompier F., Bassinet C., Wieser A., De Angelis C, Viscomi D., Fattibene P. (2009) Radiation-induced signals analysed by EPR spectrometry applied to fortuitous dosimetry. *Ann. Ist. Sup. Sanità*, 45(3), 287-96.
- Trompier F., Bassinet C., Clairand I. (2010) Radiation accident dosimetry on plastics by EPR spectrometry. *Health Phys.*, 98, 388-394.
- United Nation Scientific Committee on the Effect of Atomic Radiation (2011) Sources and effects of ionizing radiation. Report to the general assembly with scientific annexes Vol. II scientific annexe C, D and E, New York, ISBN: 978-992-971-142280-142281, [http://www.unscear.org/docs/reports/142008/142211-180076\\_Report\\_142008\\_Annex\\_C.pdf](http://www.unscear.org/docs/reports/142008/142211-180076_Report_142008_Annex_C.pdf)
- Vlietstra R.E., Wagner L.K., Koenig T., Mettler F. (2004) Radiation Burns as a Severe Complication of Fluoroscopically Guided Cardiological Interventions. *J. Interven. Cardiol.*, 17, 131-142.
- Voisin P., Assaei R. G., Heidary A., Varzegar R., Zakeri F., Durand V., Sorokine-Durm I. (2000) Mathematical methods in biological dosimetry: The 1996 Iranian accident. *Int. J. Radiat. Biol.*, 76, 1545–1554.
- Wieser A., Görsku H.Y., Regulla D.F. & Vogenauer A. (1994) Limits of retrospective accident dosimetry by EPR and TL with natural materials. *Radiat. Meas.*, 23(2-3), 509-514.
- Wieser A., Debuyst R., Fattibene P., Meghzi Fene A., Onori S., Bayankin S.N., Blackwell B., Brik A., Bugay A., Chumak V., Ciesielski B., Hoshi M., Imata H., Ivannikov A., Ivanov D., Junczewska M., Miyazawa C., Pass B., Penkowski M., Pivovarov S., Romanyukha A., Romanyukha L., Schauer D., Scherbina O., Schultka K., Shames A., Sholom S., Skinner A., Skvortsov V., Stepanenko V.,

## Chapitre I Contexte et objectifs

- Tielewuhan E., Toyoda S., Trompier F. (2005) The 3rd international intercomparison on EPR tooth dosimetry: Part 1, general analysis. *Appl. Radiat. Isot.*, 62, 163-171.
- Williams G., Zankl M., Abmayr W., Veit R. & Drexler G. (1986) The calculations of dose from external photon exposures using reference and realistic human phantoms and Monte Carlo methods. *Phys. Med. and Biol.*, 31(4), 449-452.
  - Williams B. B., Dong R., Kmiec M., Burke G., Demidenko E., Gladstone D., Nicolalde R. J., Sucheta A., Lesniewski P. & Swartz H. M. (2010) Development of in vivo tooth EPR for individual radiation dose estimation and screening. *Health Phys.*, 98(2), 327-338.
  - Woda C., Bassinet C., Trompier F., Bortolin E., Della Monaca S., Fattibene P. (2009) Radiation-induced signals analysed by luminescence. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 45(3), 251-259.
  - Wojcik A., Lloyd D; Romm H. Roy L. (2009) Towards a European Network of Excellence in Biological dosimetry, Final report of FP-7 TENEB project (<http://teneb.eu>).
  - Wu K., Sun C.P. and Shi Y. (1995) Dosimetric properties of watch glass: a potential practical ESR dosimeter for nuclear accidents. *Radiat Prot Dosim.*, 59(3), 223-225.
  - Wu K., Guo L., Cong J.B., Sun C.P., Hu J.M., Zhou Z.S., Wang S., Zhang Y., Zhang X. & Shi Y.M. (1998) Researches and applications of ESR dosimetry for radiation accident dose assessment. *Radiat. Prot. Dosim.*, 77(1-2), 65-67.

## *Chapitre II*

# *Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles*

A. Introduction .....	57
B. Principe général de la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique .....	57
C. Spectroscopie RPE en onde continue .....	73
D. Spectroscopie RPE pulsée : ESEEM et HYSCORE .....	80
E. Principe général de la dosimétrie des rayonnements ionisants par RPE .....	83
F. Description de la méthodologie des tests pour établir un protocole d'estimation des doses .....	84
G. Description des moyens d'irradiation .....	90
H. Description des ongles et état de l'art en dosimétrie .....	91
I. Références .....	103



## **A. INTRODUCTION**

La spectroscopie par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est la principale technique d'analyse mise en œuvre au cours de cette thèse. La première partie de ce chapitre rappelle les principes généraux de la spectroscopie RPE et de son application à la dosimétrie. La deuxième partie présente une brève description des méthodes d'analyses complémentaires, des moyens d'irradiation utilisés et de la méthodologie suivie pour l'étude des ongles. Dans la troisième et dernière partie, nous nous efforçons de détailler les ongles du point de vue histologique et biochimique ainsi que les premières études réalisées en dosimétrie préalablement à ce travail de thèse.

## **B. PRINCIPE GENERAL DE LA SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE**

En 1895, Pierre Curie distingua le paramagnétisme et le diamagnétisme et mit en évidence le passage du ferromagnétisme au paramagnétisme par élévation de température. Quelques années plus tard, dans l'une des plus fondamentales expériences sur la structure de la matière, Gerlach & Stern (1922) ont montré que le moment magnétique d'un électron ne pouvait prendre que des orientations discrètes dans un champ magnétique. En 1923, Defran découvre l'absorption des ondes électromagnétiques par des substances paramagnétiques, il appelle ce phénomène « l'effet photomagnétique ». Breit & Rabi (1931) décrivent les niveaux d'énergie d'un atome d'hydrogène résultants de l'application d'un champ magnétique. En 1932, Waller présente une théorie quantique de la relaxation paramagnétique dans les solides qui constitue les bases de la résonance paramagnétique. Rabi et al. (1938) étudient quelques années plus tard les transitions entre les différents niveaux d'énergie induit par un champ magnétique oscillant. Cette expérience fut la première observation de résonance magnétique. La première observation d'un pic de résonance paramagnétique électronique fut réalisée en 1944 par Zavoisky (1945). Les résultats des expériences de Zavoisky sont interprétés par Frenkel (1945) comme la démonstration de l'absorption paramagnétique. La spectroscopie par RPE a connu par la suite un développement important, notamment en chimie, médecine, biologie et science des matériaux. Les premières applications de la RPE pour la dosimétrie des rayonnements ionisants remontent aux années 1950. En effet Combrisson et Uebersfeld, avec des verres et des matériaux biologiques montrent qu'il est possible d'estimer la dose absorbée par un matériau solide en détectant les défauts et/ou les radicaux libres créés par l'interaction des rayonnements ionisants dans ces matériaux (Combrisson & Uebersfeld, 1954 ; Uebersfeld, 1956). Quelques années plus tard, Brady (1968) publie les premiers résultats de dosimétrie rétrospective sur des tissus osseux et Bradshaw (Bradshaw & Cadena, 1962) sur l'utilisation d'un acide aminé, l'alanine, comme dosimètre. Ces travaux définissent les deux principales applications actuelles de la RPE en dosimétrie, à savoir la dosimétrie rétrospective

pour des expositions chroniques ou accidentelles et la dosimétrie de référence pour des applications en métrologie.

### B.1 Rappel d'électromagnétisme

Lorsqu'un milieu matériel est soumis à un champ d'excitation magnétique  $\vec{H}$ , d'intensité  $H$  ( $A.m^{-1}$ ), il apparaît une aimantation magnétique  $\vec{M}$  d'intensité  $M$  ( $A.m^{-1}$ ) qui indique l'influence du milieu. Pour le cas d'un milieu isotrope<sup>1</sup>, le champ d'excitation magnétique et l'aimantation magnétique sont liés par la susceptibilité magnétique (Equ. II.1) :

$$\chi = M/H \quad \text{Équation II.1}$$

La susceptibilité est une grandeur sans unité.

Le champ d'induction magnétique  $\vec{B}$  (en Tesla)<sup>2</sup>, à l'intérieur de ce milieu, est donné par la relation suivante (cf. Equation II.2) :

$$\vec{B} = \mu_0 \cdot (\vec{H} + \vec{M}) \quad \text{Équation II.2}$$

avec  $\mu_0$  la perméabilité magnétique du vide ( $4.\pi.10^{-7} T.m.A^{-1}$ ).

En combinant les Equations II.1 et II.2 et pour un milieu linéaire isotrope, la relation liant le champ d'induction magnétique et l'aimantation magnétique est donnée par l'Equation II.3 :

$$\vec{B} = \mu_0 \cdot (1 + \chi) \cdot \vec{H} \quad \text{Équation II.3}$$

Par conséquent, les matériaux peuvent être classés suivant leur comportement magnétique, c'est-à-dire suivant leur susceptibilité magnétique  $\chi$ .

#### B.1.1 Comportement des matériaux dans un champ magnétique B

En absence de champ magnétique extérieur, l'aimantation des matériaux est nulle. En effet, les moments magnétiques intrinsèques ( $\vec{\mu}$ ), orientés aléatoirement, se compensent entre eux et donc le moment magnétique macroscopique résultant ( $\vec{M}$ ) est nul (Equ. II.4) :

$$\vec{M} = \sum \vec{\mu} = \vec{0} \quad \text{Équation II.4}$$

En revanche, sous l'action d'un champ magnétique statique, les matériaux s'aimantent et peuvent être alors classés selon leurs propriétés de magnétisation :

- Le diamagnétisme est caractérisé par une susceptibilité, en général très faible, de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ , négative et indépendante de la température (corps repoussés par

<sup>1</sup> Un élément est dit isotrope s'il possède les mêmes propriétés physiques dans toutes les directions.

<sup>2</sup> Dans la littérature les valeurs B et H sont souvent confondues

l'aimant). Lors de l'application d'un champ magnétique à un atome, le champ électrique induit modifie le mouvement orbital des électrons et ce phénomène se traduit par une aimantation opposée au champ. Cette aimantation cesse lorsqu'on supprime le champ extérieur. Le diamagnétisme est une propriété de tout atome ou molécule présentant obligatoirement des couches électroniques pleines. L'observation d'un comportement opposé indique que le diamagnétisme est contrebalancé par un autre effet plus fort entraînant une attraction ;

- Le paramagnétisme est caractérisé par une susceptibilité positive (corps attirés par l'aimant) comprise entre  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ . Il concerne les corps dont les atomes possèdent déjà un moment magnétique en raison par exemple d'électrons non appariés. Sous l'action d'un champ magnétique extérieur, ces moments magnétiques s'orientent dans la direction du champ et augmentent le champ appliqué. Cette aimantation faible cesse lorsqu'on supprime le champ extérieur. Ce phénomène diminue avec l'augmentation de la température selon la loi de Curie ( $\chi = C/T$ , où  $C$  est la constante de Curie en Kelvin et  $T$  la température en Kelvin) puisque l'agitation thermique désoriente les dipôles magnétiques élémentaires ;
- Le ferromagnétisme est la propriété qu'ont certains corps de s'aimanter très fortement sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, et pour certains tels que les aimants (matériaux magnétiques durs) de garder une aimantation importante même après la disparition du champ extérieur.

### **B.1.2 Domaines d'application de la RPE**

Tout système paramagnétique et/ou possédant un spin électronique non nul peut être étudié par spectroscopie RPE. Les matériaux paramagnétiques les plus étudiés sont classés généralement selon les catégories suivantes :

- Les radicaux libres dans les solides, liquides et phases gazeuses. Un radical libre est un système (atome, molécule ou ion) qui contient au minimum un électron non apparié ;
- Les complexes de coordination. La RPE permet en effet d'obtenir des informations sur la géométrie et la structure électronique des composés ;
- Les ions des éléments de transition et les terres rares qui peuvent avoir jusqu'à cinq ou sept électrons non appariés ;
- Les électrons de conduction des conducteurs métalliques ;

- Les défauts d'irradiation et défauts dans les semi-conducteurs. Les atomes de silicium dont la tétravalence n'est pas satisfaite ont une liaison dite pendante qui rend l'atome radicalaire ;
- Les défauts ponctuels dans les solides ; le plus connu étant le centre F dans les halogénures, un électron de valence piégé dans une lacune d'ion négatif ;
- Les systèmes avec plusieurs électrons non appariés, bi-radicaux ou multi-radicaux. C'est le cas des états triplets de l'oxygène moléculaire ;

Cette technique étant très sensible, des radicaux ou des ions paramagnétiques peuvent être utilisés comme sondes dans des systèmes diamagnétiques, sans pour autant perturber ces systèmes (techniques de marquage de spin) : étude de solvatation, de mécanisme de transfert dans les systèmes biologiques.

### **B.1.3 Principe de base**

La RPE est une technique spectroscopique basée sur l'absorption d'une onde électromagnétique à haute fréquence, usuellement dans le domaine des micro-ondes, par un composé paramagnétique (radicaux libres, complexes de métaux ou de terres rares où certains de leurs électrons ne s'appartiennent pas) lorsqu'il est en interaction avec un champ magnétique statique. Cette technique permet notamment de mesurer la concentration d'espèces paramagnétiques, en particulier celles induites par une irradiation dans les matériaux organiques ou inorganiques, mais aussi d'avoir des informations sur leur nature et leur structure électronique.

L'application d'un champ magnétique à une population d'électrons célibataires implique une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie en sous niveaux en orientant les spins des électrons : c'est l'effet Zeeman. En imposant une onde électromagnétique micro-onde perpendiculaire au champ magnétique, il est possible d'induire des transitions entre ces sous niveaux : c'est la résonance. Cette résonance se matérialise par l'absorption de l'onde micro-onde par les spins des électrons célibataires, qui changent de niveau, et provoque un pic dont l'amplitude est proportionnelle au nombre de transitions. La base de la spectroscopie par RPE consiste donc à détecter cette résonance.

Cependant, un spectre de RPE peut présenter une structure complexe. En effet, les électrons célibataires ne sont pas isolés et peuvent donc interagir entre eux mais aussi avec les noyaux situés dans leur environnement proche, ce qui se traduit par des raies supplémentaires. Les paramètres essentiels qui vont intervenir sont le champ magnétique  $\vec{B}$  auquel est soumis le système, le spin électronique  $\vec{S}$  associé à l'électron célibataire considéré et l'ensemble des spins électroniques  $\vec{S}_i$  et nucléaires  $\vec{I}_i$  environnants.

### B.2 Etats énergétiques- effet Zeeman

En présence d'un champ magnétique externe  $\vec{B}$ , la direction du spin de l'électron s'aligne antiparallèlement (état le plus stable) ou parallèlement selon celle du champ magnétique externe, permettant de séparer du point de vue énergétique les deux états de l'électron, cet effet est appelé effet Zeeman (Fig. II.1).

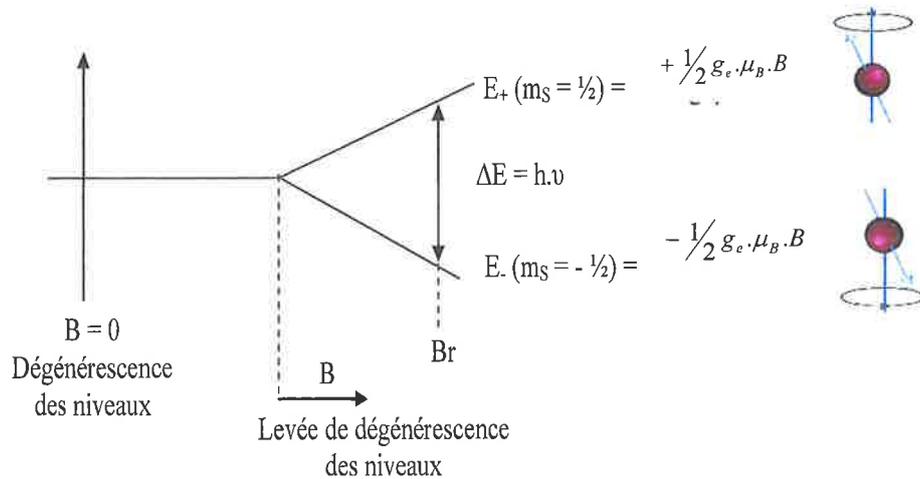


Figure II.1 : Schéma des niveaux d'énergie pour l'électron libre fonction du champ magnétique appliquée avec absorption RPE.

L'énergie séparant les différents états des spins lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique externe dépend de la valeur du champ magnétique appliqué et du moment magnétique de l'électron.

Dans le cas simple d'un électron libre de spin ( $S=1/2$ ), en l'absence de champ magnétique, le moment magnétique intrinsèque est donné par l'Equation II.5 :

$$\vec{\mu}_e = -g_e \cdot \beta \cdot \vec{S} \quad \text{Équation II.5}$$

avec  $g_e$  le facteur de Landé,  $\beta$  le magnéton de Bohr et  $\vec{S}$  le moment cinétique de spin de l'électron qui possède deux orientations opposées.

Le **magnéton de Bohr** est le moment de spin d'une mole d'électrons (de masse  $m_e$ ) et s'exprime sous la forme suivante (cf. Equation II.6) :

$$\beta = \frac{h e}{2 m_e} \quad \text{Équation II.6}$$

Le **facteur de Landé** (aussi dénommé facteur  $g$ ) ou facteur de décomposition spectral est le rapport entre le moment angulaire total et le moment magnétique de l'électron. Ce ratio est

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

une constante physique caractéristique des espèces radicalaires mesurées. Le facteur  $g$  de l'électron libre est égal à **2,002319278**. Dans un cristal, on utilise une matrice  $g$  dérivée de  $g_e$ , qui tient compte des perturbations locales, appelée  $g$  effectif. En effet, l'application d'un champ magnétique externe génère des champs locaux dans l'échantillon. Les valeurs de  $g$  sont caractéristiques du système de spin mesuré dans un environnement déterminé.

L'énergie d'interaction entre le spin électronique d'un centre paramagnétique et l'induction (interaction magnétique faible), ou énergie Zeeman, décrit l'énergie potentielle d'un moment rigide, le moment de spin, qui tend à s'aligner selon le champ magnétique appliqué. En utilisant le formalisme quantique, l'hamiltonien associé à cette interaction s'écrit de manière générale (Equ. II.7) :

$$\hat{H} = \beta \cdot \hat{S} \cdot \tilde{g} \cdot \hat{B} \quad \text{Équation II.7}$$

où  $\mathbf{g}$  est donc la matrice caractérisant la modification de cette interaction en fonction de l'orientation du champ avec l'axe de l'orbital. Dans le cas de l'électron libre, la matrice  $g$  se réduit à la matrice unité multipliée par le facteur  $g_e$ . Si l'on considère la composante selon la direction de l'axe  $O_z$  correspondant à la direction de  $B$ , on a (Equ. II.8) :

$$\hat{H}_z = \beta \cdot \hat{S}_z \cdot g_e \cdot B \quad \text{Équation II.8}$$

On applique l'hamiltonien de spin à la fonction propre du spin électronique correspondant à  $m_s$  le nombre quantique magnétique de spin (projection de  $\vec{S}$  selon la direction de  $B$ ). Le nombre quantique  $m_s$  peut prendre  $2S+1$  valeurs données par  $m_s = -S, -S+1, +S$  ou  $S$  est le nombre quantique de spin. L'électron ayant un nombre quantique de spin  $S$  égal à  $\frac{1}{2}$ ,  $m_s$  prend deux valeurs soit  $+\frac{1}{2}$  et  $-\frac{1}{2}$ . L'énergie de spin de l'électron ou **énergie Zeeman** peut donc prendre deux valeurs. En reprenant l'Equation II.4, on a donc l'Equation II.9 :

$$\hat{H}_z \left| \pm \frac{1}{2} \right\rangle = \pm \frac{1}{2} g_e \beta B \left| \pm \frac{1}{2} \right\rangle = E_{\pm} \left| \pm \frac{1}{2} \right\rangle \quad \text{Équation II.9}$$

$$\text{soit } E_{\pm} = \pm \frac{1}{2} g_e \beta B \quad \text{Équation II.10}$$

avec  $\left| \pm \frac{1}{2} \right\rangle$  la fonction propre du spin électronique

La répartition des électrons non appariés entre les deux niveaux d'énergie à la température  $T$  se fait selon loi de Boltzmann (Equ. II.11) :

$$\frac{N_-}{N_+} = e^{\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)} \quad \text{Équation II.11}$$

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

avec  $N_-$  : la population du niveau d'énergie inférieur,  $N_+$  : la population du niveau supérieur,  
 $\Delta E$  : la différence entre les deux niveaux d'énergie,  $k$  : la constante de Boltzmann,  $T$  : la  
température absolue en kelvin

A température ambiante, une légère différence de population existe entre les deux niveaux, l'état le plus stable étant le plus peuplé. Cette différence augmente lorsque la température du système diminue.

### B.3 La résonance

Les transitions électroniques entre les niveaux d'énergie adjacents peuvent être provoquées si l'on applique perpendiculairement au champ  $\vec{B}$  un champ oscillant radiofréquence tel que la différence d'énergie (cf. Equation II.12) entre les deux niveaux Zeeman soit égale aux quanta d'énergie de l'onde radiofréquence.

$$\Delta E = h\nu \quad \text{Équation II.12}$$

avec  $\nu$  la fréquence du champ oscillant appliqué. On peut donc exprimer les conditions de résonance selon la formule générale suivante (Eq. II.13) :

$$\frac{B}{\nu} = \frac{h}{g\mu} \quad \text{Équation II.13}$$

Lorsque ces conditions sont réalisées, on observe un phénomène de **résonance** : les spins des électrons non appariés s'inversent (Fig. II.1). Les probabilités de transition entre les deux états sont égales, cependant, la population du niveau inférieur étant légèrement plus élevée que celle du niveau supérieur (Eq. II.11), on observe une absorption d'énergie. Pour que l'absorption soit mesurable, en plus du déséquilibre de population entre les niveaux énergétiques, d'autres phénomènes doivent être mis en jeu. En effet, lorsque les conditions de résonance sont maintenues, les deux niveaux d'énergie sont alors également peuplés et l'absorption devrait donc cesser suite à ce phénomène de saturation. La saturation est rarement décelable pour des valeurs de champ magnétique de haute fréquence à la température ambiante, ce qui montre qu'il existe des phénomènes qui provoquent le passage des électrons vers le niveau inférieur. L'ensemble de ces phénomènes est nommé relaxation paramagnétique.

### B.4 La relaxation

Pour aborder la notion de relaxation, il est nécessaire de définir la magnétisation. La magnétisation est la somme des moments magnétiques dans l'échantillon de volume  $V$  (Eq. II.14).

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu} = \vec{0} \quad \text{Équation II.14}$$

En présence d'un champ magnétique, en l'absence de toute autre perturbation, pour chaque niveau d'énergie, les moments étant distribués aléatoirement dans leur mouvement de précession (à une même fréquence) autour de  $B_0$ , leurs contributions s'annulent et le moment résultant est soit aligné soit anti-aligné avec  $B_0$  (Fig. II.2). A l'équilibre thermique, les moments résultants des deux niveaux d'énergie ne s'annulent pas, ces deux niveaux étant peuplés par un nombre de spins différent (Eq. II.11). Leur somme correspond à la magnétisation. A l'équilibre, la magnétisation ( $M_0$ ) est donc orientée parallèlement au champ magnétique comme le montre la Figure II.2. Si l'on choisit le référentiel de la Figure II.2, la composante de la magnétisation selon l'axe Z ( $M_Z$ ) est donc égale à  $M_0$ .  $M_Z$  est appelée magnétisation longitudinal et  $M_X$  et  $M_Y$  magnétisations transverses. Dans le référentiel défini,  $M_X$  et  $M_Y$  sont donc nuls.

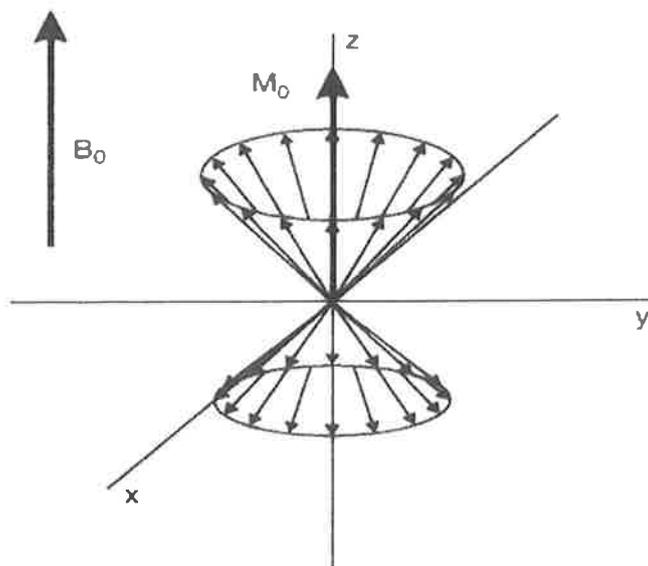


Figure II.2 : Représentation schématique de la précession des moments magnétiques individuels autour de  $B_0$  et de la résultante selon l'axe Z.

Lorsque l'on perturbe le système de spin, en RPE par un champ magnétique orthogonal  $B_1$  au champ magnétique statique  $B_0$  oscillant à la fréquence de la micro-onde ( $\omega$ ) et délivrant au système de spins une énergie correspondant à la différence des deux niveaux d'énergie, deux phénomènes sont observés :

- le système n'est plus à l'équilibre thermique, la composante  $M_Z$  diminue,
- la magnétisation n'est plus alignée avec le champ magnétique statique, des petites différences de champ magnétique au niveau de chaque spin induisent une distribution des fréquences de rotation de chaque spin,  $M_X$  et  $M_Y$  ne sont plus nuls.

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

A l'arrêt de la perturbation, le retour de la magnétisation à son état d'origine est appelé relaxation. Ce phénomène de relaxation a été décrit par Bloch (1946) à l'aide d'un système de trois équations différentielles (Eq. II.15). Cette description qui a valu à F. Bloch le prix Nobel portait sur la résonance magnétique nucléaire, mais est valide également pour la RPE.

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma [M_y B_0 + M_z B_1 \sin \omega t] - \frac{M_x}{T_2}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma [M_z B_1 \cos \omega t - M_x B_0] - \frac{M_y}{T_2} \quad \text{Équation II.15}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma [-M_x B_1 \sin \omega t - M_y B_1 \cos \omega t] - \frac{M_0 - M_z}{T_1}$$

Le retour à l'équilibre thermique et donc le retour de la composante  $M_z$  à sa valeur d'origine se fait selon une loi exponentielle (Eq. II.16) déduite des équations de Bloch (Eq. II.15).

$$M_z(t) = M_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad \text{Équation II.16}$$

$T_1$  est appelé temps de relaxation longitudinal ou temps de relaxation spin-réseau, le retour à l'équilibre thermique étant réalisé par transfert de l'énergie thermique au milieu ou « réseau ». Ce transfert se fait essentiellement via les vibrations du milieu et sera d'autant plus efficace que le couplage spin-orbite sera grand et que la température est importante. Le temps  $T_1$  est donc dépendant de la température.

Le retour de la magnétisation transverse à zéro est réalisé selon l'Equation II.17. Le temps  $T_2$  est appelé temps de relaxation transverse ou spin-spin, car il correspond au rephasage des fréquences de précession des différents spins.

$$M_{xy}(t) = M_{xy0} (e^{-t/T_2}) \quad \text{Équation II.17}$$

Les temps  $T_2$  sont toujours inférieurs ou égaux aux temps  $T_1$  et souvent très inférieurs à  $T_1$ . On comprend à partir de la description du phénomène de relaxation que la quantité d'énergie que peut absorber le système est surtout dépendante des temps de relaxation. Des temps courts permettent une relaxation rapide et donc une absorption plus importante d'énergie. La puissance absorbée est ainsi décrit par l'Equation II.18.

$$P(B_0) = \frac{\gamma \omega M_0 T_2 B_1^2}{1 + (\gamma B_0 - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 B_1 T_1 T_2} \quad \text{Équation II.18}$$

avec  $\gamma$  le rapport gyromagnétique électronique.

### B.5 Forme des raies d'absorption

La courbe d'absorption est, selon le cas, décrite par une raie gaussienne ou une raie lorentzienne. Les raies lorentziennes correspondent à des raies dites homogènes, pour lesquelles la largeur de raie est déterminée par la durée de vie des états entre lesquels a lieu la transition. Les raies gaussiennes correspondent à des raies dites inhomogènes, dont la largeur est généralement très supérieure à celle des raies homogènes. Plusieurs phénomènes participent à l'élargissement inhomogène. Il peut s'agir soit de la présence de couplage hyperfin de constante de couplage inférieure à la largeur des raies homogènes, d'un effet de désordre (« g-strain »). Les conditions de résonance de certaines espèces paramagnétiques sont très sensibles à la forme chimique ou à l'environnement chimique, ce qui induit une petite distribution des valeurs du facteur g, qui provoque un élargissement des raies.

### B.6 Anisotropie spectrale

Dans le cas d'un ion isolé, le moment orbital  $\vec{L}$  contribue également au paramagnétisme électronique et peut se coupler avec le moment cinétique de spin  $\vec{S}$  pour donner un nouveau moment cinétique  $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$  (couplage spin-orbite). Dans ce cas, le facteur  $g_e$  pour l'électron est remplacé par le facteur de Landé donné par l'Equation II.19.

$$g_J = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad \text{Équation II.19}$$

Enfin, dans le cas d'un solide, l'atome n'est pas isolé et l'électron non apparié subit de la part des atomes voisins plusieurs champs électrostatiques dont la résultante est le champ cristallin. Dans les solides et plus particulièrement dans les réseaux cristallins, si l'électron est localisé sur une orbitale particulière non sphérique, celui-ci va réagir de manière différente avec le changement d'orientation du champ magnétique par rapport à l'axe de l'orbital. C'est le phénomène d'**anisotropie spectrale**. Ce champ cristallin, en agissant sur le moment cinétique orbital  $\vec{L}$  va perturber le couplage spin-orbite provoquant un blocage partiel de ce moment cinétique, le moment orbital effectif « L » est égal à zéro. Le facteur g perd donc sa signification physique et est remplacé par un facteur spectroscopique appelé facteur de décomposition spectrale ou tout simplement « facteur g ». Ce facteur va donc être sensible à l'environnement dans lequel se trouve l'atome et va refléter la symétrie du site dans lequel l'atome est placé. Le facteur g, déterminé par l'expérience, devient alors une matrice notée [g]. Le Tableau II.1 résume les caractéristiques de cette matrice pour les principaux cas de symétrie et la Figure II.3 donne les spectres RPE correspondant aux symétries axiale et rhombique.

Tableau II.1 : Récapitulatif des composantes de la matrice  $g$  suivant les environnements possibles dans un réseau cristallin.

Système	Matrice $g$	Tenseur $A$
Isotrope	$g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$	$A_x = A_y = A_z$
Axial	$g_{xx} = g_{yy} = g_{\perp}$ et $g_{zz} = g_{\parallel}$	$A_x = A_y = A_{\perp}$ et $A_z = A_{\parallel}$
Rhombique	$g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$	$A_x \neq A_y \neq A_z$

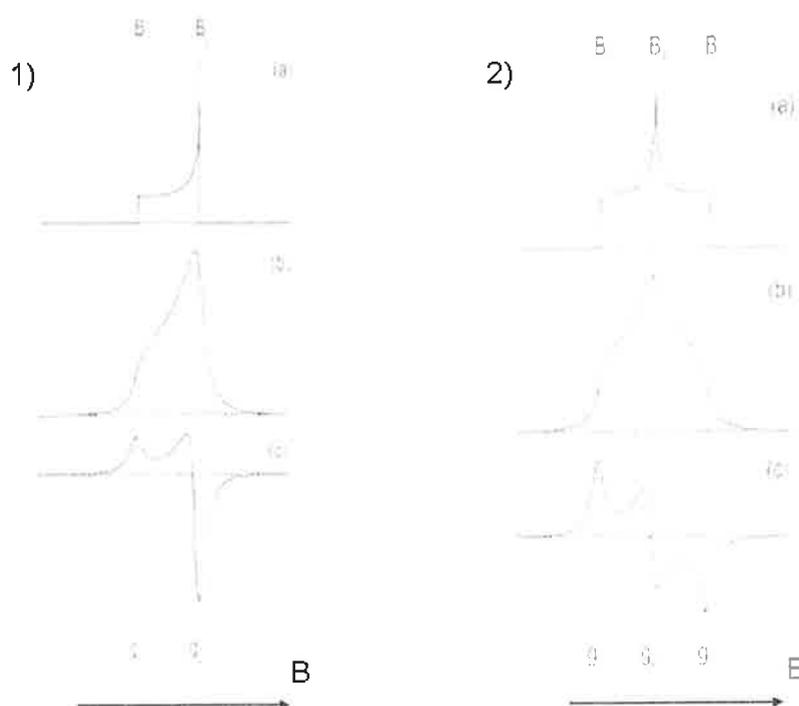


Figure II.3 : Spectres RPE « de poudre » correspondant à une symétrie axiale 1) et à une symétrie rhombique 2). Les spectres (a) correspondent à des spectres d'absorption idéaux, les spectres (b) correspondent à des spectres d'absorption réels, les spectres (c) correspondent à la première dérivée de (b).

### B.7 Structure hyperfine

Les noyaux possédant un spin nucléaire  $I$  non nul peuvent voir celui-ci interagir avec le moment magnétique électronique. L'interaction des deux moments magnétiques induit une décomposition des niveaux d'énergie de spin appelée **structure hyperfine** (ou *hf*). L'énergie d'interaction magnétique entre le noyau et l'électron est donnée par l'hamiltonien donné dans l'Equation II.20.

$$\hat{H}_{ih} = \hat{S} \cdot \tilde{A} \cdot \hat{I} \quad \text{Équation II.20}$$

où  $A$  est le tenseur de l'interaction hyperfine. Ce tenseur est la somme d'une interaction isotrope (ou interaction de contact de Fermi) et d'une interaction anisotrope de couplage dipôle-dipôle. La composante isotrope est caractérisée par la constante de couplage hyperfin ( $a_0$ ). L'intensité de ce couplage dépend de l'orientation, de la distance et de l'intensité du dipôle nucléaire. Le nombre de raies de résonance dépend du spin nucléaire  $I$ . Au champ magnétique statique qui lève la dégénérescence des niveaux d'énergie, s'ajoutent les  $(2I+1)$  champs magnétiques locaux créés par le spin nucléaire ; chaque sous niveau électronique sera décomposé en  $(2I+1)$  valeurs de  $m_I$  et aux  $(2I+1)$  transitions permises correspondent  $(2I+1)$  raies d'absorption (Fig. II.4). Les transitions suivent les deux règles suivantes :  $\Delta m_s = \pm 1$  et  $\Delta m_I = 0$ .

Dans les molécules organiques, les électrons non appariés interagissent principalement avec les protons ( $I=1/2$ ) et l'azote ( $I=1$ ). Sur la Figure II.4, pour le couplage avec deux protons équivalents ( $I=2 \times 1/2$ ), seules les trois transitions  $k$ ,  $l$ , et  $m$  sont permises, le niveau correspondant à  $m_I = 0$  étant doublement dégénéré.

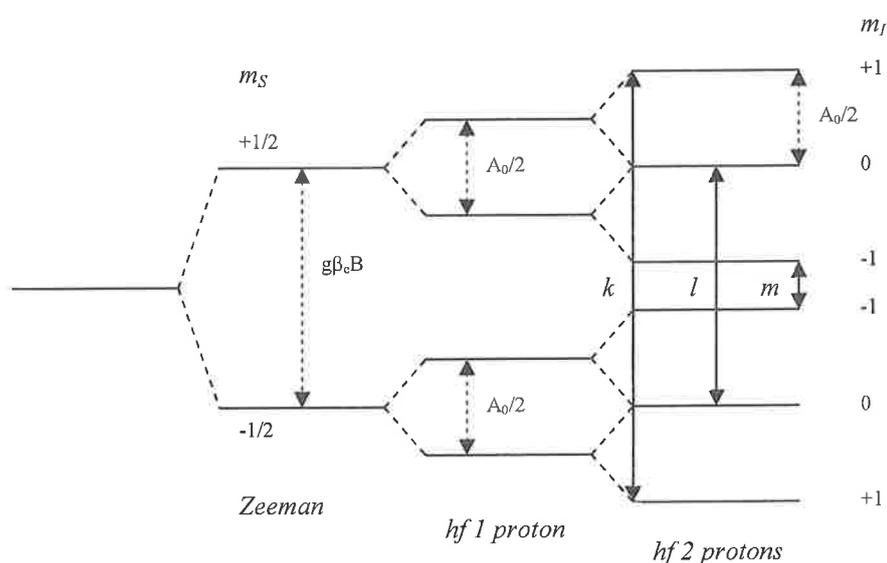


Figure II.4 : Niveaux d'énergie et transition pour un système avec un électron non apparié et deux noyaux équivalents de spin  $I = 1/2$  ayant la même constante de couplage hyperfin ( $A_0$ ).  $k$ ,  $l$  et  $m$  correspondent aux transitions autorisées.

La transition  $l$  est deux fois plus intense que  $k$  ou  $m$ , car elle a lieu entre des niveaux doublement dégénérés. Pour deux protons avec des constantes de couplage différentes, donc sans niveau dégénéré, quatre raies sont observées. De manière générale, si l'on a deux groupes de protons équivalents comportant respectivement  $m$  et  $n$  protons, le nombre de raies observables sera  $(m+1).(n+1)$ .

Au final le nombre de raies observées et leur intensité relative dépend du nombre de noyaux dans la molécule. En analysant le nombre de raies, leurs séparations et leurs intensités relatives, il est possible de déterminer le type et le nombre de spins nucléaires qui interagissent avec les électrons et ainsi, suivant les cas, de déterminer la structure du radical.

Le couplage théorique hyperfin pour deux protons équivalents donne un triplet d'intensité relative 1 : 2 : 1 et pour trois protons un quadruplet d'intensité relative 1 : 3 : 3 : 1 (Fig. II.5).

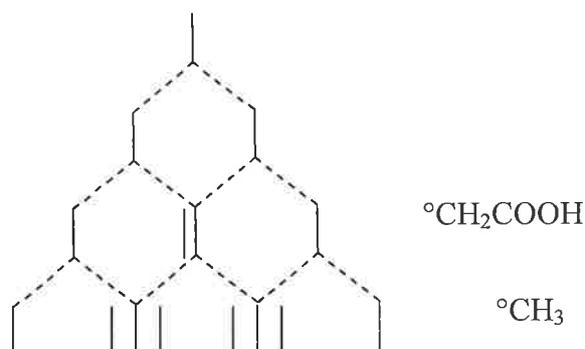


Figure II.5 : Couplage théorique de l'interaction hyperfine de protons, pour une contribution équivalente de 2 et 3 protons (Ikeya, 1993).

### B.8 Eclatement à champ nul et structure fine

Lorsque le système étudié présente deux ou plusieurs électrons non appariés, le couplage entre ces électrons est suffisamment important pour qu'il ne soit plus correct de considérer séparément leur moment magnétique. Il faut alors considérer un moment résultant de spin qui est supérieur à  $\frac{1}{2}$ . Ce type de système présente une interaction supplémentaire appelée éclatement à champ nul. Cette interaction provient des couplages intenses « dipolaire » et « spin-orbite » entre les spins électroniques et leur moment angulaire orbital. Les deux principaux types de centres paramagnétiques qui présentent ce type d'interaction sont, d'une part, les molécules organiques dans un état triplet (ou dans un état de multiplicité supérieur) et, d'autre part, les ions de transition (à l'exception des ions  $d^1$  et  $d^9$ ). Cette interaction est caractérisée par l'éclatement des niveaux d'énergie en l'absence de champ magnétique externe, d'où l'appellation d'éclatement à champ nul. De ce fait, cette interaction est singulière par rapport à celles décrites précédemment qui n'interviennent qu'en présence d'un champ magnétique externe.

L'origine de cette interaction réside principalement dans l'interaction dipolaire pour les molécules organiques et dans le couplage spin-orbite pour les ions de transitions. En présence d'un champ magnétique externe, cette interaction peut induire une structure supplémentaire dans le spectre, appelée **structure fine**. A titre d'exemple, la Figure II.6 présente le cas d'un état triplet ( $S=1$ ). Dans ce cas,  $2S=2$  transitions normalement interdites ( $\Delta m_S = \pm 1$  et  $\Delta m_I = \pm 1$ ) peuvent être observées.

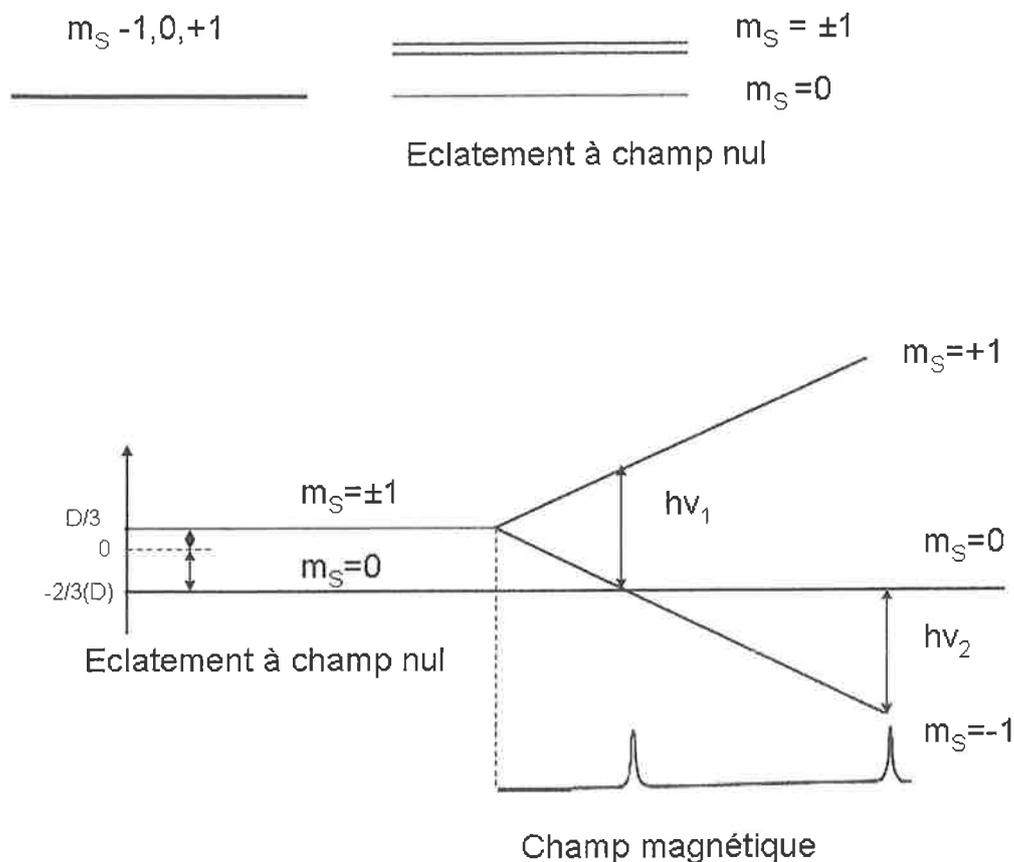


Figure II.6 : Schéma des niveaux d'énergie et effet sur la résonance dans le cas d'un état triplet ( $S=1$ ).

Dans le cas des ions  $d^5$  ( $S=5/2$ ), on observe donc  $2S=5$  transitions comme le montre la Figure II.7. Pour l'ion  $d^5 \text{Mn}^{2+}$ , l'interaction hyperfine se conjugue à l'interaction d'éclatement à champ nul, un spectre RPE comportant 30 raies peut être en théorie observé. Le  $\text{Mn}^{2+}$  a  $2S+1=6$  niveaux d'énergie ( $m_S = 5/2, 3/2, 1/2, -1/2, -3/2, -5/2$ ) qui, sous l'influence du moment de spin nucléaire de  $\text{Mn}^{2+}$  ( $I=5/2$ ), se sous divisent en  $2I+1=6$  niveaux, soit au total 36 niveaux d'énergie. En l'absence d'éclatement à champ nul, mais avec l'interaction hyperfine, les règles de sélection des transitions permises ( $\Delta m_S = \pm 1$  et  $\Delta m_I = 0$ ) donnent six raies de résonance pour le  $\text{Mn}^{2+}$  (sextuplet). Avec l'éclatement à champ nul, comme le montre la Figure II.7,  $2S=5$  transitions normalement « interdites » ( $\Delta m_S = \pm 1$  et  $\Delta m_I = \pm 1$ ) peuvent être observées.

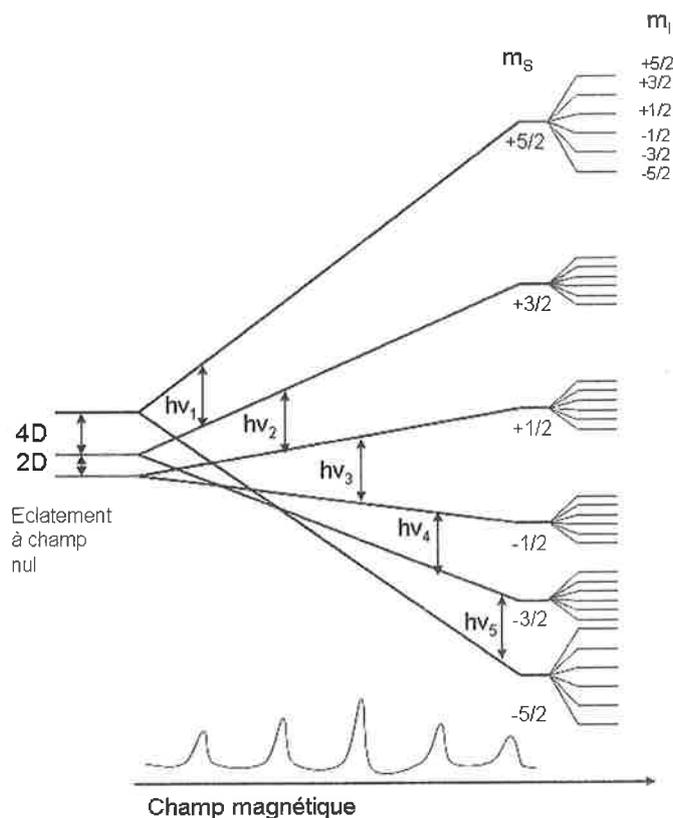


Figure II.7 : Schéma des niveaux d'énergie et effet sur la résonance dans le cas de l'ion  $Mn^{2+}$  ( $d^5, S=5/2$ ).

Les raies de la structure fine sont souvent bien moins intenses que celles liées à l'interaction hyperfine. La position des raies de la structure fine est très dépendante de l'orientation du système dans le champ magnétique externe comme la montre la Figure II.8 pour un système avec  $S=5/2$ . Seule la raie correspondant à la transition  $-1/2 \rightarrow 1/2$  est relativement isotrope.

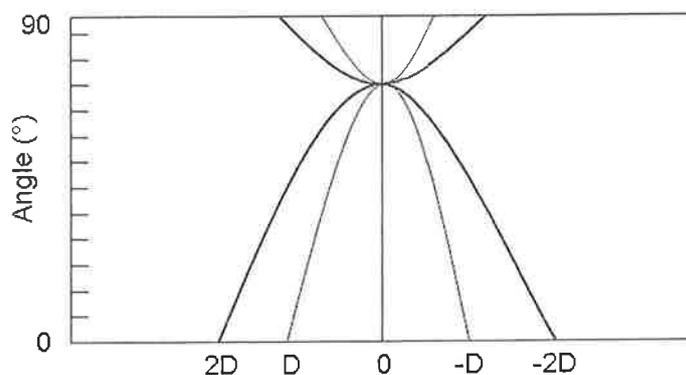


Figure II.8 : Représentation schématique de la variation angulaire de la position des raies de la structure fine pour  $S=5/2$ .

Le paramètre D qui régit cette interaction comme indiqué sur la Figure II.8, est issu de la description de cette interaction dans le formalisme de l'hamiltonien de spin (Equ. II.21).

$$\hat{H}_{\text{éclatement}} = \hat{S} \cdot \tilde{D} \cdot \hat{S} \quad \text{Équation II.21}$$

où D est le tenseur de l'interaction d'éclatement à champ nul qui comporte les contributions des interactions spin-orbite et dipolaires entre électrons non appariés. Dans un système cartésien, l'opérateur s'écrit selon l'Equation II.22.

$$\hat{H}_{\text{éclatement}} = D_x \cdot \hat{S}_x^2 + D_y \cdot \hat{S}_y^2 + D_z \cdot \hat{S}_z^2 \quad \text{Équation II.22}$$

En général, l'opérateur dépend de deux paramètres indépendants D et E. Si l'on considère que Z est l'axe principal, l'opérateur peut alors être exprimé selon l'Equation II.23.

$$\hat{H}_{zfs} = D \left[ \hat{S}_z^2 - S(S+1)/3 \right] + E \left( \hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2 \right) \quad \text{Équation II.23}$$

avec  $D = 3D_{zz} / 2$  et  $E = (D_{xx} - D_{yy}) / 2$

Les  $D_{ii}$  sont les valeurs principales du tenseur D. D caractérise l'effet du champ ligand et E la symétrie du système ou encore « l'anisotropie » de la structure fine. La position des raies est liée à la valeur de D (Fig. II.6). Lorsque  $E=0$ , nous sommes dans le cas de la symétrie axiale (d'axe Z). Lorsque E est non nul, on parle de symétrie rhombique, bien que cette dénomination ne soit pas en fait descriptive de la géométrie du système.

### ***B.9 Description des différentes techniques et spectromètres RPE utilisées***

Les différentes techniques de RPE sont des moyens d'investigation fréquemment utilisés tant en chimie qu'en biologie. Ces techniques permettent par exemple l'étude de complexes de métaux de transition, l'étude de l'action des radicaux libres, la datation des fossiles, la détection d'aliments ionisés, etc. Les nouveaux développements en matière de RPE, notamment en termes d'imagerie, se font principalement dans le domaine de la biologie pour la détection in-vivo de radicaux (oxymétrie, radical NO, etc.), ceci pour des fréquences inférieures au GHz. La dosimétrie des rayonnements ionisants, bien qu'étant l'une des premières applications de la RPE, reste une application marginale de cette technique.

Les différentes bandes de fréquence utilisées en RPE sont données dans le Tableau II.2. Les fréquences inférieures à 1 GHz, bien que de plus en plus utilisées en biologie, n'ont pas encore d'appellation. La bande X est la plus utilisée, suivie par les bandes Q, L et W.

Tableau II.2 : Classification des bandes de fréquence.

Bande	Bande de fréquence (GHz)	Longueur d'onde dans le vide (cm)	B (mT) (signal à g=2)
L	1 à 2	30 à 15	35,7 à 71,4
S	2 à 4	15 à 7,5	71,4 à 142,8
C	4 à 8	7,5 à 3,75	142,8 à 285,6
X	8 à 12	3,75 à 2,5	285,6 à 428,4
Ku	12 à 18	2,5 à 1,67	428,4 à 642,6
K	18 à 27	1,67 à 1,11	642,6 à 963,9
Q	27 à 40	1,11 à 0,75	963,9 à 1428
U	40 à 60	0,75 à 0,5	1428 à 2142
V	60 à 80	0,5 à 0,375	2142 à 2856
W	80 à 100	0,375 à 0,3	2856 à 3570

### C. SPECTROSCOPIE RPE EN ONDE CONTINUE

Les spectromètres RPE en onde continue ou CW-EPR fonctionnent généralement à fréquence fixe et continue avec un balayage linéaire de champ magnétique. Cette méthode spectroscopique RPE permet de mesurer l'absorption de la micro-onde. En dosimétrie, la plupart des études sont menées en bande X, parce que cette fréquence permet des mesures reproductibles et qu'elle est facilement mise en œuvre. Depuis quelques années, des études de dosimétrie sont également menées à plus basse fréquence, notamment en bande L, afin de réaliser des mesures *in vivo* sur des victimes d'irradiation par exemple. Dans cette thèse, nous utiliserons à la fois les bandes X et Q.

Généralement le champ magnétique est modulé par un champ magnétique sinusoïdal de faible amplitude permettant la détection de très faible niveau d'absorption, le spectre mesuré correspond alors à la dérivée première de l'absorption (Fig. II.9).

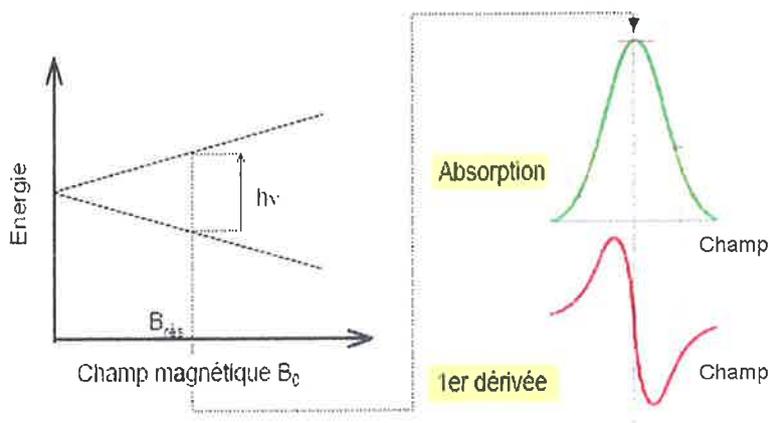


Figure II.9 : Spectre d'absorption du rayonnement micro-onde, et sa dérivée première.

Lors de la mesure par RPE, l'amplitude de la modulation appliquée influe directement sur la largeur de raie mesurée. L'augmentation de l'amplitude de la modulation induit un élargissement des raies observées. L'intensité des raies est directement proportionnelle au nombre de radicaux présents dans l'échantillon. Physiquement, la concentration de spins d'un échantillon correspond à la double intégration des raies RPE mesurées.

### C.1 Description des éléments d'un spectromètre en onde continue

L'appareillage d'un spectromètre RPE (Fig. II.10) est constitué d'un générateur hyperfréquence (source de micro-ondes), d'un électro-aimant constitué de deux bobines qui génèrent un champ magnétique variable, d'une cavité résonante dans laquelle l'échantillon est inséré, et d'un système permettant de détecter l'absorption de la micro onde. Un dispositif de modulation de champ permet d'améliorer la sensibilité de la détection.

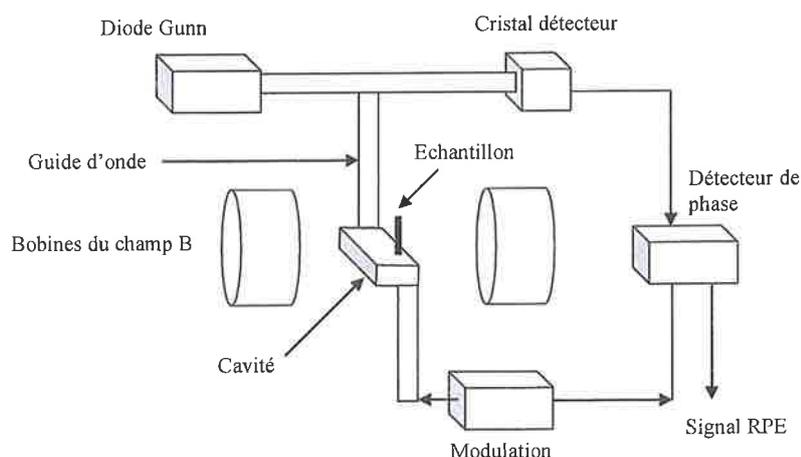


Figure II.10 : Ensemble des éléments d'un spectromètre.

### **C.1.1 Générateur micro-onde**

Les micro-ondes générées par un klystron<sup>3</sup> ou une diode Gunn sont conduites jusqu'à la cavité résonante par l'intermédiaire d'un guide d'onde. La fréquence de l'onde est déterminée par la tension appliquée au klystron. Pour obtenir la résonance, la fréquence de l'onde produite par le klystron ou la diode Gunn doit être égale à celle de la cavité. Dans le cas contraire, le signal est parasité. Les alimentations utilisées pour les générateurs micro-onde ne permettent pas d'obtenir une stabilité suffisante. Pour résoudre ce problème, le générateur micro-onde est ainsi doté d'un dispositif de contrôle automatique de la fréquence (AFC). La gamme de fréquence de l'onde électromagnétique et la gamme de champ magnétique utilisée sont liées par la valeur du moment magnétique de spin de l'électron.

### **C.1.2 Electro-aimant**

L'électro-aimant est un système générant une induction magnétique susceptible de créer une force. L'électro-aimant produit au niveau de l'échantillon, un champ magnétique statique homogène dans l'espace et dans le temps. En pratique, le spectre est enregistré à fréquence constante et à champ variable linéairement dans le temps. La vitesse de variation du champ est ajustable avec certains paramètres de mesure.

### **C.1.3 Cavité résonante**

La cavité résonante est un des éléments les plus importants de l'ensemble des constituants du spectromètre du fait qu'elle contient l'échantillon à analyser. Elle se comporte comme un circuit RLC. L'utilisation d'une cavité résonante permet d'augmenter la sensibilité (fonctionnement en « réflexion »). Une onde hyperfréquence venant du générateur micro-onde via un guide d'onde entrant dans cette cavité se réfléchit sur les parois. Si la fréquence de cette onde correspond à la fréquence de résonance de la cavité, les réflexions multiples sur les parois produisent des interférences constructives qui forment une onde stationnaire à l'intérieur de la cavité. La cavité résonante stocke donc l'onde hyperfréquence et l'énergie qui lui est associée. L'énergie stockée se stabilise au niveau où les pertes, dues entre autres à l'imperfection des parois réfléchissantes, compensent juste l'apport de l'onde arrivant dans la cavité. L'efficacité d'une cavité résonante est mesurée par son facteur de qualité, noté Q. Le facteur de qualité s'exprime comme le ratio de l'énergie maximale de l'onde micro-onde stockée dans la cavité ( $E_{\max}$ ) et l'énergie perdue par cycle ( $E_{\text{perdue}}$ ) (Eq. II.24):

$$Q = 2\pi \cdot \frac{E_{\max}}{E_{\text{perdue}}} \quad \text{Équation II.24}$$

---

<sup>3</sup> Le klystron est un tube à vide qui permet de réaliser des amplificateurs de moyenne et forte puissance à bande étroite en hyperfréquences

### C.1.4 Système de détection

La puissance absorbée à la résonance est détectée à l'aide d'une diode montée dans un pont où la cavité est équilibrée par une charge ajustable. Quand le champ magnétique arrive à la valeur de résonance de l'échantillon, ce dernier commence à manifester l'absorption du rayonnement hyperfréquence. Cela se traduit par un changement de facteur de qualité  $Q$  de la cavité. Le pont se trouve déséquilibré, produisant ainsi une modification du courant électrique traversant la diode. Cette modification de courant, qui est mesurée, produit le signal RPE.

### C.1.5 Dispositif de modulation de champ

Pour amplifier et éliminer les perturbations du signal, celui-ci est modulé en faisant osciller le champ magnétique sur une amplitude faible par rapport à la raie RPE mesurée (Fig. II.11). Cette oscillation est produite par des bobines dites de « modulation » placées de part et d'autre de la cavité. La fréquence de modulation est généralement fixée à 100 kHz. Le signal est démodulé après le cristal détecteur par un circuit électronique (dit « détection synchrone ») qui sélectionne les signaux ayant une fréquence de 100 kHz et la même phase que le courant utilisé par les bobines de modulation. Cette modulation d'amplitude convertit le signal d'absorption en sa dérivée première. Ce type de détection permet ainsi d'éliminer les parasites qui ne sont pas sensibles au champ magnétique dans la cavité et tous les bruits à basses fréquences et ensuite d'augmenter le rapport signal sur bruit.

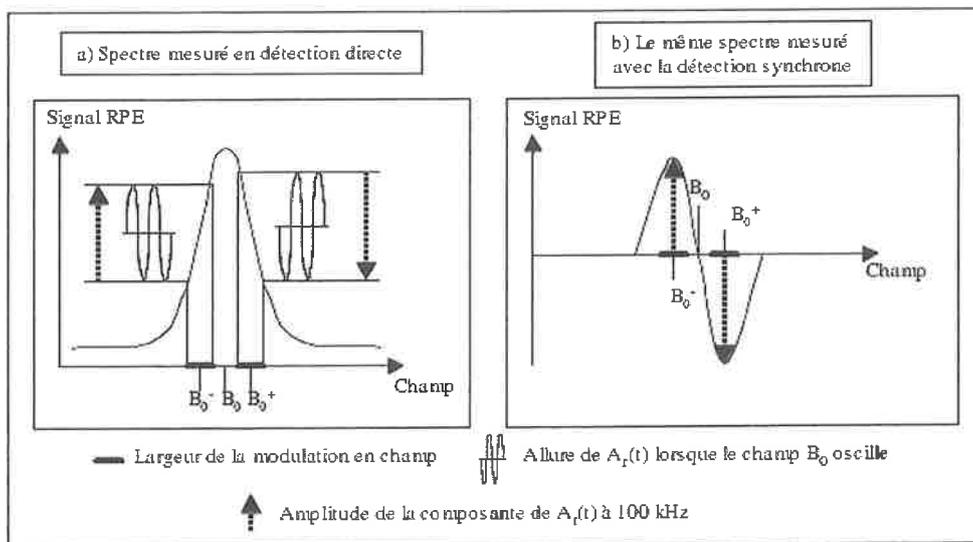


Figure II.11 : Effet de la modulation du champ magnétique sur l'allure d'une raie RPE. L'allure de la raie (cadre a) est celle qu'on obtiendrait si le spectre était mesuré en détection directe. En appliquant une modulation de champ de petite amplitude comparée à la largeur de raie, on obtient un signal oscillant. L'amplitude des oscillations dépend de la pente du spectre au champ considéré. Elle est mesurée par la détection synchrone et on obtient un spectre (cadre b) qui est proche de la dérivée par rapport au champ du spectre obtenu sans détection directe.

Le système de détection des deux spectromètres utilisés permet également d'enregistrer la seconde harmonique de la fréquence de modulation. Les spectres mesurés correspondent alors à la dérivée seconde du spectre d'absorption (Poole, 1996). Le signal mesuré est beaucoup moins intense, mais une meilleure résolution des signaux peut être obtenue. Nous avons utilisé ces conditions d'enregistrement afin de pouvoir mieux interpréter les signaux mesurés dans les conditions normales d'enregistrement. Lorsque les signaux RPE ne sont pas assez bien résolus, la mesure en seconde harmonique peut aider à l'interprétation des spectres en première harmonique. Cependant, compte tenu de la faible intensité du signal mesuré, des temps d'acquisition très importants sont nécessaires, ce qui ne permet pas d'utiliser ce paramétrage de manière systématique.

Il est également possible de détecter le signal à différentes valeurs de phase. Lorsque les temps de relaxation des espèces mesurées sont de l'ordre de grandeur de l'inverse de la fréquence de modulation, il est possible de détecter leur signal en quadrature de phase ( $90^\circ$ ). Ainsi dans un spectre multi-composite mesuré en phase, il est possible, par une mesure en quadrature de phase, de détecter sélectivement les espèces paramagnétiques présentant des temps de relaxation proches de l'inverse de la fréquence de modulation. Au cours de cette étude les mesures RPE en onde continue ont été réalisées sur des spectromètres de la série EMX et EMX+, construits par la société Bruker. Ces spectromètres sont équipés de ponts hyperfréquences fonctionnant en bande X (9,8 GHz) ou en bande Q (34 GHz).

### ***C.2 Paramètres d'acquisition d'un spectre RPE***

Les paramètres d'acquisition influant sur la mesure du signal RPE sont : la puissance du rayonnement micro-onde, l'amplitude de la modulation du champ magnétique, les constantes de temps et le nombre d'accumulations du spectre, également appelé « nombre de scans ». La puissance micro-onde et la modulation en amplitude du champ sont les paramètres les plus « échantillons dépendants » et doivent de ce fait être optimisés pour chaque type d'échantillon. Les autres paramètres de mesures sont généralement fixés et seul le nombre de scans est ajusté en fonction du rapport signal-sur-bruit désiré.

#### **C.2.1 Puissance de la micro-onde**

La puissance micro-onde est, avec l'amplitude de la modulation, l'un des paramètres qui influe le plus sur l'intensité et la forme du signal mesuré. En l'absence de phénomène de saturation, l'intensité du signal mesuré est proportionnelle à  $B_1$  (composante magnétique de la micro-onde). Si l'on se réfère à l'Equation II.18, l'intensité du signal est donc proportionnelle à la racine carrée de la puissance absorbée par l'échantillon, c'est pourquoi l'intensité du signal est souvent représentée en fonction de la racine carrée de la puissance, lorsque l'influence de ce paramètre est étudiée. Il est très fréquent d'observer des phénomènes de saturation du signal lorsque la puissance micro-onde augmente. De manière intuitive, on

comprend que lorsque les temps de relaxation sont relativement longs, les niveaux d'énergie inférieurs se dépeuplent au profit des niveaux supérieurs, et comme l'absorption dépend de la différence de population entre deux niveaux d'énergie, une diminution de cette différence entraîne une diminution de l'absorption. De manière générale, pour les faibles niveaux de puissance, l'amplitude du signal augmente linéairement avec la racine de la puissance. Lorsque les phénomènes de relaxation ne permettent plus de repeupler les niveaux d'énergie inférieurs, il n'y a plus de relation linéaire, on atteint alors un régime de saturation. La valeur de la saturation dépend de la nature du matériau étudié et également du type de cavité résonante (Ivannikov et al., 2002a). La saturation présente un comportement très différent selon qu'il s'agit de raies homogènes ou inhomogènes. Dans le cas d'une raie homogène, le comportement de l'amplitude du signal mesuré ( $A_{pp}$ ) vis-à-vis de l'énergie injectée ( $B_1$ ) peut être approximé par la relation donnée dans l'Equation II.25.

$$A_{pp} \propto \frac{X}{1 + X^2} \quad \text{avec} \quad X = \gamma B_1 \sqrt{T_1 T_2} \quad \text{Équation II.25}$$

A faible puissance micro-onde,  $A_{pp}$  augmente de manière linéaire avec  $B_1$  ou avec la racine carrée de la puissance micro-onde, atteint un maximum pour  $X=1$  et décroît en  $1/X$  pour les niveaux de puissance supérieurs (Fig. II.12). L'Equation II.26 donne la relation d'approximation pour le cas d'une raie complètement homogène.

$$A_{pp} \propto \frac{X}{\sqrt{1 + X^2}} \quad \text{Équation II.26}$$

Dans ce cas, pour les très faibles niveaux de puissance ( $X \ll 1$ ),  $A_{pp}$  augmente linéairement avec  $B_1$ . Lorsque  $X$  se rapproche de 1, l'augmentation n'est plus linéaire et  $A_{pp}$  atteint une valeur maximum. Après avoir atteint ce maximum ( $X > 1$ ), l'amplitude  $A_{pp}$  ne varie plus (Fig. II.12).

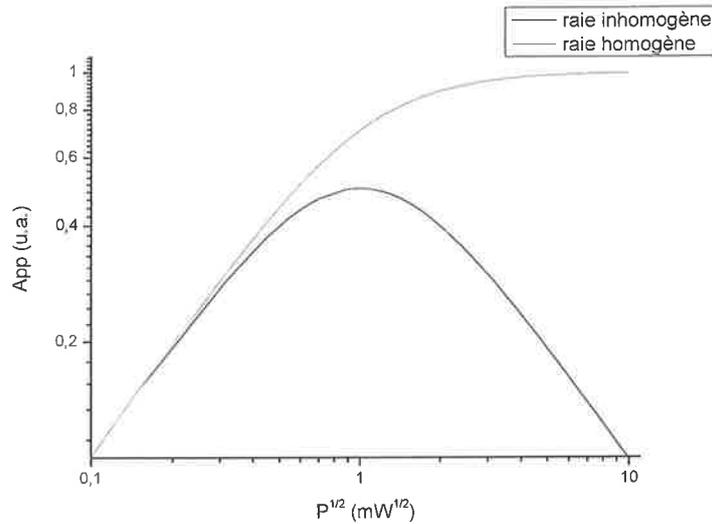


Figure II.12 : Exemple du comportement d'une raie homogène (lorentzienne) et d'une raie complètement inhomogène (en général gaussienne) en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde.

### C.2.2 Modulations en amplitude et en fréquence du champ

L'amplitude de la modulation du champ magnétique influe sur l'intensité du signal, la résolution et également sur le rapport signal sur bruit. L'intensité du signal de même que le rapport signal sur bruit augmentent avec l'amplitude de la modulation. Selon Bartolotta et al., (1993) le rapport entre l'amplitude de la modulation et la constante de temps a également une influence significative sur le rapport signal sur bruit. Si l'amplitude de la modulation est plus grande que la séparation de deux raies spectrales, le spectre est déformé et les deux raies sont indiscernables comme on peut le remarquer sur la Figure II.13. Si cette amplitude est beaucoup plus petite que la séparation spectrale, alors le signal et le rapport signal sur bruit diminuent.

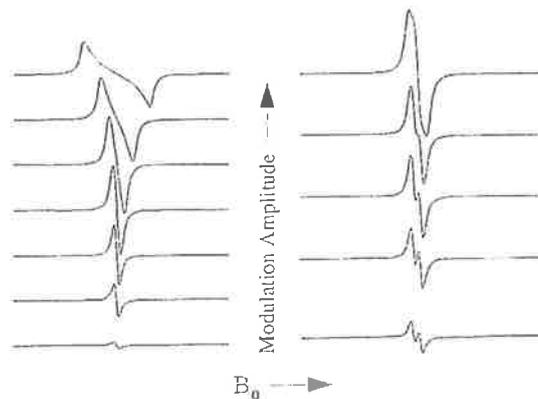


Figure II.13 : Effet de la modulation d'amplitude sur le spectre RPE.

### C.2.3 Constante de temps

La constante de temps filtre le bruit en ralentissant le temps de réponse du spectromètre. Lorsque la constante de temps augmente, le niveau de bruit s'abaisse. Si la constante de temps

choisie est trop longue par rapport à la vitesse de balayage, le signal RPE peut être distordu ou même filtré. Le temps nécessaire à l'acquisition d'une raie RPE doit être dix fois plus long que la constante de temps (Ikeya, 1993).

#### **C.2.4 Nombre de scans**

L'accumulation de  $n$  mesures successives permet d'améliorer le rapport signal sur bruit. L'accroissement du signal est proportionnel à  $n$  alors que le bruit est proportionnel à la racine de  $n$ . Le rapport signal sur bruit est alors proportionnel à  $\sqrt{n}$ . Par conséquent le rapport signal sur bruit peut être amélioré en augmentant le nombre de mesures successives ou nombre de scans.

### **D. SPECTROSCOPIE RPE PULSEE : ESEEM ET HYSORE**

Au cours de ce travail de thèse, nous avons été amenés à utiliser des techniques de RPE pulsée pour mieux comprendre la nature des signaux mesurés en spectroscopie en onde continue. En spectroscopie en onde continue, la composante magnétique de la micro-onde,  $B_1$ , a une amplitude qui ne varie pas au cours du temps, ce qui correspond à un état stationnaire d'interaction entre la micro-onde et les spins électroniques. Dans ce cas, c'est la mesure des transitions énergétiques qui est étudiée et qui permet d'identifier les espèces paramagnétiques mesurées. Cependant, cette technique ne permet pas, du fait de son manque de résolution d'étudier toutes les interactions présentes dans le signal, notamment dans le cas des raies inhomogènes liées à la présence de couplage hyperfin avec des valeurs de couplage inférieures à la largeur des raies considérées. La RPE pulsée, notamment les techniques dites à écho de spin (Electron Spin Echo), permettent d'étudier ces interactions car l'intensité de l'écho de spin est modulée par l'interaction hyperfine et en particulier par sa composante anisotrope.

Dans le cas de la RPE pulsée, l'onde électromagnétique est envoyée sous forme d'impulsions intenses et brèves (temps d'impulsion court devant les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ ). Comme nous l'avons vu précédemment, ces impulsions modifient l'orientation de l'aimantation, qui en l'absence de perturbations supplémentaires revient à son orientation d'origine (relaxation). Ce phénomène de relaxation peut être mesuré au cours du temps. C'est cette mesure qui constitue le principe de base de la RPE pulsée. Selon la composante de l'aimantation qui est mesurée, il est possible d'obtenir plusieurs types d'information sur le système mesuré.

La mesure de la relaxation de la composante  $M_z$  permet par exemple d'estimer le temps de relaxation  $T_1$ . Le retour à l'équilibre thermique du système, donc de la composante  $M_z$  à sa valeur initiale se fait par la relaxation spin-réseau ou longitudinale, caractérisé par le temps  $T_1$  (cf § B.4). Le temps de relaxation  $T_1$  a été estimé à l'aide de la méthode dite d'inversion récupération. La séquence et le principe de cette méthode est donnée en Annexe II.

La mesure de l'aimantation dans le plan XY, permet d'avoir accès à d'autres types d'informations. Avant perturbation, les composantes de l'aimantation dans ce plan ( $M_x$  et

MY) sont nulles. Comme la direction de l'aimantation (initialement orientée selon Z) est perturbée par le pulse, les composantes Mx et My ne sont donc plus nulles et la fréquence de précession des spins est modifiée. Le phénomène de relaxation des composantes transverses (Mx et My) est gouverné par le temps de relaxation  $T_2$  modulé par les interactions des spins électroniques considérés avec les spins environnants, notamment les spins nucléaires. De manière pratique, il n'est pas possible de mesurer directement le temps  $T_2$ . C'est le temps de mémoire de phase  $T_M$  qui est estimé.  $T_M$  est une constante de temps caractéristique de la perte du déphasage des spins et qui dépend de  $T_1$  et  $T_2$ . Lorsque le temps  $T_1$  est très supérieur au temps  $T_2$ , alors on peut considérer que  $T_M$  est égal à  $T_2$ . La mesure et l'analyse de la décroissance de ces composantes permettent de calculer le temps  $T_M$ , mais également d'obtenir des informations sur l'environnement des spins et donc sur les couplages hyperfins avec les atomes environnants.

Pour des raisons pratiques de mesure, la mesure des composantes de l'aimantation dans le plan XY se fait après une série de plusieurs pulses qui vise à générer un écho comme le montre la Figure II.14. Ces séquences ont été définies par Hahn (1950) initialement pour la résonance magnétique nucléaire. La mesure du temps  $T_M$  est basée sur une séquence de mesure à écho de spin (Carr & Purcell, 1954). Cette méthode est également détaillée en Annexe II.

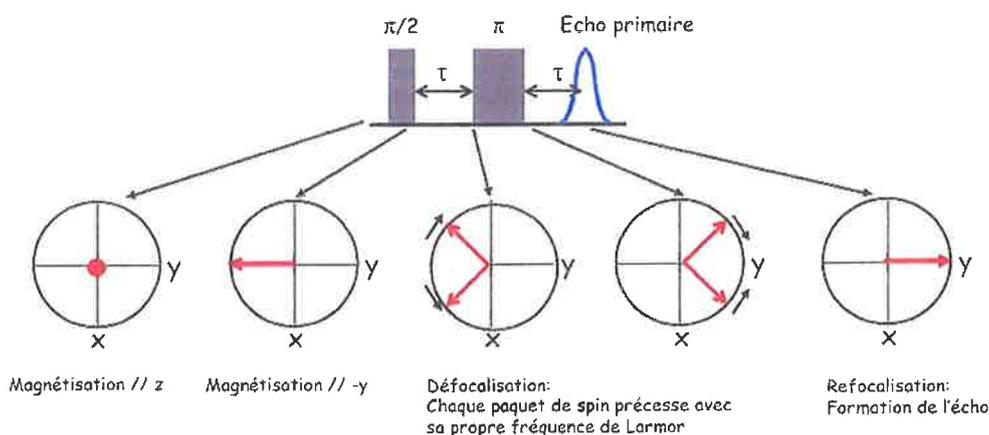


Figure II.14 : Obtention d'un écho. La première impulsion permet de faire basculer l'aimantation initialement orientée parallèlement à Z dans le plan transverse XY, soit d'un angle  $\pi/2$ . Dans le temps  $\tau$  entre les deux impulsions, les spins précessent selon leur propre fréquence. L'application du deuxième pulse orientée selon l'axe X qui permet de faire basculer le moment magnétique des spins d'un angle  $\pi$  dans le plan XY permet de refocaliser les spins sur l'un des axes qui permet d'obtenir un écho.

Lorsque le temps  $\tau$  augmente, les spins sont de plus en plus défocalisés, du fait de leur fréquence de précession propre et donc l'intensité de l'écho décroît. Leur fréquence de précession est notamment modifiée par l'interaction hyperfine des noyaux environnants. De ce fait, la décroissance de l'écho en fonction de  $\tau$  est modulée par l'interaction hyperfine.

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

L'analyse de cette modulation de l'écho permet de déterminer les fréquences nucléaires des noyaux responsables de l'interaction hyperfine, comme le montre la Figure II.15.

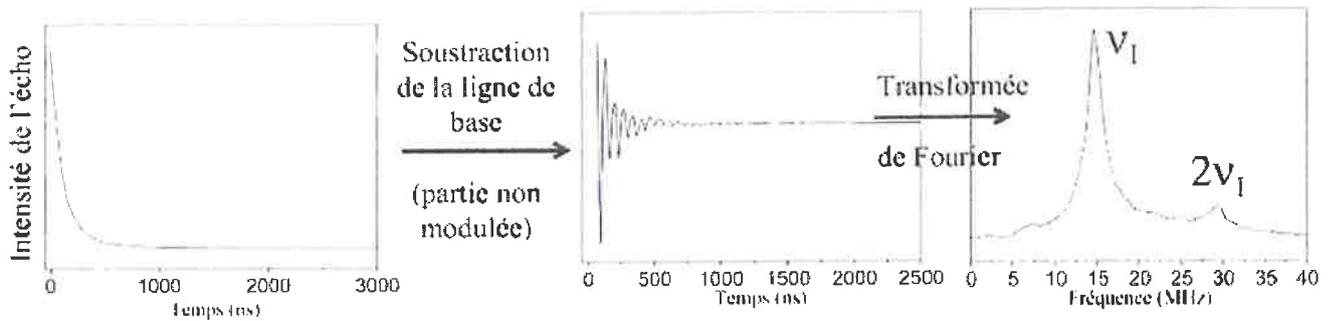


Figure II.15 : Détermination des fréquences nucléaires de modulation à partir de la mesure de la décroissance de l'écho de spin en fonction du temps  $\tau$  : la partie de la décroissance modulée par les interactions est obtenue par soustraction de la ligne de base (partie non modulée), le spectre en fréquence est ensuite obtenu par transformée de Fourier.

Ce type d'expérience à écho de spin est communément dénommé par l'abréviation ESEEM pour « Electron Spin Echo Envelope Modulation ». Les expériences ESEEM comportent généralement de deux à quatre pulses. La Figure II.16 donne la séquence de pulse utilisée lors d'une expérience à quatre pulses (ESEEM-4P). Il est également possible de faire varier les délais  $T_a$  et  $T_b$  de manière indépendante. Ce type d'expérience est appelée HYSCORE pour « Hyperfine Sublevel CORElation spectroscopy ». Cette technique permet d'avoir accès, en plus des fréquences de modulation, aux valeurs de couplages hyperfins et de déterminer les différentes composantes de cette interaction (isotrope, dipolaire et quadripolaire).

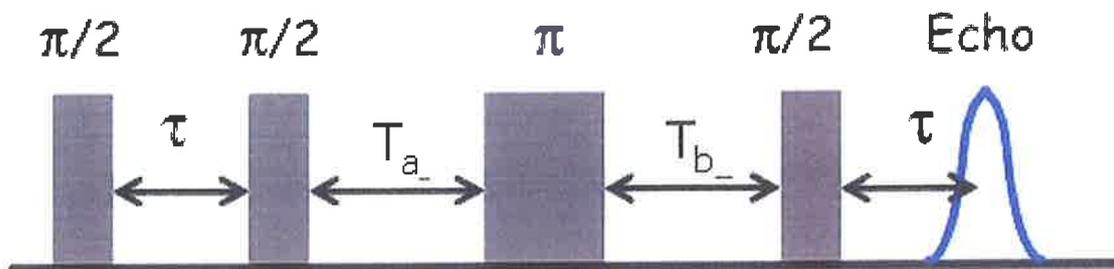


Figure II.16 : Séquence des pulses utilisée lors de l'expérience de type ESEEM-4P pour  $T_a=T_b$  et HYSCORE lorsque  $T_a$  et  $T_b$  varie de manière indépendante.

Parmi toutes les mesures réalisées en RPE pulsée dans le cadre du travail de thèse, seules les mesures HYSCORE ont été reportées. Cette technique a permis de valider certaines hypothèses quant à la localisation des spins électroniques et à leurs interactions hyperfines supposées d'après l'analyse des spectres obtenus en onde continue.

## **E. PRINCIPE GENERAL DE LA DOSIMETRIE DES RAYONNEMENTS IONISANTS PAR RPE**

La dosimétrie des rayonnements ionisants vise à déterminer la quantité d'énergie absorbée ou transmise dans un matériau de volume et de masse définie. De nombreuses techniques de mesure, de calcul ou de simulation sont utilisées selon les besoins. Les principes de la dosimétrie par spectroscopie RPE ont été posés dès le milieu des années cinquante (Combrisson, 1954 ; Uebersfeld, 1956). Les différents processus d'interaction entre un rayonnement ionisant et la matière induisent le désappariement d'électrons. Ainsi peuvent être formés des défauts, des ions ou des radicaux libres. Ces espèces primaires ne sont pas toujours stables et mesurables, et parfois peuvent réagir pour former, suite à des réactions plus ou moins complexes, d'autres espèces paramagnétiques plus stables qui sont elles mesurables et quantifiables. La quantité d'espèces créés par 100 eV définit le rendement radiolytique G. Le principe de la dosimétrie RPE repose sur le fait que l'on peut établir une relation entre le nombre d'espèces paramagnétiques radio-induites et l'énergie absorbée dans un volume de matériau donné, ce qui revient à déterminer le rendement radiolytique lorsque les espèces radiolytiques (initialement formées par l'interaction des rayonnements ionisants) sont suffisamment stables pour être mesurées et quantifiées. Selon le type de matériau et les conditions d'irradiation et de mesure, ce sont parfois les espèces secondaires qui sont dosées. Lorsque la relation entre ces deux paramètres est établie, il est ensuite possible en théorie de déterminer à partir du dosage d'une espèce paramagnétique donnée, l'énergie absorbée par le matériau, c'est-à-dire la dose. La dose absorbée est la quantité d'énergie absorbée par unité de masse dans un matériau donné. Elle est exprimée en  $J.kg^{-1}$  ou en Gy.

De manière pratique, en dosimétrie, le dosage absolu des espèces paramagnétiques radio-induites n'est pas réalisé. La quantité d'espèces paramagnétiques est proportionnelle à la quantité d'énergie absorbée, et donc également à l'intensité du signal RPE mesuré. La dose est ainsi généralement directement reliée à l'amplitude du signal radio-induit, parce que directement mesurable sur un spectre RPE en onde continue. Comme nous le détaillerons dans le paragraphe suivant, la conversion de l'amplitude du signal en termes de dose absorbée est réalisée généralement soit par des courbes d'étalonnage, soit par la méthode des ajouts dosés.

## **F. DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE DES TESTS POUR ETABLIR UN PROTOCOLE D'ESTIMATION DES DOSES**

L'étude d'un matériau donné pour des applications en dosimétrie nécessite plusieurs étapes :

- Optimisation de la préparation des échantillons
- Optimisation des paramètres de mesure
- Etude du signal
  - Identification de l'origine des signaux (intrinsèques, parasites, mécano-induits, radio-induits)
  - Analyse du signal dosimétrique
  - Perte ou gain de signal avec le temps après irradiation (fading)
  - Reproductibilité de la mesure
  - Influence des paramètres extérieurs (température, humidité, etc.)
- Définition du protocole de mesure
- Etude de la réponse en dose
- Détermination de la méthode d'évaluation de la dose : étalonnage, limite de détection et incertitudes associées

### ***F.1 Préparation des échantillons***

Selon le type d'échantillon, une phase de préparation est requise avant la mesure. Pour chaque type d'échantillon un protocole de préparation doit donc être établi ; nettoyage et traitement chimique si nécessaire ou optimisation de la granulométrie par exemple. L'influence des différentes étapes de préparation sur la mesure de l'échantillon doit être évaluée.

### ***F.2 Optimisation des paramètres de mesure***

Les principaux paramètres à optimiser sont la puissance micro-onde et l'amplitude de la modulation. La puissance micro-onde optimale correspond à la puissance maximale du domaine de linéarité de la fonction représentant l'amplitude du signal RPE en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde. Cependant, lorsque plusieurs signaux se superposent, il peut être intéressant de saturer l'un des signaux pour mesurer de manière sélective le signal d'intérêt. Parfois, à la puissance optimale, des raies parasites peuvent apparaître, ce qui a pour effet de distordre la ligne de base, ce qui est préjudiciable lorsque le signal doit subir une déconvolution. Il faut également prendre en compte, dans l'intensité du signal dosimétrique, les composantes non radio-induites, ce qui induit une erreur systématique.

Pour la modulation d'amplitude, le meilleur compromis selon Weil et al. (1994) consiste à fixer une valeur d'amplitude de modulation 4 ou 5 fois inférieure à la valeur pour laquelle l'intensité du signal est maximale. La valeur de la modulation d'amplitude optimale peut être également fixée comme celle donnant le signal le plus intense sans élargissement des pics RPE. La valeur de la modulation dépend également des informations recherchées dans le spectre, par exemple, une valeur élevée ne permettra pas de déconvoluer correctement des raies proches.

### F.3 Etude du signal

#### F.3.1 Analyse du signal dosimétrique

Différentes méthodes sont utilisées pour définir l'intensité du signal. La plus courante consiste à mesurer l'amplitude pic à pic des signaux comme le montre la Figure II.17.

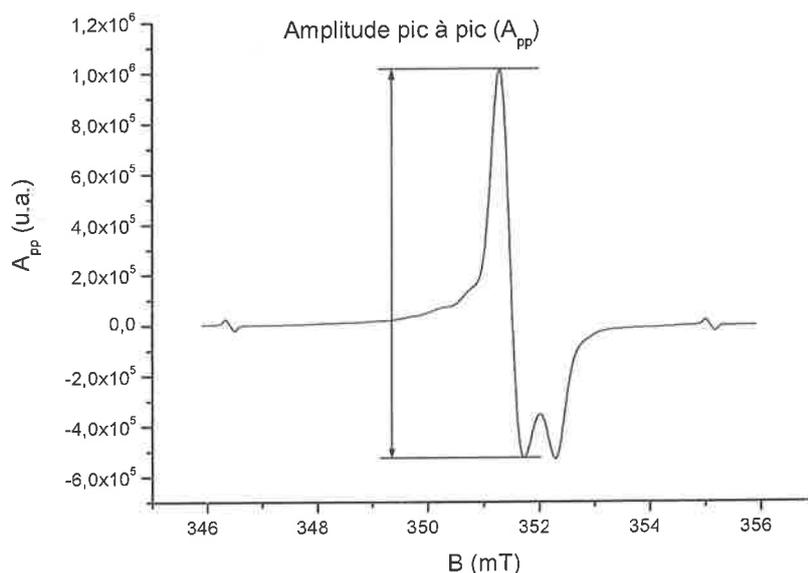


Figure II.17 : Exemple de mesure d'intensité du signal par la méthode dite de l'amplitude « pic à pic » ou App.

Une autre méthode consiste à mesurer l'intégrale de la région d'intérêt du spectre RPE. Cette méthode présente l'inconvénient par rapport à la précédente d'être sensible aux variations de la ligne de base du spectre dans le domaine des faibles doses.

Le signal d'intérêt, notamment pour les doses les plus faibles, peut être masqué par d'autres signaux sans intérêt dosimétrique. Les méthodes de déconvolution du signal ou d'ajouts dosés permettent selon le cas d'estimer l'intensité du signal RPE.

#### F.3.2 Stabilité du signal

Généralement, la forme et l'intensité du signal RPE après irradiation évoluent au cours du temps. Cette caractéristique est liée à la durée de vie des radicaux ou à leur recombinaison. En dosimétrie, seuls les signaux présentant à température ambiante une stabilité suffisante pour

## *Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles*

être mesurés dans un délai raisonnable après irradiation peuvent être considérés. Ainsi, il est nécessaire pour chaque matériau d'étudier la stabilité du signal en fonction de paramètres tels que la température ou l'humidité afin de déterminer le délai dans lequel le signal peut être mesuré.

Dans un nombre limité de matériaux, les temps de demi-vie des espèces radio-induites sont extrêmement longs. Ainsi dans l'hydroxyapatite, les temps de demi-vie des espèces radio-induites sont de l'ordre de 107 années (Ikeya, 1993). Dans la plupart des cas, les signaux radio-induits sont instables à température ambiante. Ainsi, par exemple, on observe une perte de signal de l'ordre 50% en 48 heures pour les phanères (Dalgarno et al., 1989). Pour le mannose, par exemple, on observe une augmentation du signal dosimétrique et une diminution du signal parasite avec une quantité constante de radicaux libres. Le chauffage de certains échantillons permet d'activer la transformation des radicaux et donc d'éliminer les espèces instables lorsque la température et la durée de chauffage sont choisies de manière adéquate (Bartlett, 1982). L'effet de la température est étudié par différents schémas expérimentaux. La variation du signal au cours du temps peut être étudiée pour différentes températures de stockage (traitements thermiques isothermes). Si le signal considéré décroît et que ce phénomène de décroissance est uniquement lié à la température, il est possible à partir de la détermination des constantes de décroissance pour chaque température de stockage d'estimer l'énergie d'activation de la réaction étudiée. Des traitements thermiques isochrones permettent également d'obtenir des informations quant à la stabilité du signal. L'échantillon est chauffé à des températures croissantes pendant un intervalle de temps fixe, une mesure RPE étant réalisée à température ambiante après chaque palier de température. Les données ainsi acquises permettent de définir par exemple la température optimale pour éliminer un signal.

### **F.3.3 Isotropie**

Certains échantillons anisotropes peuvent présenter, du fait de l'anisotropie du facteur  $g$ , une dépendance angulaire de l'amplitude du signal. En effet, les ions et les atomes constituant le réseau cristallin engendrent au niveau de l'ion paramagnétique un champ électrostatique intense appelé champ cristallin, qui se superpose au champ externe. Si par exemple un ion paramagnétique occupe un site de symétrie non cubique, la perturbation due au champ cristallin non-symétrique induit la dépendance du facteur  $g$  par rapport aux orientations relatives du site considéré et du champ magnétique externe. Il est donc nécessaire pour l'établissement d'un protocole de mesure d'étudier la fonction angulaire du signal étudié.

### **F.3.4 Influence des paramètres extérieurs**

Les principaux paramètres extérieurs connus sont le taux d'humidité, la température et l'exposition aux rayonnements ultra-violets. L'effet de ces différents paramètres peut être significatif selon le type de matériau, tant au niveau du stockage avant et après irradiation

## *Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles*

qu'au moment de l'irradiation et de la formation des radicaux ou de la mesure de l'échantillon. L'influence de ces paramètres sur le résultat final doit être autant que possible quantifiée afin de définir un protocole expérimental de mesure et d'éventuels facteurs de correction lorsque les conditions expérimentales sont modifiées.

### ***F.4 Réponse en fonction de la dose***

Quelle que soit la méthode utilisée pour évaluer la dose absorbée, il est indispensable de connaître le comportement du signal en fonction de la dose. Dans la plupart des matériaux couramment utilisés en dosimétrie, les réponses sont linéaires, du moins dans des intervalles de doses relativement étendus. Cependant, ce type de comportement n'est pas universel et la réponse du signal considéré en fonction de la dose n'est pas toujours linéaire. Des phénomènes de saturation peuvent être à l'origine de ces courbes non linéaires. Le signal mesuré peut être également la somme de signaux qu'il n'est pas possible de discriminer et qui réagissent différemment avec la dose. Enfin, la compétition entre différents types de réactions avec des cinétiques différentes peut également être à l'origine de ces phénomènes non linéaires. Il faut également ajouter que la réponse en dose peut être affectée par différents paramètres, telle que la température au moment de l'irradiation par exemple ou encore la présence ou l'absence de lumière lorsque des réactions photo-stimulables sont mises en jeu. Il convient donc d'identifier les paramètres influant sur la réponse en fonction de la dose et d'étudier de manière détaillée leur effet.

### ***F.5 Evaluation de la dose***

Deux méthodes sont principalement utilisées pour estimer la dose absorbée dans les matériaux étudiés ; la méthode dite des ajouts dosés d'une part et l'utilisation d'une courbe d'étalonnage prédéfinie d'autre part. Le choix de la méthode d'évaluation dépend notamment du type d'échantillon, des moyens d'irradiation à disposition, du délai imparti pour estimer la dose et du niveau d'incertitude accepté.

#### **F.5.1 Méthode des ajouts dosés**

La méthode des ajouts dosés consiste à post-irradier l'échantillon à des doses connues et à mesurer le signal après chaque irradiation (Neuilly et CETAMA, 1998). On construit ainsi une courbe d'étalonnage propre à l'échantillon mesuré qui permet de déterminer la dose initiale en calculant l'intersection de la courbe avec l'axe des doses (Fig. II.18). Cette méthode ne s'applique qu'aux échantillons possédant des signaux stables dans le temps. On s'affranchit ainsi des éventuels problèmes de dispersion de la sensibilité entre échantillons. Cette méthode est coûteuse en temps de mesure et nécessite de plus d'avoir à disposition des moyens d'irradiation adaptés.

On peut la considérer comme une méthode de mesure destructive, l'information initiale sur la dose étant perdue. C'est certes la méthode la plus précise mais les délais de réponse sont

importants (de l'ordre de plusieurs jours), même s'il est possible de réduire le nombre de post-irradiations en optimisant la valeur des ajouts dosés (Chumak et al., 1996 ; Hayes et al., 1997 ; Nagy, 2000).

La Figure II.18 illustre un cas concret, traité au laboratoire, de détermination de la dose sur quelques dizaines de milligrammes d'os prélevés sur la côte d'une personne irradiée accidentellement en Géorgie en 2001.

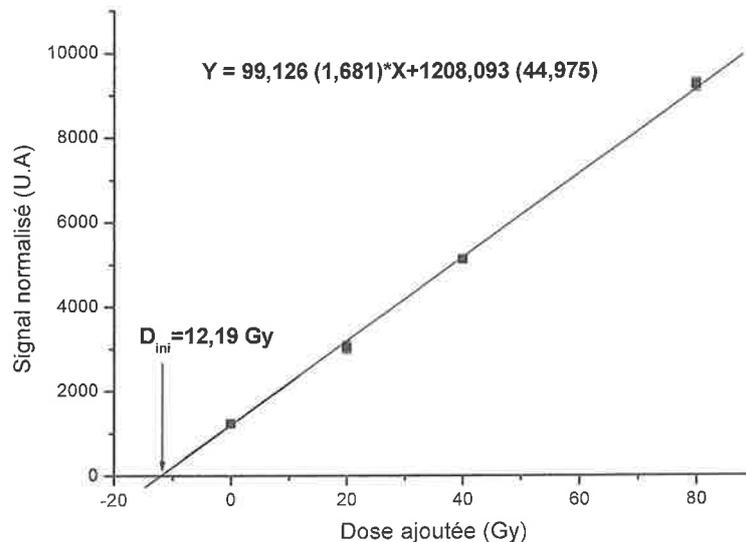


Figure II.18 : Exemple de détermination de la dose absorbée sur un os humain (accident de Lia, Georgie 2001) par la méthode des ajouts dosés

Haskell et al. (2000) proposent une méthode alternative, en irradiant à une forte dose un aliquote de l'échantillon à mesurer afin de déterminer sa sensibilité intrinsèque. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et en partie non destructive, mais nécessite l'utilisation d'un facteur de correction lié au profil de rendement de la cavité pour la mesure de faibles masses. De plus, elle ne s'applique qu'à des échantillons faiblement irradiés ou à des matériaux ayant un domaine de linéarité étendu.

Pour les échantillons présentant un signal instable (généralement une décroissance), il est également possible par post-irradiation d'estimer la dose reçue, mais la méthode utilisée varie sensiblement. Pour estimer la dose sur un échantillon, il est nécessaire dans un premier temps de déterminer la fonction de perte de signal en fonction du temps, qui est généralement dépendant de la température.

Dans un deuxième temps, l'échantillon est irradié de nouveau à une dose connue permettant ainsi d'obtenir une relation dose-signal en fonction du temps écoulé depuis l'irradiation. Si l'on connaît avec suffisamment de précision la date d'irradiation et la température de stockage, il est alors possible d'estimer la dose reçue au cours de l'irradiation.

### F.5.2 Courbe d'étalonnage

La méthode qui consiste à établir une courbe d'étalonnage présente l'avantage d'être rapide et non destructive, mais nécessite pour sa construction la prise en compte d'un certain nombre de facteurs. Des échantillons sont irradiés à des doses prédéfinies afin de construire la courbe de la réponse en fonction de la dose pour un type d'échantillon. Le nombre de doses nécessaires dépend du type de courbe. Pour une réponse linéaire, 4 à 5 doses suffisent à établir les coefficients d'étalonnage (IAEA, 2002). Afin d'adapter le nombre d'échantillons à irradier à chaque dose prédéfinie, il est nécessaire de connaître la dispersion de la sensibilité intrinsèque du type d'échantillon mesuré. Il est également nécessaire de s'assurer que les échantillons choisis sont représentatifs, en termes de sensibilité, des échantillons couramment mesurés. Ce facteur pris en compte dans le calcul d'erreur augmente la valeur finale de l'incertitude par rapport à la méthode précédente. Comme pour la méthode des ajouts dosés, il est nécessaire de prendre en compte le signal initial de chaque échantillon et les éventuels signaux parasites provenant de la cavité résonante ou du tube porte échantillon (IAEA, 2002). Dans certains cas, l'évaluation des faibles doses peut être complexe, notamment par la présence de signaux parasites masquant le signal radio-induit. Dans ce cas, si la déconvolution des signaux n'est pas possible, les deux méthodes précédentes peuvent être combinées (Khan et al., 2003). Un ajout de dose significatif est réalisé sur l'échantillon permettant alors l'évaluation de l'intensité du signal. La dose totale est ensuite évaluée à l'aide d'une courbe d'étalonnage prédéfinie. La dose ajoutée sur l'échantillon est ensuite soustraite afin de déterminer la dose initiale.

### F.5.3 Limite de détection

La limite de détection (LD) est estimée à partir de la variation d'amplitude du signal de trois échantillons non irradiés. La limite de détection est donnée par l'Equation II.27 d'après Currie (Currie, 1999). Un coefficient  $k$  égal à 3 est généralement recommandé (Currie et al., 1999).

$$LD = k \times \sigma_{blanc} \times a \quad \text{Equation II.27}$$

avec  $\sigma_{blanc}$  : l'écart-type sur l'amplitude de trois échantillons non irradiés,  $a$  : le coefficient d'étalonnage signal-dose,  $k$  : le coefficient de niveau de confiance.

### F.5.4 Incertitudes associées aux mesures

Afin de déterminer l'incertitude finale sur l'évaluation de la dose absorbée, il est nécessaire d'estimer les incertitudes associées aux différentes étapes de l'évaluation de la dose. Ainsi on distingue les incertitudes liées au fading du signal, à la préparation de l'échantillon, à la mesure RPE, à l'analyse du signal, à l'étalonnage. L'incertitude finale étant la composée de ces différentes sources selon l'Equation II.28.

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{fading}^2 + \sigma_{préparation}^2 + \sigma_{mesure}^2 + \sigma_{analyse}^2 + \sigma_{étalonnage}^2 \quad \text{Équation II.28}$$

La méthode de préparation de l'échantillon peut modifier la concentration de spins dans l'échantillon. L'influence de ce facteur sur l'incertitude finale est généralement mal quantifiée. Pour l'émail dentaire par exemple, elle est estimée à 10% (IAEA, 2002).

L'incertitude sur la mesure proprement dite est la composée des incertitudes dues au positionnement de l'échantillon, à la stabilité du spectromètre, à la reproductibilité qui prend en compte l'anisotropie de l'échantillon, à l'amplitude du bruit de fond de la cavité avec ou sans tube, à la mesure de la masse de l'échantillon, au facteur de correction en masse lié au profil de rendement de la cavité.

L'incertitude liée à la stabilité du spectromètre peut en pratique être améliorée par l'utilisation d'un étalon interne, qui permet de s'affranchir des dérives de la sensibilité du spectromètre. L'amplitude du signal étudié est normalisée par l'intensité des raies d'un étalon interne fixé de manière permanente dans la cavité.

L'incertitude due à l'analyse du signal est difficilement quantifiable, d'autant plus qu'il est souvent délicat de soustraire le bruit de fond du signal (AIEA, 2002).

Les méthodes d'estimation des incertitudes sur les paramètres d'étalonnage sont classiquement basées sur des méthodes de régression pondérées par les incertitudes des points de mesure (Neuilly et CETAMA, 1998).

## **G. DESCRIPTION DES MOYENS D'IRRADIATION**

Dans le cadre de ce travail, les irradiations ont été réalisées sur les installations de référence de l'IRSN. Il s'agissait de sources émettrices de photons gamma de  $^{60}\text{Co}$  ( $E_{\text{moyen}}=1,25$  MeV) et de  $^{137}\text{Cs}$  ( $E_{\text{moyen}}=0,66$  MeV). Nous n'avons pas étudié la réponse du signal dosimétrique en fonction de la nature (photon, neutron, électron) ou de l'énergie du rayonnement incident. De manière générale, les matériaux utilisés en dosimétrie présentant des rendements radiolytiques très différents selon le type de particules ou de rayonnement utilisé et selon l'énergie de ce rayonnement. Les rendements radiolytiques peuvent être très différents selon que les rayonnements sont directement ou indirectement ionisants et également selon le type d'interaction considéré. De manière générale, pour les matériaux considérés en RPE, les rendements associés aux neutrons sont bien inférieurs à ceux des photons ou des électrons (Hervé et al., 2006 ; Trompier et al., 2008). Pour un même type de rayonnement, la variation en fonction de l'énergie est liée au fait que l'énergie délivrée dans un matériau donné est exprimée en termes de dose absorbée dans un matériau de référence (air, eau ou tissu). Or les matériaux étudiés, (par exemple émail dentaire, tissus osseux, sucres, etc.) ne sont pas équivalents aux matériaux de référence du point de vue de l'interaction des rayonnements et du dépôt d'énergie associé, et cette non-équivalence est dépendante de l'énergie du rayonnement incident.

## H. DESCRIPTION DES ONGLES ET ETAT DE L'ART EN DOSIMETRIE

### H.1 Description histologique des ongles

Les ongles, comme le système pileux, sont définis comme des annexes de l'épiderme. Ils sont des productions épithéliales très complexes qui se développent grâce à une collaboration entre le derme et l'épiderme aboutissant, par l'assemblage de fibres de kératine, à la formation d'une corne (ou cornéocyte) très résistante formant le plateau unguéal (Fig. II.18). Comme l'ensemble des cellules épithéliales de l'organisme (peau, intestin, muqueuse, etc.) les ongles contiennent des protéines à base de kératine. La croissance de l'ongle se fait par prolifération et différenciation de l'épithélium de la matrice de l'ongle, également appelé racine. Les ongles poussent de manière ininterrompue en moyenne de 1 mm par semaine pour les mains et de 0,25 mm pour les pieds. La kératine est produite par les keranitocytes localisés dans la matrice de l'ongle (Fig. II.19).

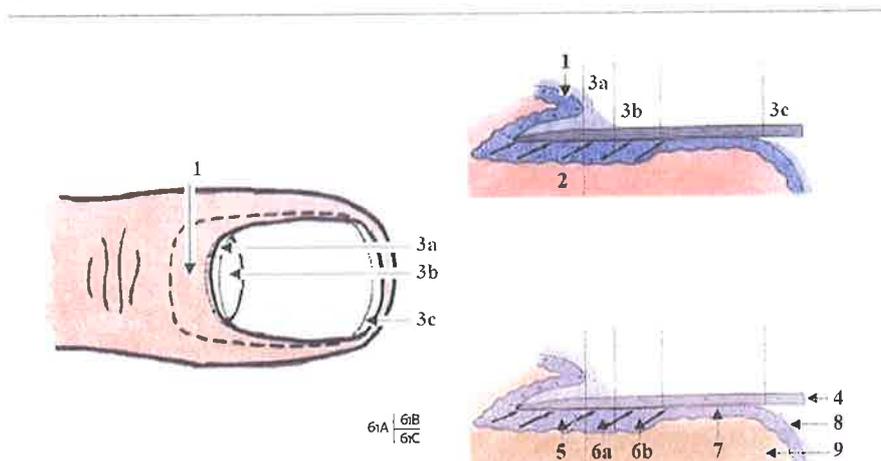


Figure II.19 : Représentation schématique des différentes parties anatomiques d'un ongle normal. 1) bourrelet unguéal, 2) racine, 3) limbe, 3a éponychium ou cuticule, 3b lunule, 3c bord libre, 4 plateau unguéal, 5) matrice unguéale, 6a) cuticule, 6b) lunule, 7) lit unguéal, 8) hyponychium, 9) derme.

Les ongles présentent une structure complexe, composée par l'empilement de trois couches histologiques (Fig. II.20) : la couche dorsale, la couche intermédiaire et la couche ventrale (Atchen, 1963). La couche dorsale (environ  $\frac{1}{4}$  de l'épaisseur) est produite par la partie proximale de la matrice (matrice dorsale) (Lewis, 1954 ; Dawber, 1980), la couche intermédiaire ( $\frac{2}{3}$  de l'épaisseur) par la partie distale de la matrice (matrice intermédiaire) et la partie ventrale, la plus fine, par le lit de l'ongle (Johnston & Shuster, 1993). Dans la partie intermédiaire de l'ongle, les fibres de kératine sont organisées parallèlement à la surface, avec une orientation parfaitement perpendiculaire à la direction de pousse de l'ongle comme le montrent les Figure II.20 et II.21 (Garson et al., 2000; Farran et al., 2009).

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

Dans les deux couches externes de l'ongle, les fibres sont également disposées parallèlement à la surface de l'ongle mais avec une orientation moins marquée dans ce plan (Fig. II.20 et II.21). Les fibres sont préférentiellement orientées parallèlement à l'axe de pousse dans la partie dorsale et perpendiculairement dans la partie ventrale. Cette organisation confère à l'ongle des propriétés mécaniques exceptionnelles (Garson et al., 2000 ; Farran et al., 2009). L'orientation des fibres dans la partie intermédiaire permet d'orienter préférentiellement les fissures latéralement plutôt que vers la matrice de l'ongle (Farren et al., 2004). Les couches externes qui enveloppent la partie intermédiaire jusque sur les bords, protègent la partie intermédiaire et empêchent l'apparition de fissures aux bords. Il est à noter que les cellules de kératine sont plus épaisses dans la partie intermédiaire de l'ongle ( $5,5 \mu\text{m}$ ) que dans la partie dorsale ( $2,2 \mu\text{m}$ ). Dans la partie ventrale, les cellules sont beaucoup moins liées et contiennent encore du matériel nucléaire (Garson et al., 2000).

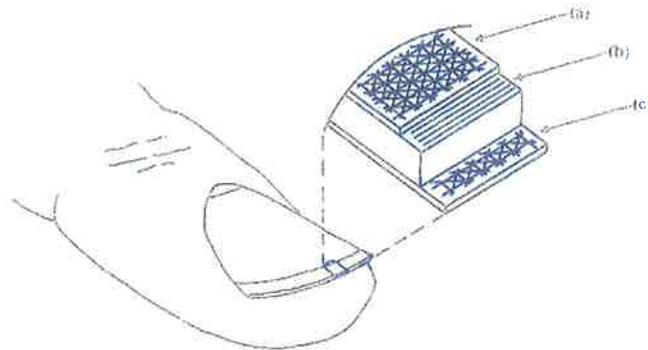


Figure II.20 : Représentation schématique des ongles humains montrant la structure multicouche. (a) couche dorsale, (b) couche intermédiaire, (c) couche ventrale.

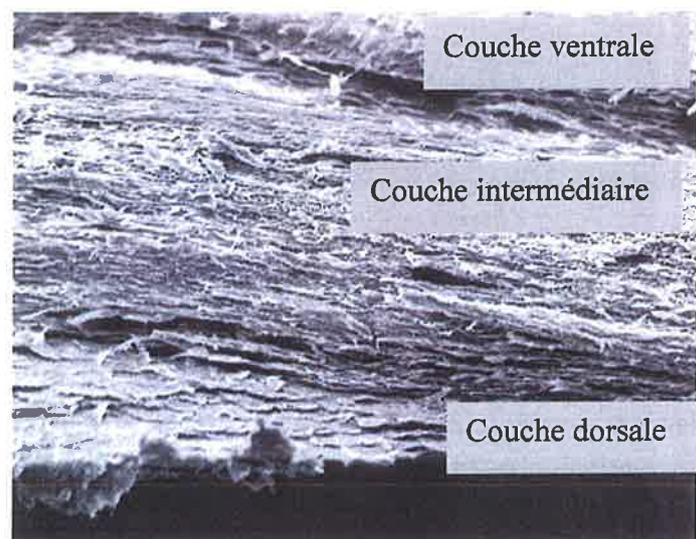


Figure II.21 : Image de microscopie électronique de la tranche d'un ongle fracturé (Farren et al., 2004).

## H.2 Biochimie des ongles

La kératine ne constitue pas une entité chimiquement et physiquement définie. En effet, il existe différents types de kératine qui se différencient les unes des autres par leur composition en acides aminés et par l'abondance des chaînes latérales à l'origine du comportement mécanique de l'ensemble. La kératine, tout comme le collagène et l'élastine, sont des scléroprotéines, c'est-à-dire des protéines insolubles dans l'eau froide même en présence de sels, d'acides ou de bases dilués. La kératine formée dans la matrice est composée d'**exo-kératine de type I et II**. Ces exo-kératines sont des **α-kératines** que l'on retrouve dans le règne animal principalement chez les mammifères, tant dans les systèmes pileux (cheveux, poils, laine, etc.) que dans les organes cornés (sabots, cornes, etc.). Les β-kératines sont, quant à elles, associés aux reptiles et aux oiseaux (plumes, carapaces, etc.) ; on les trouve également dans la soie.

Les exo-kératines de type I et II sont de longues **chaînes polypeptidiques** en hélice α, respectivement acides (type I) et basiques ou neutres (types II), constituées d'environ 310 acides aminés, on peut donc parler de protéines. La kératine contient 15 acides aminés différents (Greaves & Moll, 1976 ; Saas et al., 2004). Les acides aminés les plus présents dans les ongles sont l'acide glutamique, la serine, la cystéine, la leucine, l'acide aspartique, la glycine, l'arginine, la proline, la thréonine, l'alanine et la valine (Greaves & Moll, 1976 ; Saas et al., 2004). La structure de la chaîne peptidique, c'est-à-dire la séquence des amino-acides réunis par des liaisons peptidiques covalentes (Fig. II.22), représente la structure primaire de la kératine (Atsbury, 1933).

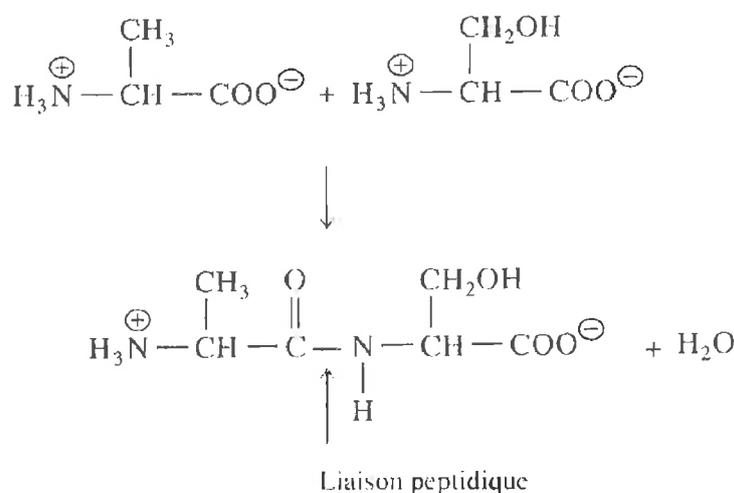


Figure II.22 : formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés (alanine et serine.)

Du fait de la présence répétée du groupe amide -CO-NH- dans la chaîne peptidique qui s'élabore dans le kératinocyte, on peut considérer la kératine comme un polymère, et plus exactement comme un polyamide naturel. La forme en hélice est induite par des liaisons

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

hydrogènes entre les groupements C=O et N-H qui sont porteurs de charges électriques opposées (Fig. II.23). Le groupe carbonyle C=O du résidu  $i$  est en liaison hydrogène avec le groupe N-H du résidu  $i+4$  (Fig. II.24). De la répétition du motif amide, il résulte la formation d'un macro-dipôle avec une demi-charge à chaque extrémité.

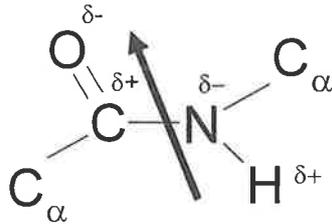


Figure II.23 : Polarisation du groupe motif amide.

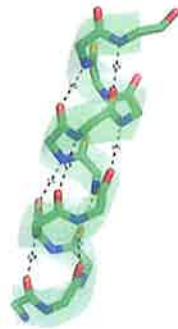


Figure II.24 : Représentation des liaisons hydrogènes de la chaîne principale de l'hélice.

Une chaîne polypeptidique de kératine se termine avec un groupement libre amine à une extrémité (N-terminale) et un groupement carboxylate (C-terminale ou carboxy -terminale) à l'autre extrémité. Les exo-kératines de type I (acide) et II (basique) s'enroulent l'une autour de l'autre pour former des **hétérodimères acido-basiques**. L'assemblage des dimères (type I acide + type II basique) forment des **protofilaments** qui, agglomérés, forment des **microfibrilles** ou filaments intermédiaires (Fig. II.25). Les terminaisons des chaînes de kératine n'étant pas complètement pourvues en hydrogène, elles sont chargées respectivement positivement et négativement, ce qui permet de lier les dimères entre eux en associant les terminaisons N avec les terminaisons C et de former les protofilaments (Fig. II.25). Ces microfibrilles sont agrégés en paquets denses de 70-100 Å de diamètre insérés dans une substance amorphe, sorte de ciment interfibrillaire, composée de mucopolysaccharides neutres (Achten, 1963 ; Caputo et al., 1982).

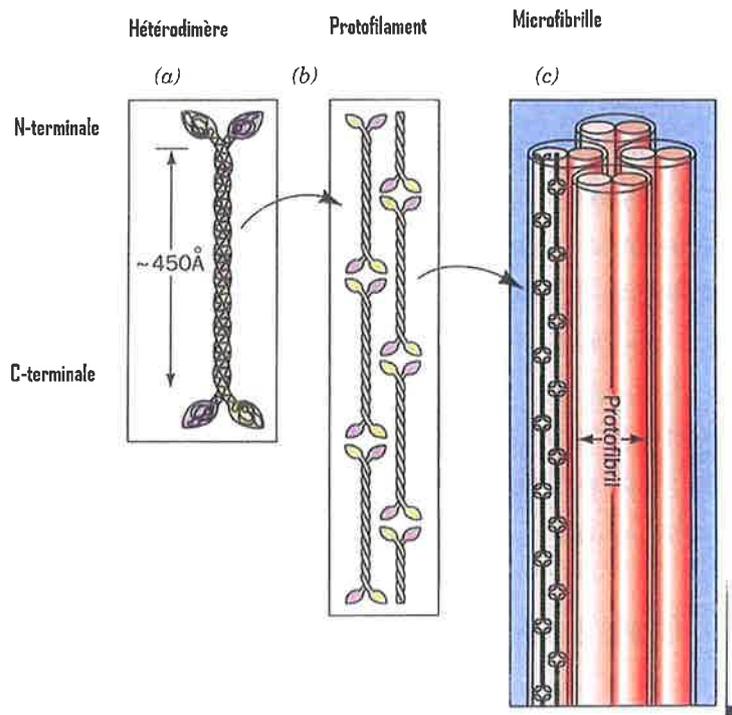


Figure II.25 : Représentation schématique des hétérodimères, protofilaments et microfibrilles constituant l'architecture de l'ongle. (D. Boet et J.G. Boet, 2005)

En plus des liaisons entre les terminaisons, les chaînes polypeptidiques sont unies entre elles par des liaisons secondaires (ponts) qui assurent la rigidité et la solidité de l'ensemble.

On distingue :

- **les ponts disulfures** qui s'établissent entre deux fonctions thiol de cystéines (acide aminé contenant du soufre), ces liaisons formées par covalence sont les plus solides et donc les plus stables,
- **les liaisons hydrogènes** qui résultent d'une mise en commun d'un atome d'hydrogène entre deux atomes électronégatifs,
- **les liaisons dites « salines »** électrovalentes ou acide-base qui s'établissent entre deux groupes ionisés porteurs de charges opposées,
- **les forces de van der Waals** constituées par les forces attractives résiduelles liées à la polarisation des atomes extrêmement proches l'un de l'autre.

L'analyse des tests de Chèvremont et Frédéric (1943) et de Mac Manus (1948) appliqués aux différentes couches de l'ongle a permis de mettre en évidence des variations significatives des différents types de liaisons précédemment citées et de la présence des mucopolysaccharides neutres (Achten, 1963).

La **partie dorsale** de l'ongle présente une proportion moyenne de liaisons latérales (pont disulfure et liaison acide base libre) et de groupements latéraux libres, notamment de groupe

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

sulfhydrile et hydroxyle (SH et OH). On note également la présence du complexe kératine-polysaccharide par le test de MacManus.

La **partie intermédiaire** est plus riche en ponts disulfures (Achten, 1963 ; Garson et al., 2000) et présente peu de groupement latéraux libres. Cette partie présente, d'après Jarrett and Spearman, la plus forte concentration de cystéine (Jarrett and Spearman, 1966). Dans cette partie, le test de MacManus est négatif, indiquant l'absence de polysaccharides.

La **partie ventrale** présente de nombreux groupements latéraux libres et de liaisons acide base libre, les chaînes latérales y sont par contre les moins nombreuses parmi les trois couches. La kératine de la partie ventrale est comparable en cela à la kératine molle de l'épiderme. Le test de MacManus est positif, plus intense que pour la partie dorsale indiquant une teneur importante en polysaccharides. La Figure II.26 donne une représentation schématique de la densité de liaisons SS, tel que décrit dans l'article d'Achten (Achten, 1963).

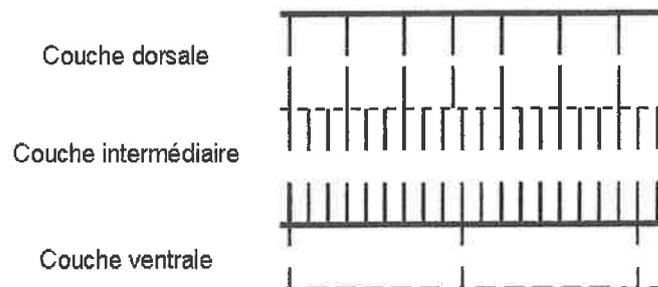
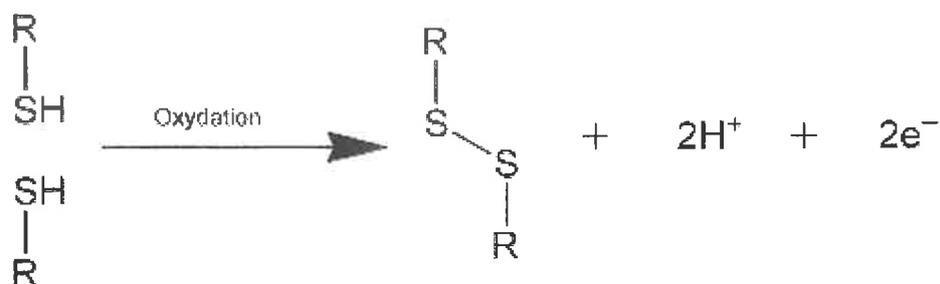


Figure II.26 : Représentation schématique des liaisons SS dans les trois couches (d'après Achten, 1963).

C'est aux liaisons par ponts disulfures qu'est attribuée principalement la solidité et la structure de la kératine des ongles. Ces ponts disulfures peuvent se former sur une même chaîne polypeptidique (structure tertiaire), mais également entre deux chaînes séparées (structure quaternaire). Un pont disulfure est une liaison covalente entre 2 atomes de soufre de la chaîne latérale de 2 résidus cystéines (Cys) réduits. La chaîne latérale de la cystéine porte une fonction thiol (-SH) extrêmement réactive. L'oxydation de ces fonctions thiols mène à la formation d'une liaison covalente entre les deux cystéines (Equ. II.29).

La formation d'un pont disulfure à partir de deux cystéines s'accomplit spontanément en conditions oxydantes, en particulier en présence de dioxygène. L'oxydation des fonctions thiols donne alors lieu à la formation de molécule d'eau. La molécule résultante de la liaison de deux cystéines est la cystine. Les ongles contiennent également un autre acide aminé sulfuré, la méthionine, qui porte un groupement méthyle supplémentaire. La méthionine est plus hydrophobe et d'un encombrement stérique plus important que la cystéine, et également beaucoup moins réactive. Seule, la cystéine est responsable des liaisons disulfures dans la kératine.



Équation II.29

Les liaisons latérales sont beaucoup plus nombreuses dans la kératine dite dure qui compose la couche intermédiaire que dans la kératine plus molle de la couche ventrale. Dans des tissus kératinisés plus élastiques, tels que le collagène ou l'élastine, ces liaisons sont bien moins nombreuses. La présence de groupements latéraux libres (principalement de type SH) évolue de manière inverse au nombre de liaisons disulfures. La dureté des couches de kératine augmente avec l'âge du donneur : les ongles des nourrissons sont très souples avec un nombre de liaisons par pont disulfure relativement plus faible que dans un ongle d'adulte, l'ongle de l'enfant présentant un nombre de liaisons intermédiaires entre le nourrisson et l'adulte.

### H.3 Composition des ongles

Les ongles contiennent également une très grande variété d'éléments et de molécules, dont la teneur est liée au régime alimentaire et à la contamination du corps humain par diverses molécules et polluants. La teneur globale en soufre de l'ongle est d'environ 10% en masse, teneur similaire à celle des cheveux. L'ongle est couvert d'un film lipidique, une sécrétion séborrhéique, de faible teneur en eau (10%). L'eau est capable d'hydrater de manière importante les ongles et de les ramollir. L'utilisation fréquente d'agents détergents qui éliminent les lipides protecteurs de la surface de l'ongle, le fragilise tout en augmentant sa capacité d'hydratation. L'écart en masse entre un ongle déshydraté et un ongle normalement hydraté est de l'ordre de 5 à 7% (Trompier et al., 2009).

Les ongles sont un formidable indicateur de l'état de santé de l'organisme. A titre d'exemple, la teneur en calcium et en magnésium des ongles a été récemment reliée à l'âge et la densité des os, notamment pour les problèmes d'ostéoporose (Oghitani et al., 2005). La structure des ongles peut également être affectée par des expositions à des facteurs environnementaux comme les rayonnements ionisants par exemple. Une étude menée sur différentes populations de mineurs de fond a ainsi montré que la baisse de la teneur en acide cystéique de l'ongle, mesurée par RPE ou par HPLC, pouvait être corrélée à une exposition chronique au radon pour les mineurs d'uranium (Grozdanovic & Ulbert, 1969 ; Grozdanovic & Ulbert, 1970).

Les ongles sont également des indicateurs de contamination à des polluants ou produits toxiques. Parce qu'ils accumulent un nombre important de substances (arsenic, phtalates, plomb, mercure, cadmium, etc.), ils peuvent être également utilisés en toxicologie, tout comme les cheveux (Jackson, 2008 ; Mehra & Juneja, 2005). Les principaux éléments

## *Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles*

présents à l'état de traces sont le calcium (2300 ppm<sup>4</sup>), le chlore (1800 ppm), le phosphore (1035 ppm), le silicium (975 ppm), l'aluminium (837 ppm), le potassium (830 ppm), le magnésium (570 ppm), le zinc (150 ppm) et le fer (128 ppm). Les concentrations d'autres éléments tels que le chrome, le manganèse, le nickel, le cuivre, le sélénium sont de l'ordre de quelques ppm (Olabanji et al., 2005).

### *H.4 Etat de l'art de la RPE des ongles*

Sans aucune irradiation préalable, des ongles coupés présentent un spectre RPE caractéristique présenté sur la Figure II.27. Il faut néanmoins souligner que d'après Chandra & Symons (1987) un tel spectre n'est observable qu'après une coupe multiple d'un ongle. Pour les auteurs, la coupe réalisée lors du prélèvement ne serait pas suffisante pour générer un signal détectable. L'intensité du signal mesuré augmentant avec le nombre de coupes, il en a été déduit que le signal mesuré était induit par le stress mécanique. Ce signal est désormais nommé dans la littérature « Mechanical Induced Signal » ou MIS (Chandra & Symons, 1987). Dans leur publication, Chandra & Symons (1987) avaient identifié deux composantes (notées C1 et C2 sur la Figure II.27) attribuées à des radicaux centrés sur le soufre. La composante C1 a une forte anisotropie de facteur  $g$  avec  $g_3=2,061$  ;  $g_2=2,025$  ;  $g_1= 2,000$  et un possible couplage hyperfin  $A_H = 0,85$  mT observable sur la composante  $g_2$ .

Dans leur dernière publication sur ce sujet, Symons et al. (1995) attribuait finalement la composante C1 à un radical de type  $RS \dot{\div} SR'R$ . La valeur de la constante de couplage est compatible avec un couplage avec un proton d'un des groupements R. La deuxième composante (C2) était attribuée par Chandra & Symons (1987) à un anion du type  $(RS \dot{\div} SR)^-$  ( $g_{\max}=2,018$ ).

---

<sup>4</sup> Partie par million

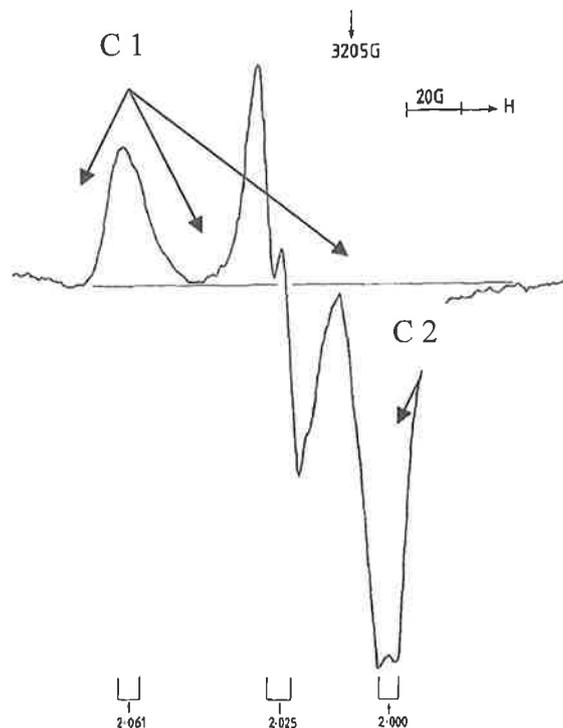


Figure II.27 : Spectre RPE d'un échantillon stressé mécaniquement mesuré en bande X à 77 K (d'après Symons, 1988).

Pour Chandra & Symons (1987), le MIS mesuré dans les ongles était le premier exemple de radicaux formés à température ambiante à la suite d'un phénomène mécanique de coupe. Jusqu'alors, seul le phénomène de broyage avait été identifié comme pouvant mener à l'observation de radicaux formés par stress mécanique. D'après ces deux auteurs, les ponts disulfures étant plus faibles énergétiquement que d'autres liaisons dans la structure de kératine, notamment que les liaisons carbone soufre (C-S), c'est leur rupture qui peut être à l'origine de la formation des radicaux soufrés détectés par spectroscopie RPE. D'après Symons et al. (1995), le MIS 1 est stable jusqu'à 45 °C et commence à décroître pour des températures supérieures. Il est par ailleurs reporté qu'après un nettoyage des ongles dans l'eau, on détecte la présence d'un unique signal RPE symétrique ( $g_{iso} = 2,005$ ) et stable à température ambiante et jusqu'à 45 °C. Symons et al. (1995) ont postulé qu'il s'agissait d'un signal intrinsèque à l'ongle et ont nommé ce signal « bruit de fond » (Background ou « BG »). Aucune espèce radicalaire n'a été associée au « BG », mais il a été envisagé par ces auteurs que cette espèce pouvait être produite lors de la constitution des chaînes de protéines (Symons et al., 1995). De manière surprenante, Symons et al. (1995) n'ont pas commenté l'absence de MIS dans les échantillons d'ongles humidifiés et donc l'effet de l'eau sur la stabilité du MIS.

Les signaux RPE induits par l'exposition aux rayonnements ionisants, dénommés RIS (Radio-Induced Signals), peuvent présenter des caractéristiques spectrales très différentes selon la dose de rayonnement délivrée. Le spectre RPE d'échantillon irradié à très forte dose publié par Gordy & Shield (1958) (Fig. II.28) présente également une structure principale de spectre

de poudre avec une forte anisotropie de facteur  $g$  et des caractéristiques très similaires à celle du MIS1 publié par Chandra & Symons (1987). Il semble que cette similitude n'ait jamais été mise en évidence ni commentée. Il faut également noter que d'autres composés soufrés irradiés présentaient également des signatures spectrales très similaires à celles du MIS1 (Henrikssen et al., 1963 ; Patten & Gordy, 1964).

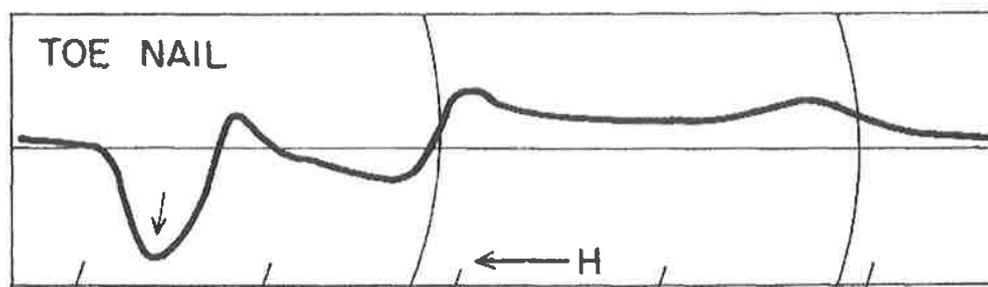


Figure II.28 : Spectre RPE en bande X d'un échantillon d'ongle de pied irradié à forte dose (Gordy & Shields, 1958). La flèche indique  $g=2,000$  les marques en abscisses correspondent à des  $\Delta B$  de 6,8 mT.

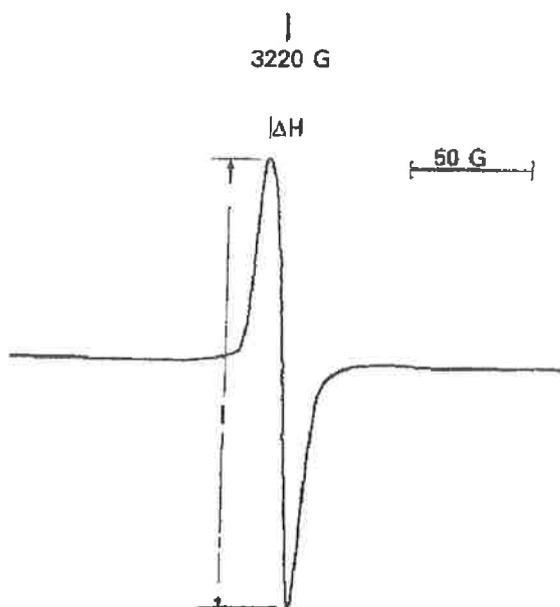


Figure II.29 : Spectre RPE d'un échantillon d'ongle irradié aux rayonnements gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) à température ambiante pour une dose inférieure à 100 Gy (Symons et al., 1995). Le « BG » présente des caractéristiques spectrales identiques.

Pour les doses les plus faibles (1-100 Gy), le spectre RPE d'ongles irradiés publié par Symons et al. (1995) Fig. II.29) présente des caractéristiques similaires à celles du « BG », ce qui constitue de fait un problème pour une évaluation des faibles doses, l'amplitude du « BG » étant de l'ordre de grandeur de celle du RIS pour des doses de quelques Gy. Pour les faibles doses il est donc nécessaire de soustraire cette contribution pour évaluer correctement l'amplitude du RIS. Symons et al. (1995) ont également reporté que l'amplitude du RIS

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

augmente linéairement entre 1 et 100 Gy et la limite de détection a été estimée à environ 2 Gy. A température ambiante, la décroissance complète du RIS est observée par Symons et al. (1995) au bout d'un délai de 100 jours. D'après les mêmes auteurs, l'intensité du signal mesuré après 100 jours correspond à celle du « BG » mesuré avant irradiation. Ainsi il semble possible d'estimer l'amplitude du « BG » après décroissance complète du RIS.

Les espèces radicalaires liées au RIS n'ont pas été clairement identifiées. Symons et al. (1995) ont suggéré que ce ne seraient pas les produits primaires de l'ionisation (perte d'un ou plusieurs protons sur les groupes amides) qui sont détectés, mais le ou les produits issus de la réaction de ces espèces.

D'après les données de la littérature dont nous disposons au début de ce travail, les signaux RPE radio-induits présentent des caractéristiques intéressantes du point de vue de la dosimétrie :

- Le RIS semble être suffisamment intense par rapport au « BG » pour permettre de détecter des doses de l'ordre de 2 Gy,
- La stabilité du RIS semble être suffisante pour que celui-ci puisse être mesuré dans les délais compatibles avec les scénarios d'accident,
- La relation entre l'amplitude du RIS et la dose varie linéairement sans effet de saturation jusqu'à au moins 100 Gy,
- Le « BG » est un signal stable et son amplitude peut être estimée après décroissance complète du RIS,
- Le MIS n'est pas détectable après une simple coupe de l'ongle, le MIS n'est donc a priori pas un problème pour l'analyse du RIS.

Nous verrons par la suite que les données reportées par Symons et son équipe ont très probablement été obtenues dans des conditions d'expérimentation particulières qui ne correspondant pas aux conditions réelles ou *in vivo* (Chandra & Symons, 1987 ; Symons, 1988 ; Symons et al., 1995). Dans des conditions expérimentales mimant les conditions *in vivo*, la plupart de ces résultats ne peuvent être reproduits et les principales interprétations et conclusions ne sont plus valides. Ainsi, la plupart des équipes travaillant actuellement sur ce sujet se sont focalisées sur l'étude du MIS, car cette composante a été, contrairement à ce qui est énoncé par Symons, identifiée comme l'un des principales obstacles au développement d'un protocole d'estimation des doses, du fait de sa présence après prélèvement (Black & Swarts, 2010 ; Dondi et al., 2010 ; Wilcox et al., 2010 ; He et al., 2011). Ce problème a par exemple motivé la mise en place d'un projet visant à développer des systèmes de mesure RPE *in vivo* de l'ongle, ce qui pourrait permettre de ne mesurer que le RIS et les éventuelles signaux intrinsèques (He et al., 2011)

### ***H.5 Conclusion sur l'utilisation des ongles en dosimétrie***

Dans un cas concret d'accident, lorsqu'un ongle d'une victime d'irradiation peut être prélevé et mesuré par spectroscopie RPE, trois composantes peuvent être présentes et se superposer dans le spectre RPE : une composante radio-induite (RIS), une composante liée au stress mécanique lors du prélèvement (MIS) et une éventuelle composante formée des signaux intrinsèques, c'est-à-dire présents dans les ongles avant tout stress extérieur (mécanique, radiatif)<sup>5</sup>.

Comme nous avons commencé à le mentionner, les deux dernières catégories de signaux sont susceptibles de poser des problèmes lors de l'analyse des signaux radio-induits. De plus, il convient de mentionner que les traitements cosmétiques appliqués aux ongles, notamment les vernis colorés, sont susceptibles d'induire des signaux RPE parasites qui peuvent se superposer avec les signaux d'intérêt. Préalablement à l'étude des signaux radio-induits, il convenait donc de réaliser une étude détaillée du MIS, des signaux intrinsèques et parasites. Il s'agissait de les identifier, de déterminer si ces signaux peuvent interférer avec le RIS et le cas échéant de fournir des données suffisamment complètes pour leur prise en compte dans l'analyse du RIS ou pour définir des traitements (thermiques, chimiques, etc.) permettant de les éliminer sélectivement. Dans cette optique, une attention particulière a été portée sur l'influence des paramètres expérimentaux (température et humidité en particulier).

---

<sup>5</sup>La notion de signal intrinsèque est plus appropriée pour nommer les signaux RPE qui ne sont ni induits par irradiation ou par le stress mécanique. Cette notion est équivalente à celle de « bruit de fond » ou « Background » utilisée par Symons.

## I. REFERENCES

- Achten G. (1963) L'ongle normal et pathologique. *Dermatologica*, 126, 229-245.
- Bartolotta A., Fattibene P., Onori S., Pantaloni M., and Petetti E., (1993) Sources of uncertainty in therapy level alanine dosimetry. *Appl. Radiat. Isot.*, 44, 13-17.
- Black P. J. & Swarts S. G. (2010) Ex vivo analysis of irradiated fingernails: Chemical yields and properties of radiation-induced and mechanically-induced radicals. *Health Phys.*, 98(2), 301-308.
- Bloch F. (1946) Nuclear induction, *Phys. Rev.*, 70, 460-474.
- Bradshaw W. and Cadena D.G. (1962) The use of alanine as a solid dosimeter, *Radiat. Res.*, 17, 11-21.
- Brady J.M., Aarestad N.O. and Swartz H.M. (1968) In vivo dosimetry by electron spin resonance spectroscopy. *Health Phys.*, 15, 43-47.
- Breit G. and Rabi I.I. (1931) Measurement of nuclear spin. *Phys. Rev.*, 38, 2032.
- Caputo R., Gasparirmi G. & Contini D.A. (1982) A freeze-fracture study of the human nail plate. *Arch. Dermatol. Res.*, 269, 197-209.
- Carr H.Y. and Purcell E.M. (1954) Effects of diffusion on free precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.*, 94(3), 630-638.
- Chandra H. Symons C.R. (1987) Sulphur radicals formed by cutting  $\alpha$ -keratin. *Nature*, 328, 833-834.
- Chumak V.V., Pavelenko J. and Sholom S.V. (1996) An approach to the assessment of overall uncertainty of determination of dose using an ESR technique. *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 1287-1292.
- Combrisson J. & Uebersfeld J. (1954) *Compt. Rend. Acad. Sci.*, (Paris) 238, 1397.
- Currie L.A. (1999) Nomenclature in evaluation of analytical method including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995). *Anal. Acta Chem.*, 391, 105-126.
- Dalgarno B.G. & McClymont J.D. (1989) Evaluation of ESR as a radiation accident dosimetry technique. *Appl. Radiat. Isot.*, 40(10-12), 1013-1020.
- Dawber R.P.R. (1980) The ultrastructure and growth of human nail. *Arch. Dermatol. Res.*, 269, 197-204.
- Dondi D., Buttafava A., Faucitano A., Fattibene P. (2010) Basic radicals reaction in mechanolysis and photolysis of nails, Présentation orale au congrès EPRBiodose, Mandelieu-la-Napoule, Octobre 2010
- Farran L., Ennos A.R. & Eichhorn S.J. (2009) Microindentation and nanoindentation of human fingernails at varying relative humidity. *J. Mater. Res.*, 24(3), 980-984.
- Farren L., Shayler S. & Ennos A.R. (2004) The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *J. Exp. Biol.*, 207, 735-741.
- Finlay A.Y., Frost P., Keith A.D. & Snipes W. (1980) An assessment of factors influencing flexibility of human fingernails. *Br. J. Dermatol.*, 103, 357-365.
- Frenkel J. (1945). On the theory of relaxation losses connected with magnetic resonance in solid bodies. *J. Phys. USSR*, 9 299-304.
- Garson J.C., Baltenneck F., Leroy F., Riekel C. & Müller M. (2000) Histological structure of human nails as studied by synchrotron X-ray microdiffraction. *Cell. Mol. Biol.*, 46(6), 1025-1034.
- Gerlach W. and Stern O. (1922) Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld. *Zeitschrift für Physik*, 9 349.

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

- Greaves M.S., Moll J.M.H., 1976. Amino Acid composition of human nail, as measured by gas-liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 22, 1608-1613.
- Griscom D. L., Merzbacher C. I., Bibler N. E., Imagawa H., Uchiyama S., Namiki A., Marasinghe G. K., Mesko M., and Karabulut M. (1998) On the structure and radiation chemistry of iron phosphate glasses: New insights from electron spin resonance, Mössbauer, and evolved-gas mass spectroscopy. *Nucl. Instr. Meth. B*, 141(1-4), 600-615.
- Gordy W. & Shields H. (1958) Electron Spin Resonance studies of radiation damage to proteins. *Radiat. Res.*, 9, 611-625.
- Grozdanovic J. & Ulbert K. (1969) Attempt to use the methods of electronic paramagnetic resonance (EPR) for the determination of the effect of chronic irradiation on the level of cystine in nail keratin. *Cesk Fysiol.*, 18(1), 103.
- Grozdanovic J. & Ulbert K. (1970) Oscillopolarographic determination of cysteic acid level in the fingernails followed chronic irradiation in humans. *Strahlentherapie*, 139(6), 735-737.
- Hadley J.H. & Gordy W. (1975) Nuclear coupling of  $^{33}\text{S}$  and the nature of free radicals in irradiated crystals of cysteine hydrochloride and *N*-acetyl methionine. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 72(9), 3486-3490.
- Hadley J. H. & Gordy W. (1977) Nuclear coupling of  $^{33}\text{S}$  and the nature of free radicals in irradiated crystals of *N*-acetyl-L-cysteine. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 74(1), 216-220.
- Hahn E.L. (1950) Spin Echoes, *Phys. Rev.*, 80(4), 580-594.
- Hayes R.B., Haskell E. and Kenner G. (1997) A mathematical approach to optimal selection of dose values in the additive dose method of ESR dosimetry. *Radiat. Meas.*, 27, 315-323.
- He, X., Gui, J., Matthews, T. P., Williams, B. B., Swarts, S. G., Grinberg, O., Sidabras, J. W., Wilcox, D. E., and Swartz, H. M., (2011) Advances towards using finger/toenail dosimetry to triage a large population after potential exposure to ionizing radiation. *Radiat. Meas.*, 46(9), 882-887.
- Henrikssen T., Sanner T., Pihl A. (1963) Transfer of radiation-induced unpaired spins from proteins to sulfur compounds. *Radiat. Res.*, 18, 168-176.
- Herve M. L., Trompier F., Tikunov D. D., Amouroux V., and Clairand I. (2006) Study of materials for mixed field dosimetry by EPR spectroscopy. *Radiat. Prot. Dosim.*, 120(1-4), 205-209.
- International Atomic Energy Agency (2002) Use of electron paramagnetic resonance dosimetry with tooth enamel for retrospective dose assessment, IAEA-TECDOC-1331.
- Ikeya M. (1993) New applications of electron spin resonance. Dating, dosimetry and microscopy. World Scientific Publishing, ISBN 981-02-1199-6.
- Ivannikov A.I., Trompier F., Gaillard-Lecanu E., Skvortsov V.G. and Stepanenko V.F. Optimisation of recording conditions for the electron paramagnetic resonance signal used in dental enamel dosimetry. *Radiat. Prot. Dosim.*, 101, 531-538
- Jackson E.M. (2008) Sunlunual penetration of dibutyl phtalate in human fingernails. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 21, 10-14.
- Jarrett A. & Spearman R. (1966) The biochemistry of the human nail. *Arch. Dermatol. Res.*, 94 652-657.

## Chapitre II Matériels et méthodes et état de l'art sur les ongles

- Johnston M. & Shuster S. (1993) Continuous formation of nails along the bed. *Br. J. Dermatol.*, 128, 277-280.
- Khan R.F.H., Boreham D.R. and Rink W.J. (2003) Quantification of low dose signal in EPR tooth dosimetry-a novel approach. *Rad. Prot. Dosim.*, 103, 359-362.
- Lewis B.L. (1954) Microscopic studies of fetal and mature nail and surrounding soft tissue. *Arch. Dermatol. Res.*, 70, 732-744.
- Macmanus J. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, 23, 99-108.
- Mehra R. & Juneja M. (2005) Fingernails as biological indices of metal exposure. *J. Biosci.*, 30, 253-257.
- Nagy V. (2000) Accuracy considerations in EPR dosimetry. *Appl. Radiat. Isot.*, 52, 1039-1050.
- Neuilly M. et CETAMA. (1998) Modélisation et estimation des erreurs de mesure, Lavoisier Technique et documentation, Paris 406-425.
- Ohgitani S., Fujita T., Fujii Y., Hayashi C. & Nishio H. (2005) Nail calcium and magnesium content in relation to age and bone mineral density. *J. Bone Miner. Metab.*, 23, 318-322.
- Olabanji S. , Ajose O., Makinde, N., Buoso M., Ceccato D., De Poli, M. & Moschini, G. (2005) Characterization of human fingernail elements using pixe technique. *Nucl. Instr. Meth. B*, 240, 895-907.
- Patten R.A. & Gordy W. (1964). Further studies of radiation effects on the proteins and their constituents. *Radiat. Res.*, 22, 29-44.
- Poole, C.P. (1983) Electron Spin Resonance. J.Wiley, New York.
- Rabi I.I., Zacharias J.R., Millman S. and Kush P. (1938) A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys. Rev.*, 53, 318.
- Sass J.O., Skadal D., Zelger B., Romani N., Utermann B. (2004) Trichothiodystrophy: quantification of cysteine in human hair and nails by application of sodium azide-dependent oxidation to cysteic acid. *Arch. Dermatol. Res.*, 296, 188-191.
- Stopka P., Krizova J., Navratilova E., 2002. Volné radikaly v lidskych vlasech. *Klin. Biochem. Metab.*, 10, 262-267.
- Symons M. (1988) Formation of radicals by mechanical process. *Free Rad. Res. Comms.*, 5(3), 131-139.
- Symons M., Chandra H. & Wyatt J. (1995) Electron paramagnetic resonance spectra of irradiated finger-nails: A possible measure of accidental exposure. *Radiat. Prot. Dosim.*, 58, 11-15.
- Trompier F., Battaglini P., Tikunov D., and Clairand I. (2008) Dosimetric response of human bone tissue to photons and fission neutrons. *Radiat. Meas.*, 43(2-6), 837-840.
- Uebersfeld J. (1956). Thèse de doctorat en sciences physique, université de Paris.
- Weil J.A., Bolton J.R., Wertz J.E. (1994) Electron Paramagnetic Resonance: Elementary theory and Practical applications, Wiley-Interscience Publication, New York.
- Wilcox D. E., He X., Gui J., Ruuge A. E., Li H., Williams B. B. & Swartz H. M. Dosimetry based on EPR spectral analysis of fingernail clippings. *Health Phys.*, 98(2), 309-317.
- Zavoisky E. (1945) Spin magnetic resonance in paramagnetics. *J. Phys. USSR*, 9 245-252.



## *Chapitre III*

### *Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle*

A. Introduction .....	109
B. RPE de $Mn^{2+}$ et $Fe^{3+}$ dans les ongles .....	109
C. Signaux RPE parasites .....	137
D. Conclusion générale .....	143
E. Références .....	143



## INTRODUCTION

D'après une précédente étude (Chandra & Symons, 1987), il a été clairement établi que le prélèvement d'un ongle par le biais d'une coupe génère un signal RPE lié à la rupture de liaisons chimiques. Aussi, lorsque des ongles non irradiés sont mesurés par RPE après avoir été prélevés, les signaux mesurés peuvent avoir deux origines : ils peuvent être soit **induits par le stress mécanique** lors du prélèvement soit être **intrinsèques à l'ongle**, c'est-à-dire liés à la composition de l'ongle (chapitre II) ou formés lors de la pousse de l'ongle. Dans ce chapitre nous incluons également l'étude des signaux liés à l'application de vernis cosmétique sur les ongles. Si ces signaux parasites ne sont pas à proprement dit des signaux intrinsèques à l'ongle, ils ne sont pas non plus induits par une action extérieure, prélèvement ou irradiation par exemple.

Très peu d'études ont été menées sur les signaux RPE intrinsèques des ongles. Seul Symons avait suggéré que la composante qu'il avait nommée « BG » pour « Background »<sup>1</sup> (chapitre II) entrait dans catégorie des signaux intrinsèques, bien que son origine n'ait pas été établie (Symons et al., 1995). Nous montrons dans les chapitres IV et V traitant respectivement des signaux induits par stress mécanique (MIS) et par irradiation (RIS) qu'une partie du « BG » tel que défini par Symons et al. (1995) est en fait induit par le stress mécanique. Si la composante principale du « BG » n'est pas un signal intrinsèque de l'ongle, notre étude a cependant mis en évidence d'autres signaux RPE qui entrent dans cette catégorie. En effet, préalablement à l'étude détaillée des signaux autour de  $g=2$ , des mesures RPE sur des balayages de champ plus larges ont été réalisées afin de s'assurer qu'il n'y avait pas d'autres composantes éventuellement associables au MIS ou au RIS. Ainsi, des signaux RPE caractéristiques du  $Mn^{2+}$  et du  $Fe^{3+}$  ont été mis en évidence dans les ongles. Ces deux ions métalliques présentent une configuration électronique identique ( $d^5$ ). Avant de décrire les signaux RPE associés, quelques rappels seront donnés sur les ions  $d^5$ .

## B. RPE DE $Mn^{2+}$ ET $Fe^{3+}$ DANS LES ONGLES

### B.1 Rappel sur les ions métalliques $d^5$

Les ions  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ , dont la présence dans les ongles sera discutée dans les paragraphes suivants, présentent une structure électronique similaire. Ces deux ions métalliques appartiennent à la première série des éléments de transition. Ils ont la couche d incomplète, peuplée de 5 électrons ( $d^5$ ) et la couche 4s vide. Le spin S d'un ion de transition vaut  $n/2$ , avec n le nombre d'électrons non appariés dans l'état fondamental, dans notre cas  $n=5$  et  $S=5/2$ , soit une multiplicité de spin égale à  $2S+1=6$ . Pour ces deux ions, le moment orbital angulaire

<sup>1</sup> L'usage du terme de « bruit de fond » ou « Background » (« BG ») est inapproprié à la description des signaux RPE intrinsèques aux ongles, néanmoins l'abréviation « BG » est conservée dans le texte pour faciliter la compréhension du lecteur

### Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle

L vaut zéro et le moment angulaire total  $J=L+S$  vaut donc  $5/2$ . Ces deux ions ont le même terme d'état fondamental,  ${}^6S_{5/2}$ . On peut trouver les ions métalliques  $d^5$ , selon l'environnement, le type de ligands ou le type de coordination avec les ligands, dans des situations de spin fort ou faible. Pour l'ion libre, les cinq orbitales sont dites dégénérées, c'est-à-dire qu'elles ont la même énergie. Lorsqu'un élément de transition s'entoure de ligands, l'interaction électrostatique déstabilise l'ion métallique entraînant une levée de la dégénérescence des cinq orbitales  $d$  dont l'énergie dépend alors de leur orientation par rapport aux ligands. Les orbitales sont scindées énergétiquement en deux groupes ( $d_{z^2}$ ,  $d_{x^2-y^2}$ ) et ( $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ), la différence d'énergie entre ces deux groupes étant appelée champ cristallin. Le remplissage des orbitales est régi par le principe de minimisation de l'énergie du complexe formé. Deux phénomènes entrent alors en compétition. D'une part l'interaction électrostatique entre les électrons dont l'énergie est minimisée lorsque les électrons occupent des orbitales différentes (cf. règle de Hund) et d'autre part l'interaction électrostatique avec les ligands qui est minimum quand les électrons sont regroupés sur les niveaux d'énergie les plus bas. Selon la force de l'interaction avec les ligands, deux schémas sont possibles pour les ions  $d^5$  selon que l'un ou l'autre des principes de remplissage des orbitales domine.

Lorsque la règle de Hund domine, donc lorsque la différence d'énergie entre les deux groupes d'orbitales est faible, ce qui correspond au cas d'une interaction faible avec les ligands, les électrons se répartissent sur les cinq orbitales. Dans le cas d'une interaction forte, la différence d'énergie entre les deux groupes orbitales étant plus importantes, les orbitales de plus faible énergie sont peuplées prioritairement. Le premier cas est également appelé situation de spin fort ou haut spin (HS) et la deuxième situation de spin faible ou bas spin (BS). Ces deux situations sont schématisées sur la Figure III.1.

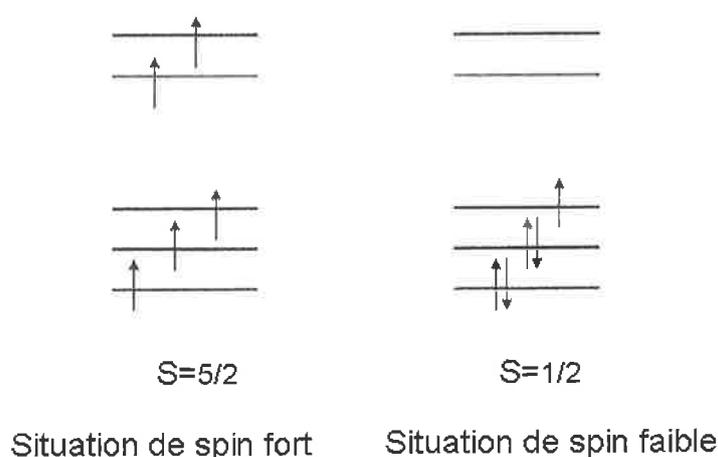


Figure III.1 : schéma des situations de haut spin et de bas spin pour des ions  $d^5$

### *Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle*

La situation de spin fort ne se produit qu'avec les cations de la première série de transition et dans tous les cas de complexes avec une coordination tétraédrique et parfois avec une coordination de type octaédrique. Dans la situation de spin fort, pour les ions  $d^5$  (couche à moitié remplie), l'interaction spin orbite n'a pas d'influence sur les valeurs de  $g$  ( $g_1, g_2, g_3$ ), et ces derniers sont tous égaux à  $g_e$  (Bertrand, 2010).

La situation de spin faible, si elle n'est pas propre à la première série de transition, est observée pour ces ions lorsque la coordination dans les complexes est de type plan carré ou octaédrique. En situation de spin faible, les ions peuvent être considérés comme possédant un spin effectif  $S=1/2$ .

Le  $Mn^{2+}$  à l'état d'ion libre aqueux et dans la grande majorité des complexes est dans un état de spin fort ( $S=5/2$ ). Dans cet état, les structures hyperfines caractéristiques du  $^{55}Mn$  sont bien souvent un indicateur de la présence de manganèse. Les ions ferriques peuvent se trouver selon le type de ligands dans des états de spin fort ou faible. Ainsi, par exemple, dans les protéines hémiques, le fer est présent dans les deux états de spin (spin faible dans les cytochromes).

Les paramètres  $D$  et  $E$  d'éclatement à champ nul varient selon le type de ligand ou selon l'environnement ionique, mais il faut noter que dans le cas de  $Fe^{3+}$ , les valeurs de ces paramètres peuvent être très élevées et peuvent atteindre  $10\text{ cm}^{-1}$ . Dans le cas du  $Mn^{2+}$ , les valeurs les plus élevées, de l'ordre de  $1\text{ cm}^{-1}$ , sont trouvées dans des réseaux cristallins lorsque  $Mn^{2+}$  se substitue à un autre ion d'affinité équivalente.

Le phénomène d'éclatement à champ nul a une forte influence sur le spectre RPE dans les situations de spin fort. Les potentiels ioniques de  $Fe^{3+}$  et  $Mn^{2+}$  sont très différents.  $Fe^{3+}$  ayant un potentiel plus élevé aura tendance à avoir son propre environnement, alors que  $Mn^{2+}$  aura plutôt tendance à se substituer à un autre ion ayant des affinités électroniques proches (c'est le cas de  $Pb^{2+}$  dans les verres et de  $Ca^{2+}$  dans les protéines).

Du fait des différences notables en termes d'état de spin et des valeurs des paramètres d'éclatement à champ nul, les spectres RPE de  $Fe^{3+}$  et  $Mn^{2+}$  sont donc généralement très différents. Dans le cas du  $Mn^{2+}$ , les valeurs de  $D$  sont relativement faibles ( $D \ll h\nu$ ) et, comme le montre la Figure III.2, l'éclatement à champ nul génère dans des conditions d'orientations spécifiques (chapitre II) des structures de type quintuplet. Si l'on prend également en compte le couplage hyperfin, des spectres constitués de six quintuplets peuvent être mesurés (Fig. III.3).

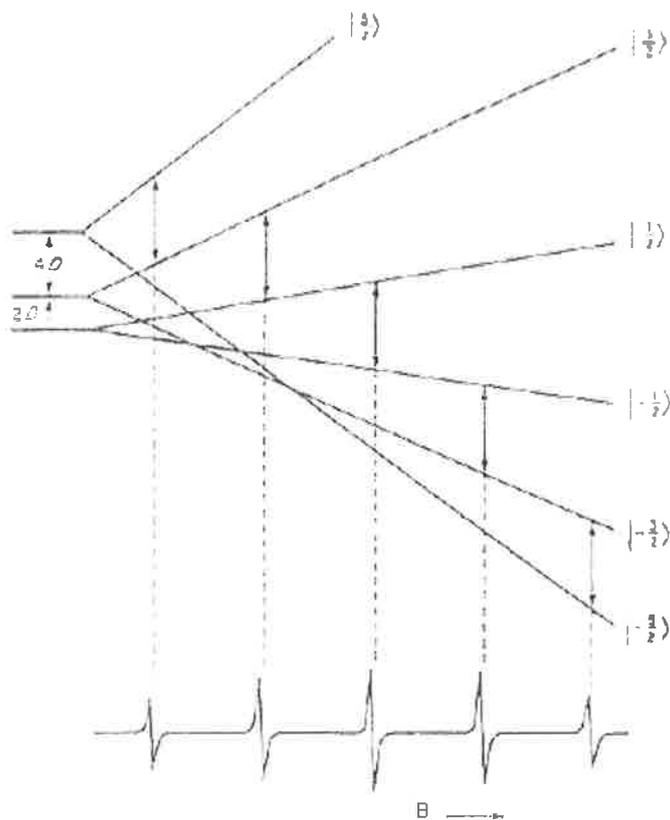


Figure III.2 : exemple de diagramme de niveau d'énergie d'un ion  $d^5$  avec  $D$  et  $E \ll h\nu$

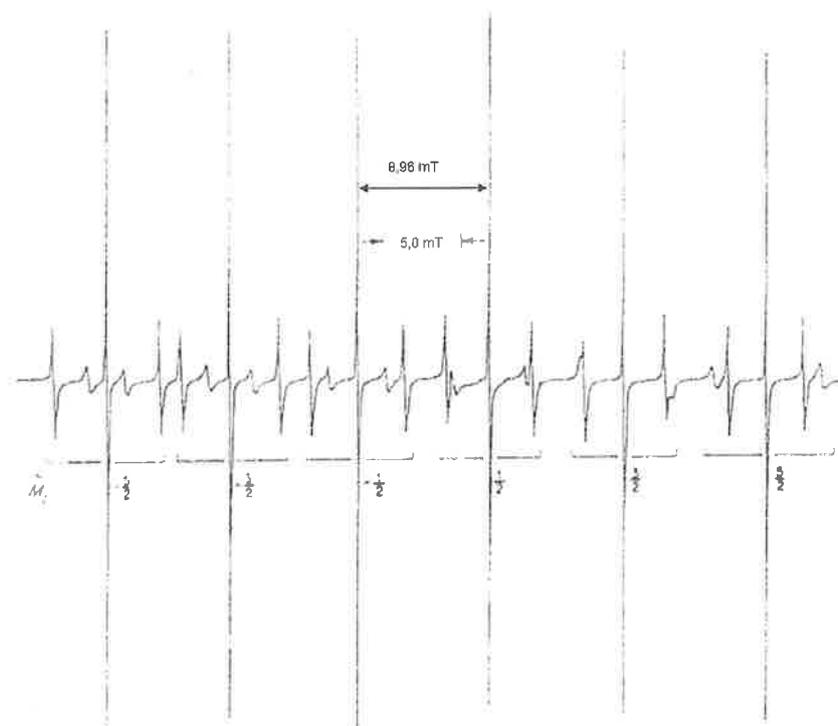


Figure III.3 : Spectre de  $Mn^{2+}$  dans  $MgO$  mesuré en bande X à température ambiante. Ce spectre est constitué de six quintuplets.

Dans le cas du  $Fe^{3+}$ , les valeurs de  $D$  sont généralement très supérieures à  $h\nu$ . La Figure III.4 donne le diagramme correspondant aux niveaux d'énergie dans une telle situation. Comme l'espacement entre les trois paires de niveaux d'énergie est très large, l'énergie de la micro-onde n'est pas suffisante pour induire des transitions entre ces niveaux comme dans le cas du  $Mn^{2+}$ . Dans ce cas, seule la transition entre les niveaux  $\pm 1/2$  est observable, le système a un spin effectif égale à  $S'=1/2$ . La valeur de  $g$  à laquelle peut apparaître cette transition est très variable et dépendante de la valeur du rapport  $\lambda=E/D$ . Au final, ces ions métalliques, bien que présentant la même configuration électronique, présentent des spectres RPE très différents.

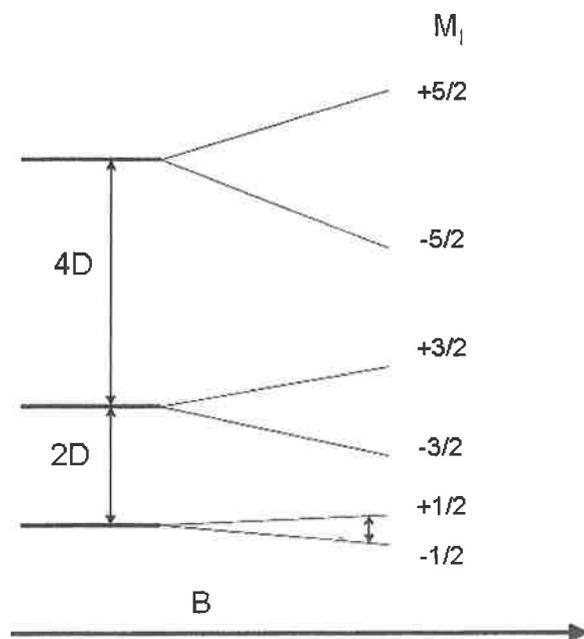


Figure III.4 : diagramme de niveau d'énergie d'un ion  $d^5$  avec  $D \gg h\nu$  (cas du  $Fe^{3+}$ ), la seule transition observable se situe entre les niveaux  $\pm 1/2$

## B.2 Signaux RPE liés au manganèse

Parmi les éléments présents à l'état de traces dans les ongles et susceptibles d'être détectés par RPE, on trouve notamment le manganèse (Olabanji et al., 2005). La mise en évidence de cet ion par spectroscopie RPE est très dépendante de son état d'oxydation et du choix de la fréquence micro-onde utilisée.

### B.2.1 Données techniques et bibliographiques sur le Mn mesuré par RPE

Le manganèse a un seul isotope présent à l'état naturel, le  $^{55}Mn$ . Présent surtout dans l'état d'oxydation 2 ( $Mn^{2+}$ ), il peut être facilement détecté par spectroscopie RPE à température ambiante. Possédant un spin nucléaire  $I=5/2$ , le  $^{55}Mn$  présente des structure caractéristiques de sextuplets hyperfins ( $2I+1=6$ ). Pour les applications de dosimétrie avec la RPE généralement réalisées en bande X, le  $Mn^{2+}$  conditionné dans une matrice de  $MgO$  est souvent

### Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle

utilisé comme « étalon interne »<sup>2</sup> à des teneurs de l'ordre de  $10^{14}$  atomes. Dans ce conditionnement, son facteur  $g$  est de  $2,0012 \pm 0,0002$  et le  $\Delta B$  mesuré entre les raies (3) et (4) vaut 8,69 mT (avec respectivement des facteurs  $g$  effectifs pour ces deux raies de 2,034 et 1,981)<sup>3</sup> (Yordanov et al. 1999). Cet étalon interne présente l'avantage d'encadrer, par les raies 3 et 4 du  $Mn^{2+}$ , la plupart des signaux dosimétriques connus apparaissant autour de  $g=2$ . La concentration de  $Mn^{2+}$  est adaptée pour générer des signaux du même ordre de grandeur que ceux mesurés en dosimétrie. Dans ces conditions, il n'est pas possible de détecter la structure fine (Fig. III.5). Sur la Figure III.5, le signal de faible intensité présent entre les raies (3) et (4), est également mesuré dans la cavité résonante vide. Au laboratoire, les mesures en RPE bande X sont généralement réalisées avec un étalon de ce type, placé dans la partie basse de la cavité. Dans les processus de déconvolution des spectres RPE, les raies (3) et (4) du  $Mn^{2+}$  sont généralement utilisées pour positionner les différentes composantes d'un spectre. Des laboratoires utilisent également l'intensité des raies du  $Mn^{2+}:MgO$  pour améliorer la reproductibilité des mesures en normalisant l'intensité des raies dosimétriques par l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  (Yordanov et al., 1999). Cette procédure peut être intéressante pour corriger les résultats de mesure de l'instabilité ou de la dérive d'un spectromètre. Concernant les données relatives aux ongles, il faut souligner que le signal RPE du manganèse n'a, à notre connaissance, jamais été reporté dans la littérature. Néanmoins, des traces de  $Mn^{2+}$  ont été observées par RPE dans d'autres types de tissus kératinisés, comme dans la corne de sabots d'équidé (Cope et al., 1998).

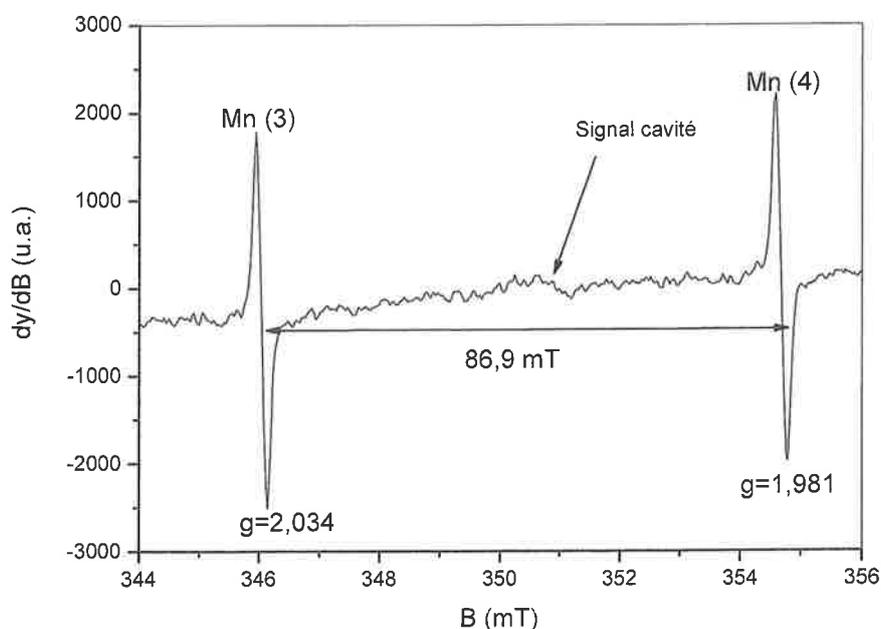


Figure III.5 : Spectre RPE de l'étalon interne de  $Mn:MgO$  utilisé dans la cavité en bande X, mesuré à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW

40

<sup>2</sup> L'échantillon de Mn est souvent placé dans le bas de la cavité à une position fixe, et n'est pas inclus dans l'échantillon.

<sup>3</sup> Dans ce cas, il s'agit d'un pseudo facteur  $g$  et la notation  $g'$  est adopté pour le différencier du véritable facteur  $g$

## **B.2.2 Identification, étude et analyse des signaux RPE liés au Mn**

Pour mettre en évidence la présence de Mn dans les ongles, les mesures RPE ont principalement été réalisées en bande Q. Selon certains auteurs, l'utilisation de fréquences élevées (bande Q et au-delà) permet de mettre en évidence la présence du  $Mn^{2+}$ , mais également du  $Mn^{3+}$ , bien souvent non détectable en bande X dans les matériaux biologiques (Yordanov & Aleksevia, 2004 ; Schmidt et al., 2002 ; Barra et al., 1997). La plus grande sensibilité de la spectroscopie RPE à haute fréquence en serait l'explication.

C'est aussi le fait que pour les fréquences élevées, le terme de l'éclatement à champ nul devient petit devant celui de l'énergie Zeeman. En bande X, lorsque le terme d'éclatement à champ nul domine, le signal RPE du Mn est réparti sur une large gamme de champ, typiquement de 90 à 360 mT. Il semble donc logique, étant donné que la plupart des études par RPE sur les ongles ont été menées en bande X, que la présence de  $Mn^{2+}$  dans les ongles n'ait jamais été reportée. De plus, le fait que de nombreuses équipes utilisent le  $MgO:Mn^{2+}$  comme étalon interne ne facilite pas la mise en évidence du Mn présent dans les ongles.

### ***B.2.2.1 Mise en évidence du signal RPE de $Mn^{2+}$ dans les ongles par mesure en bande Q***

La Figure III.6 présente un spectre RPE d'un prélèvement d'ongle non irradié mesuré en bande Q à température ambiante. Le spectre présenté sur la Figure III.6 est l'un des spectres RPE mesurés en bande Q présentant les signaux RPE liés au Mn les plus intenses. En plus du MIS, on peut noter la présence de six raies équidistantes. Sur la Figure III.6, le  $\Delta B$  entre les raies (3) et (4) est de 9,6 mT. Le nombre de raies et la valeur de la constante de couplage hyperfin sont caractéristiques de la présence de manganèse. Par ailleurs, comme ce sextuplet n'est observable ni dans les spectres de la cavité mesurée à vide ni dans celui du tube de mesure vide, on peut en déduire que c'est bien le manganèse présent dans les ongles qui est à l'origine de ce sextuplet hyperfin.

Pour la plupart des échantillons étudiés en bande Q, le sextuplet hyperfin du manganèse est observable, mais avec une variabilité importante sur la constante de couplage hyperfin et l'intensité des raies des résonances. La plupart des échantillons présentent des intensités de raies du Mn beaucoup moins intense que celle présentée sur la Figure III.6, parfois proche de la limite de détection (Fig. III.7).

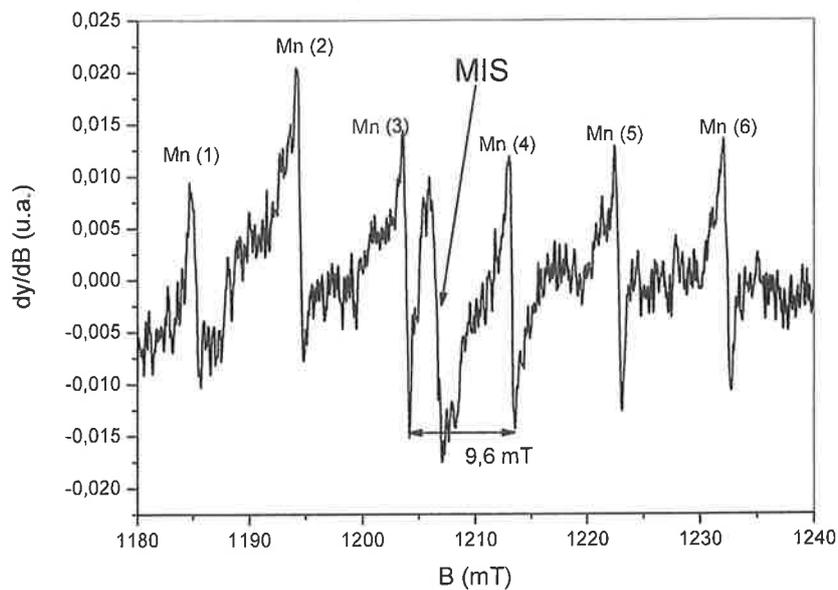


Figure III.6 : Spectre RPE d'un prélèvement d'ongle non irradié mesuré en bande Q à température ambiante (après hydratation et séchage) à une puissance micro-onde de 2 mW.

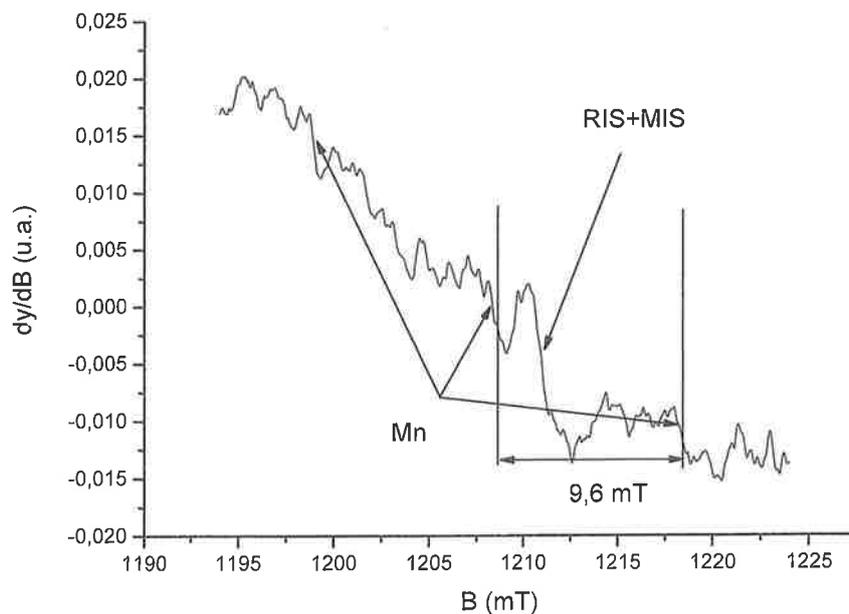


Figure III.7 : Spectre RPE d'un prélèvement d'ongle irradié à 43 Gy (après humidification et séchage) mesuré en bande Q à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW.

Sur l'ensemble des mesures réalisées en bande Q, le  $\Delta B$  entre les raies (3) et (4) varie entre 8,5 et 9,6 mT. Les échantillons ont été mesurés dans des intervalles variables après leur humidification dans de l'eau déminéralisée. La valeur moyenne du  $\Delta B$  d'un échantillon à l'autre varie entre 8,9 et 9,6 mT. L'amplitude de la variation sur la valeur moyenne  $\Delta B$  est dépendante de l'échantillon, pour certains échantillons la variation est au maximum de 0,5 mT alors que pour d'autres échantillons elle peut atteindre 1,2 mT. La valeur moyenne du  $\Delta B$  entre les raies (3) et (4) pour l'ensemble des échantillons mesurés est de  $8,9 \pm 0,4$  mT.

Les échantillons présentant les sextuplets les plus intenses ont des valeurs de  $\Delta B$  entre les raies (3) et (4) inférieures à 9,0 mT. Pour les échantillons avec les sextuplets les moins intenses, la valeur du  $\Delta B$  est significativement plus élevée, de l'ordre de 9,5 mT. La valeur de la constante de couplage hyperfin est directement liée à l'ionicté de l'environnement du  $Mn^{2+}$ , qu'il s'agisse d'un environnement cristallin ou de liaison dans un complexe (Abragam & Pryce, 1953 ; van Wieringen, 1955 ; Matsumura, 1959).

La Figure III.8 montre la variation de la constante de couplage hyperfin du  $^{55}Mn$  en fonction du degré d'ionicté du site cristallin d'après Title (1963).

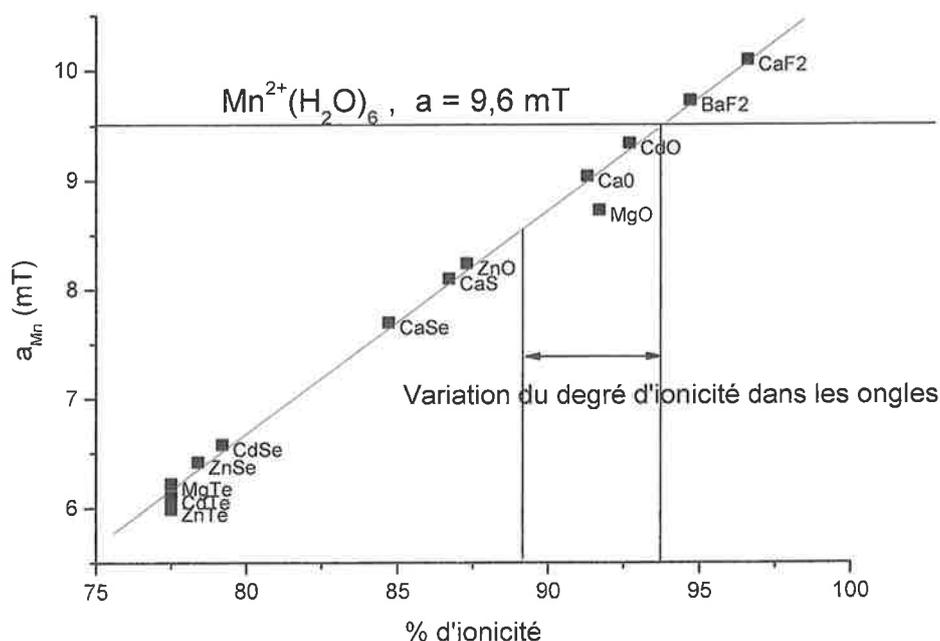


Figure III.8 : Valeur de la constante de couplage hyperfin du  $^{55}Mn$  en fonction de l'ionicté du site cristallin (d'après Title, 1963)

La variation observée du  $\Delta B$  entre les raies du  $Mn^{2+}$  indique que le  $Mn^{2+}$  est probablement présent dans les ongles dans différents environnements. Les proportions relatives de chacune des composantes du  $Mn^{2+}$  peuvent être apparemment très différentes d'un échantillon à l'autre. Si l'on considère que le  $Mn^{2+}$  peut se trouver dans différents environnements avec une possible orientation spécifique pour chaque environnement, il n'est pas surprenant que pour différentes positions de l'échantillon dans le champ magnétique, la constante de couplage hyperfin puisse varier dans les proportions observées. Selon l'orientation de l'échantillon dans le champ magnétique, les contributions respectives en termes d'intensité de signal des  $Mn^{2+}$  présents dans différents environnements peuvent varier de manière significative. D'un échantillon à l'autre, ces contributions sont également très variables.

Il n'a pas été possible de réaliser en bande Q une étude en fonction de l'orientation des échantillons, pour tenter de calculer les différentes valeurs de constante de couplage. En effet,

en bande Q, il n'existe pas de dispositif goniométrique et il est donc difficile de relier de manière précise la position et l'orientation de l'échantillon avec les écarts observés sur le  $\Delta B$ .

*Les mesures réalisées en bande Q ont permis de mettre en évidence la présence de  $Mn^{2+}$  dans les ongles. Une variabilité importante de la valeur de constante de couplage hyperfin entre les différents échantillons mesurés a été observée. Cette variabilité indique que le  $Mn^{2+}$  est probablement présent dans des environnements ioniques différents.*

### B.2.2.2 Mise en évidence du signal RPE du Mn dans les ongles en bande X

Compte tenu des concentrations de manganèse reportées dans les ongles, de l'ordre de quelques ppm, il n'était pas certain que le sextuplet du  $Mn^{2+}$  soit mis en évidence en bande X. Néanmoins sur des séries de mesures réalisées en bande X sur les mêmes prélèvements que ceux précédemment mesurés en bande Q, il a été possible d'observer le sextuplet caractéristique du  $Mn^{2+}$  (Fig. III.9). Il faut également préciser que ces mesures ont été réalisées avec des masses d'échantillons optimisées pour la mesure en bande Q, soit de l'ordre de quelques mg. Les masses mesurées en bande X ne sont donc pas optimales pour la mesure en bande X (généralement de l'ordre de quelques centaines de mg). Néanmoins, le fait que les échantillons soient des coupures d'ongles intègres avec un plan de surface déterminé a permis d'étudier également l'effet de l'orientation de la surface de l'échantillon dans B.

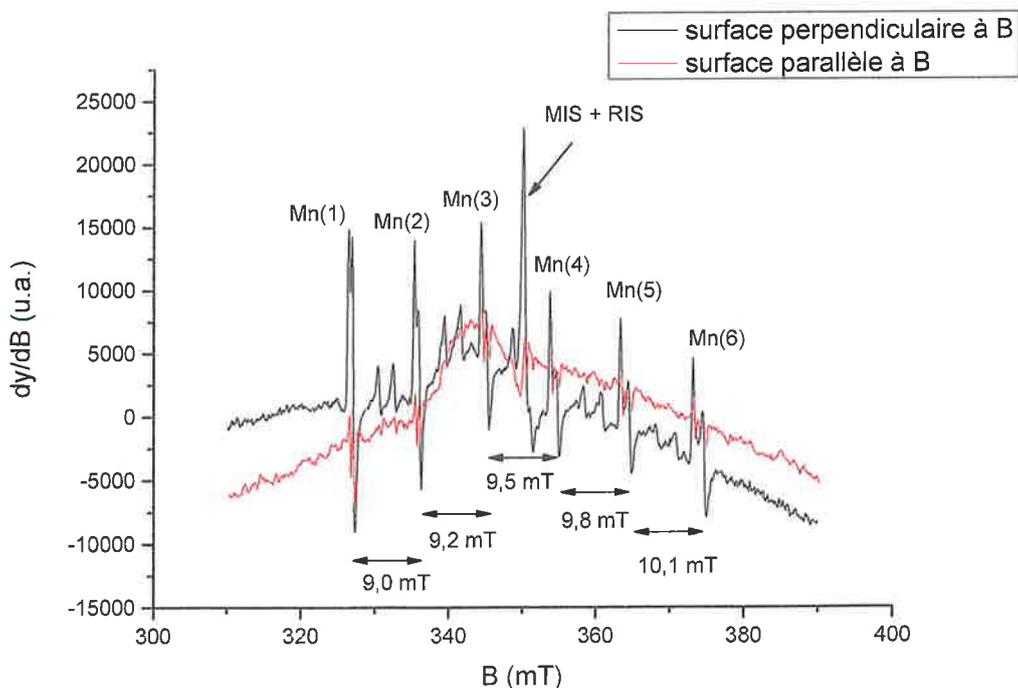


Figure III.9 : Spectres RPE d'un prélèvement d'ongle irradié à 43 Gy (après humidification et séchage) mesuré en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW. Les mesures ont été réalisées avec la surface de l'ongle perpendiculaire et parallèle à la direction du champ magnétique

Sur la Figure III.9 on peut noter que l'intensité des raies est significativement plus intense lorsque la surface de l'ongle est orientée perpendiculairement à B. Pour les deux orientations, l'intensité des raies du sextuplet augmente avec  $M_I$ . Pour les deux orientations, le  $\Delta B$  entre les différentes raies du sextuplet est identique. Les raies du sextuplet mesurées en bande X ne sont pas isotropes et semblent même être dédoublées, l'écart entre ces deux sous-structures augmente lorsque  $M_I$  diminue. On peut également noter la présence de raies moins intenses entre les raies du sextuplet.

En dehors de l'analyse des raies associées au  $Mn^{2+}$ , on peut également noter sur la Figure III.9 la forte influence de l'orientation de la surface de l'ongle avec B sur le signal lié au MIS ou au RIS. D'un point dosimétrique, il semble important de prêter attention à l'orientation de la surface de l'ongle. Les mesures en bande X étant généralement réalisées avec plusieurs coupes d'ongles pour augmenter la masse mesurée et donc l'intensité du signal, cet effet d'orientation n'avait jamais été mis en évidence auparavant, les différentes coupes étant orientées de manière aléatoire dans le tube de mesure.

*Les faibles quantités de Mn n'étaient a priori pas détectables en bande X. Mais, de manière surprenante, le signal du  $Mn^{2+}$  a néanmoins été mis en évidence en bande X.*

### **B.2.3 Interprétation des mesures: hypothèse de l' hexaaqua-Mn**

Il est très surprenant, compte tenu des concentrations de Mn mises en jeu, que la bande X permette de détecter sans difficulté l'ion  $Mn^{2+}$  dans les ongles et offre également une bien meilleure résolution des raies du Mn, comme on peut le noter en comparant les spectres présentées sur les Figures III.6 et III.9. Dans la littérature, il est reporté que la sensibilité de la mesure pour le  $Mn^{2+}$  augmente lorsque l'on passe de la bande X à la bande Q, mais ces données concernent du  $Mn^{2+}$  localisé dans un réseau cristallin. Dans les ongles, il semble que la sensibilité de détection soit même meilleure en bande X qu'en bande Q, surtout si l'on considère que les masses utilisées pour les mesures en bande X n'étaient pas optimales, puisque nous avons mesuré les mêmes échantillons aux deux fréquences.

De plus, il faut également considérer que les concentrations en Mn dans les ongles sont de l'ordre de quelques ppm, A ce niveau de concentration aucune signature provenant du  $Mn^{2+}$  n'est attendue, du moins lorsqu'il s'agit de Mn dans un environnement cristallin. La seule hypothèse que nous soyons en mesure d'envisager est que le  $Mn^{2+}$  détecté soit présent sous une forme hydratée, a priori sous la forme de l'ion libre du Mn aqueux ou  $Mn^{2+}(H_2O)_6$ . Cette espèce est effectivement détectable en bande X à des concentrations micro-molaires (Schmidt et al., 2002). Le mouvement rapide des ions libres induit des valeurs de constantes d'éclatement à champ nul (D, E) bien inférieures à celle du terme d'énergie Zeeman, ce qui permet de le détecter même en bande X. La valeur de la constante de couplage hyperfin de l'ion  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  est, d'après la littérature, de 9,6 mT (Tikhomirova et al., 1972 ; Schmidt et

### Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle

al., 2002). La valeur de la constante de couplage du Mn dans les ongles est une donnée qui peut permettre d'étayer l'hypothèse du  $Mn^{2+}(H_2O)_6$ .

Pour les spectres d'ongles mesurés en bande Q, on peut émettre l'hypothèse que le sextuplet du  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  se superpose aux sextuplets de  $Mn^{2+}$  présents dans d'autres environnements ioniques qui sont également détectés à cette fréquence. Il n'a donc pas été possible de déterminer expérimentalement à partir de ces mesures les différentes valeurs de constante de couplage hyperfin du fait de la présence probable de  $Mn^{2+}$  dans différents environnements. En bande X, contrairement aux mesures en bande Q, le  $\Delta B$  entre les raies (3) et (4) varie très peu d'un échantillon à l'autre avec une valeur moyenne de  $9,50 \pm 0,05$  mT. Cette faible variation est cohérente avec la présence de Mn sous une seule forme chimique.

En bande X, l'estimation des valeurs des constantes de couplage est moins directe qu'en bande Q. En effet, le champ magnétique n'est pas assez fort pour orienter totalement les spins selon l'axe z et les formules généralement utilisées pour rendre compte de l'interaction hyperfine ne permettent pas de prendre en compte cet effet. C'est cet effet qui est responsable de la non équidistance des raies du  $Mn^{2+}$  mesurées en bande X. Dans ce cas, il est nécessaire de réaliser des calculs plus complets pour intégrer ce que l'on appelle les effets de second ordre du couplage hyperfin.

Les valeurs du champ de résonance des différentes raies du  $Mn^{2+}$  peuvent être calculées selon l'Equation III.1. Habituellement, seul le terme d'ordre 2 est ajouté, mais dans notre cas, il a été nécessaire d'ajouter le terme d'ordre 3, pour estimer au mieux la constante de couplage hyperfin. Les termes d'ordre 2 et d'ordre 3 ont respectivement été calculés par Bleaney (1951) et Lacroix (1957). On peut noter que les termes en  $(1/B_0)$  ou  $(1/B_0^2)$  faibles ou négligeables en bande Q (1210 mT), ne le sont plus en bande X (350 mT).

$$\begin{aligned}
 B(M_f) = & B_0 - \left( \frac{A}{g\beta} \right) M_f \\
 & - \left( \frac{A^2}{(g\beta)^2 2B_0} \right) [I(I+1) - M_f^2 + M_f(2M_S - 1)] \\
 & - \left( \frac{A^3}{(g\beta)^3 2B_0^2} \right) [(2M_S - 1)(2I(I+1) - 3M_f^2) - M_f(S(S+1) + I(I+1) - 2 - M_f^2) + 3M_f M_S (M_S - 1)]
 \end{aligned}
 \tag{Equation III.1}$$

L'Equation III.1 rend compte de la non équidistance des raies du sextuplet du Mn en bande X. La valeur de la constante de couplage hyperfin déterminée à partir des  $\Delta B$  mesurés en bande X et de l'Equation III.1 est estimée à  $9,30 \pm 0,05$  mT. Cette valeur est élevée comparée aux valeurs reportées pour les différents environnements ioniques connus du  $Mn^{2+}$  étudiés (Title, 1963). Elle est par contre significativement plus faible que la valeur (9,6 mT) reportée dans la littérature pour  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  (Tikhomirova et al., 1972 ; Schmidt et al., 2002). Cependant, lorsque la sphère d'hydratation est modifiée, par exemple par la présence d'ions à proximité

de la sphère d'hydratation ou par le remplacement d'une molécule d'eau par un ion, la constante de couplage hyperfin est plus faible que celle de  $Mn^{2+}(H_2O)_6$ . La valeur de couplage estimée par exemple pour l'ion le  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  en présence de  $Cl^-$  est de l'ordre de 9,38 mT (Un & Sedoud, 2010). Cette valeur est cohérente avec les valeurs estimées pour le  $Mn^{2+}$  des ongles en bande X. La présence du chlore dans les ongles est reportée dans la littérature, avec des concentrations variant de quelques centaines à quelques milliers de ppm (Olabanji et al., 2005). Si le chlore peut être inclus dans la matrice de l'ongle lors de sa croissance (l'organisme en contient des quantités importantes), l'hydratation quotidienne des ongles, par le biais en particulier du lavage des mains, peut être également considérée comme une source potentielle d'incorporation de l'ion  $Cl^-$ . L'eau de consommation courante contient de quelques dizaines à quelques centaines de ppm d'ions chlore.

L'hypothèse selon laquelle seul du  $Mn^{2+}$  sous une forme hydratée puisse être détecté en bande X, alors qu'en bande Q toutes les contributions liées aux différents environnements du  $Mn^{2+}$  sont détectées, est cohérente avec les valeurs et les variations des  $\Delta B$  entre les raies du Mn observées en bande X et Q. L'hypothèse de la présence d'ions  $Cl^-$  n'est pas incompatible avec les niveaux de détection considérés car les valeurs de constantes d'éclatement en champ nul (D, E) restent bien inférieures à celle du terme d'énergie Zeeman (Un & Sedoud, 2010).

Un autre élément vient confirmer la présence d'ions dans ou à proximité de la sphère d'hydratation du  $Mn^{2+}(H_2O)_6$ . En effet, la forme et la variation de l'intensité des raies du sextuplet présentées sur la Figure III.9 ne correspondent pas à celles attendues pour un spectre de  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  (Fig. III.10), mais sont par ailleurs tout à fait compatibles avec l'hypothèse de la présence d'ions  $Cl^-$ . L'augmentation des paramètres d'éclatement en champ nul induit par la présence d'ions à proximité ou par le remplacement d'une molécule d'eau par un anion peut en effet modifier les formes des raies du sextuplet (Un & Sedoud, 2010). Sur la Figure III.9, les raies présentent une asymétrie qui augmente avec la valeur de  $M_I$  alors que l'intensité des raies du sextuplet décroît pour les valeurs de  $M_I$  croissantes similaires à celles mesurées par Un & Sedoud (2010) en bande W pour  $Mn^{2+}$  aqueux en présence de d'ions  $Cl^-$ .



Figure III.10 : spectre RPE en bande X de  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  en solution aqueuse (Bernards et al., 2005)

En présence d'une concentration suffisante d'ions  $\text{Cl}^-$ , la forme symétrique des raies du sextuplet du  $\text{Mn}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$ , tend vers une forme asymétrique à mesure que la concentration de chlore augmente et présente une forme similaire à celle observée sur la Figure III.9. Un abaissement de la température de mesure, typiquement de l'ordre de 100 K, provoque également une disymétrisation des raies de résonance du sextuplet (Käss et al., 2000). Ces données montrent qu'un environnement ionique ou qu'une contrainte sur les possibilités de mouvement de l'ion peut induire des formes de raies asymétriques. Ainsi comme contrainte sur le mouvement de l'ion, on peut également envisager que l'ion aqueux puisse être lié par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène par exemple à des polypeptides. Sur le spectre de la Figure III.9, en plus de la forme des raies, c'est également l'intensité des raies du sextuplet qui est modifiée par rapport au spectre du  $\text{Mn}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$  présenté sur la Figure III.10. Un comportement similaire du sextuplet du  $\text{Mn}^{2+}$  est également observé en présence d'ions  $\text{Cl}^-$  (Un & Sedoud, 2010). Comme le montre la Figure III.11, les simulations des spectres RPE du  $\text{Mn}^{2+}$  avec différents valeurs de paramètres d'éclatement à champ nul ( $D$ ,  $E$ ) montrent qu'il est possible de reproduire l'allure des raies du sextuplet avec des valeurs de  $D$  relativement faibles ( $D=1710$  MHz), ce qui reste compatible néanmoins avec l'hypothèse de  $\text{Mn}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$  en présence d'ions  $\text{Cl}^-$  ou lié à un polypeptide par exemple. Cette simulation permet de reproduire tant les variations d'intensité des raies du sextuplet que la variation de forme des raies, mais également la présence des « doublets » observée entre les raies du sextuplet.

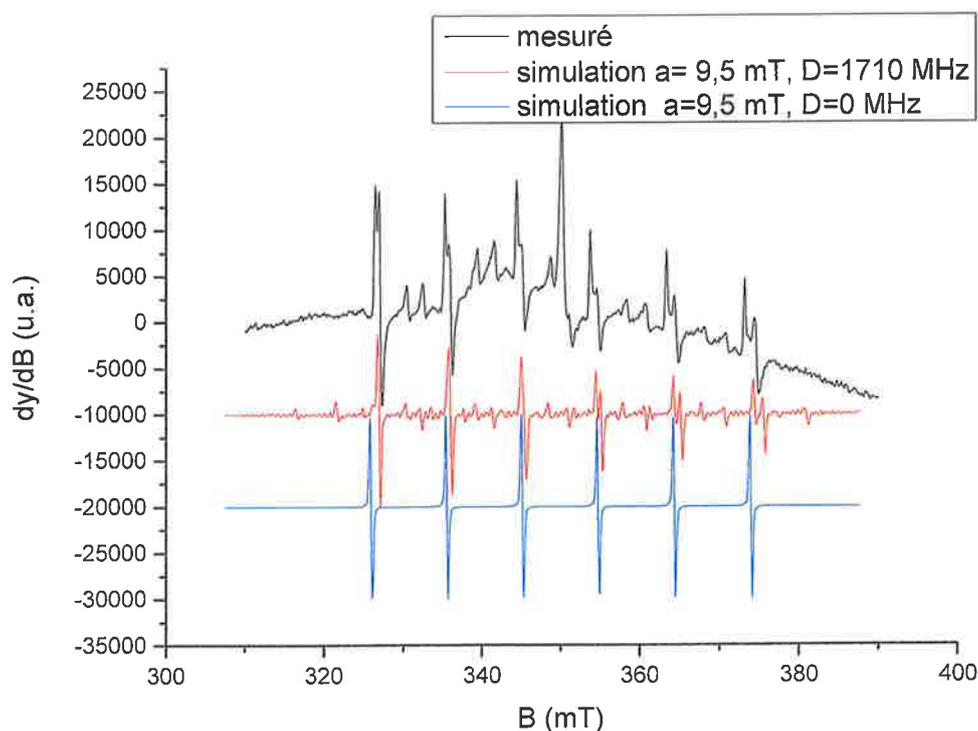


Figure III.11 : Comparaison d'un spectre RPE en bande X d'un prélèvement d'ongle mesuré à température ambiante avec des simulations de spectre RPE du  $\text{Mn}^{2+}$  réalisées avec le logiciel Symphonia avec  $A_{xx} = A_{yy} = 9,6$  mT,  $A_{zz} = 9,8$  mT,  $E = 0$  MHz, et  $D = 1710$  MHz (tracé rouge) et  $D = 0$  MHz (tracé bleu).

Enfin, l'un des derniers éléments qui reste à interpréter en relation avec l'hypothèse d'une espèce  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  est la variation significative de l'intensité des raies du sextuplet en fonction de l'angle que fait la surface de l'ongle avec le champ magnétique sur les spectres mesurés en bande X (cf. Figure III.9). Cette variation indique une orientation préférentielle des ions  $Mn^{2+}$ , ce qui est contradictoire avec l'hypothèse de l'ion libre, mais tout à fait compatible avec l'hypothèse d'une contrainte sur le mouvement de l'ion du fait de l'établissement d'une liaison avec un polypeptide par exemple. Cette variation de l'intensité du sextuplet mesuré en bande X peut être interprétée en gardant à l'esprit que l'ongle est constitué de filaments organisés dans des directions privilégiées (dans la couche intermédiaire), formant des strates. Si l'on considère qu'il s'agit d'ongles déshydratés et donc avec une faible teneur en eau, il est possible que l'ion  $Mn^{2+}$ , bien que toujours présent sous sa forme hydraté, puisse être lié à la surface d'un polypeptide par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène entre les molécules d'eau de la sphère d'hydratation et des atomes d'hydrogène des polypeptides. Si l'on retient l'hypothèse de la présence d'ions dans la sphère d'hydratation du  $Mn^{2+}$ , il est alors également envisageable que des liaisons ioniques soient également mises en jeu. Ces hypothèses sont parfaitement compatibles avec les paramètres ( $D \neq 0$ ) utilisés pour la simulation des spectres mesurés en bande X. Cela nous indique que l'espèce mesurée peut également être de la forme  $(Mn(H_2O)_5Cl)^+$ , si l'on considère la présence d'ions chlore.

*Le manganèse mis en évidence dans les ongles en bande X est très probablement présent sous sa forme hydratée,  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  en présence d'ions tels que Cl. En bande Q, du  $Mn^{2+}$  présent dans des environnements ioniques différents est également détecté.*

### ***B.2.3.1 Etude de la structure du spectre du $Mn^{2+}$ dans les ongles***

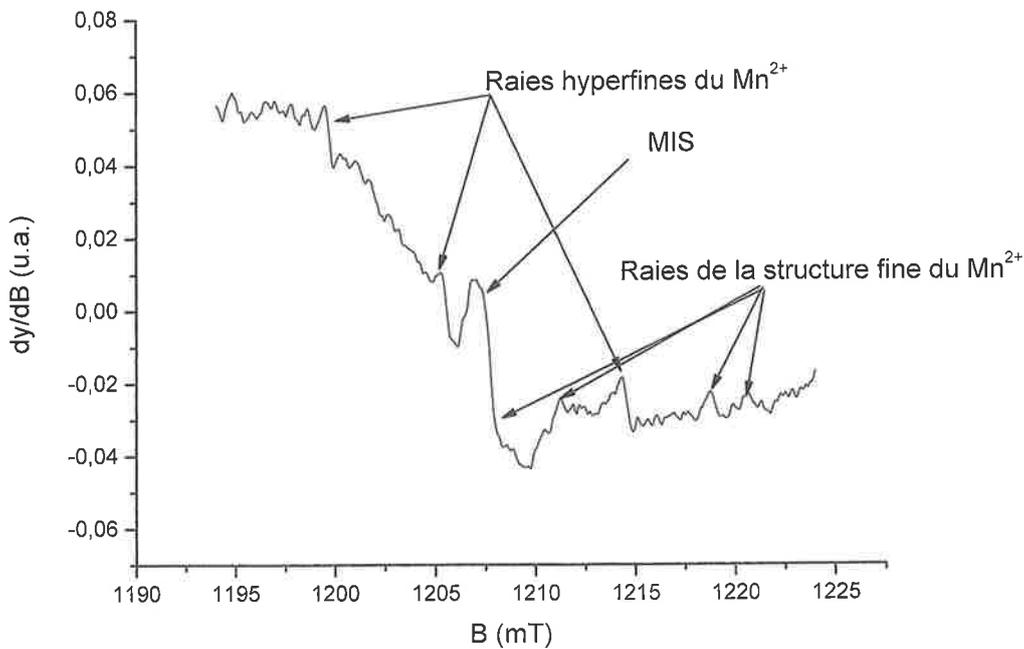
La présence de « doublets » entre les raies du sextuplet (cf. Figure III.9) est observée dans différents types de matériaux (calcaires, marbres ou encore zéolites par exemple) et dans des échantillons biologiques (enzymes). Ces doublets sont généralement associés aux transitions dites « interdites » de  $Mn^{2+}$  ( $\Delta M_I = \pm 1$ ) (Tikhomirova et al., 1972 ; Ashford & Jarke, 1972 ; Käss et al., 2000 ; Bennur et al., 2001 ; Polikreti et al., 2004).

Les **transitions « interdites »** ne sont a priori pas compatibles avec l'hypothèse de  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  libre. Néanmoins, les paramètres des simulations présentées sur la Figure III.11 permettent de générer des « doublets » entre les sextuplets avec des caractéristiques similaires à celles observées sur le spectre mesuré. Ceci signifie qu'il peut s'agir, non pas de transitions interdites mais d'une structure fine, dont la présence reste compatible avec l'hypothèse du  $Mn^{2+}(H_2O)_6$ . En effet, pour que la structure fine soit observée, il faut que le terme d'éclatement en champ nul soit inférieur au terme Zeeman électronique.

En théorie, lorsqu'il s'agit de transitions interdites, une forte décroissance de l'intensité des raies « interdites » est observée lorsque l'on passe de la bande X à la bande Q. En effet, le

ratio entre l'intensité des raies permises et celles des raies interdites varie comme  $(D/B_0)^2$ . En bande Q, avec des valeurs de champ magnétiques beaucoup plus élevées (environ 1210 mT), les « doublets » devraient donc être absents, si il s'agissait des raies de « interdites ». Or, ces « doublets » sont également mesurés en bande Q (Fig. III.12).

Dans le cas d'une structure fine, comme le montre les simulations de la Figure III.13, les « doublets » sont présents avec un ratio des intensités des raies principales avec les raies satellites qui varie peu entre la bande X et Q. Ces « doublets » sont en fait constitués de deux raies provenant de deux quintets adjacents comme le montre la Figure III.12.



*Figure III.12 : Spectres RPE en bande Q d'un prélèvement d'ongle non irradié mesuré à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW*

En effet, dans le cas du  $Mn^{2+}$ , lorsque l'éclatement hyperfin est supérieur à celui de l'éclatement en champ nul, une série de six quintets correspondant à une structure fine peut être observée. Dans le cas d'une structure fine, les niveaux d'énergie se divisent en  $2S+1$  sous niveaux, ce qui donne pour  $Mn^{2+}$  ( $S=5/2$ ), 6 sous niveaux et selon les règles de transition ( $\Delta M=\pm 1$ ), 5 raies de résonance pour chaque niveau d'énergie de la structure hyperfine (cf. Figure III.14). Dans les spectres des ongles, les quintets se superposent, ce qui induit cette structure apparente de « doublets » entre les raies du sextuplet.

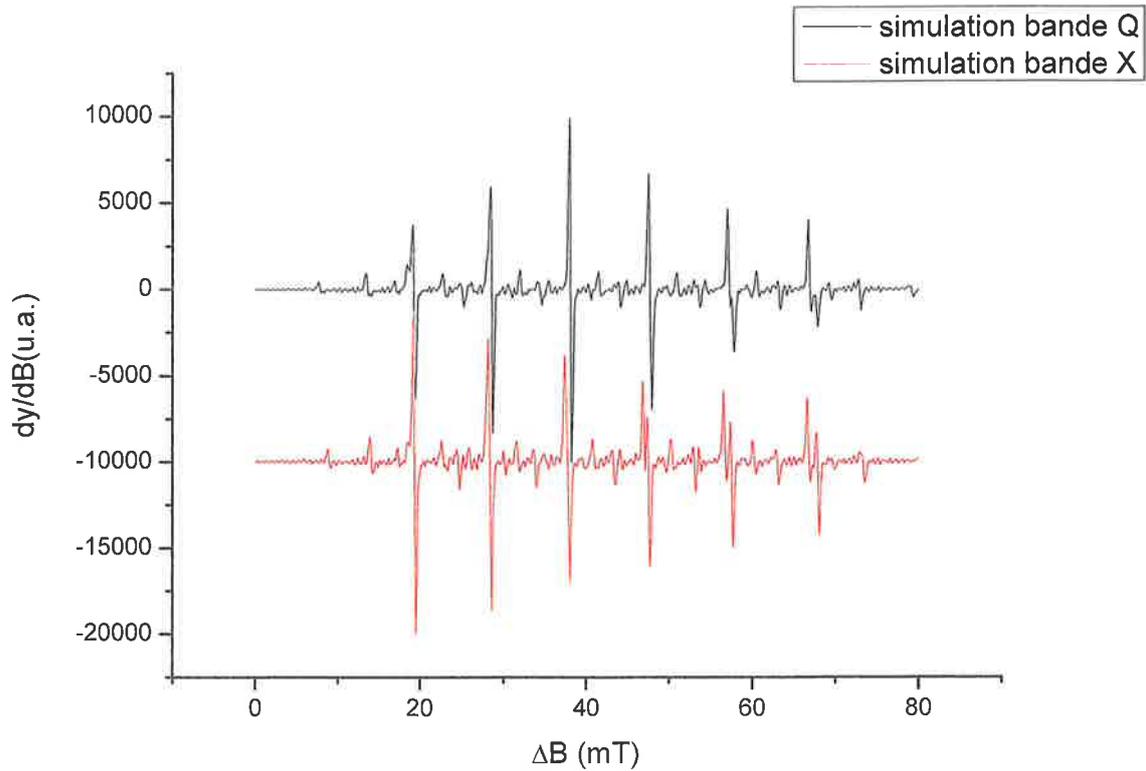


Figure III.13 : Spectres RPE du  $Mn^{2+}$  simulé à l'aide du logiciel Symphonia avec les paramètres suivants : avec  $A_{xx} = A_{yy} = 9,6$  mT,  $A_{zz} = 9,8$  mT,  $E = 0$  MHz,  $D = 1710$  MHz et une fréquence micro-onde de 9,8 et 34 GHz pour la bande X et la bande Q

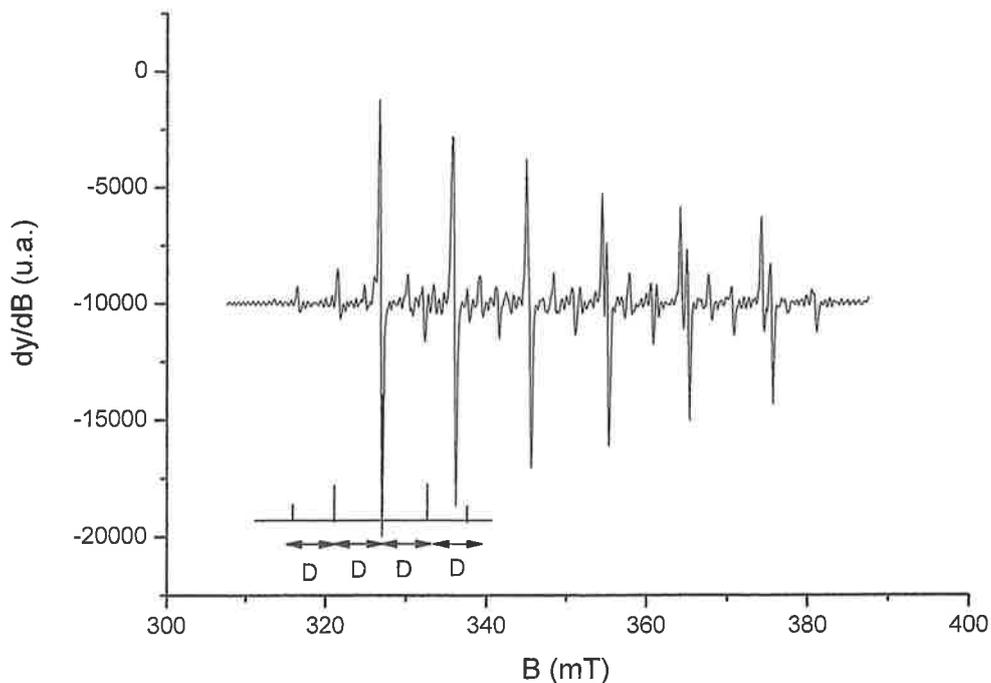
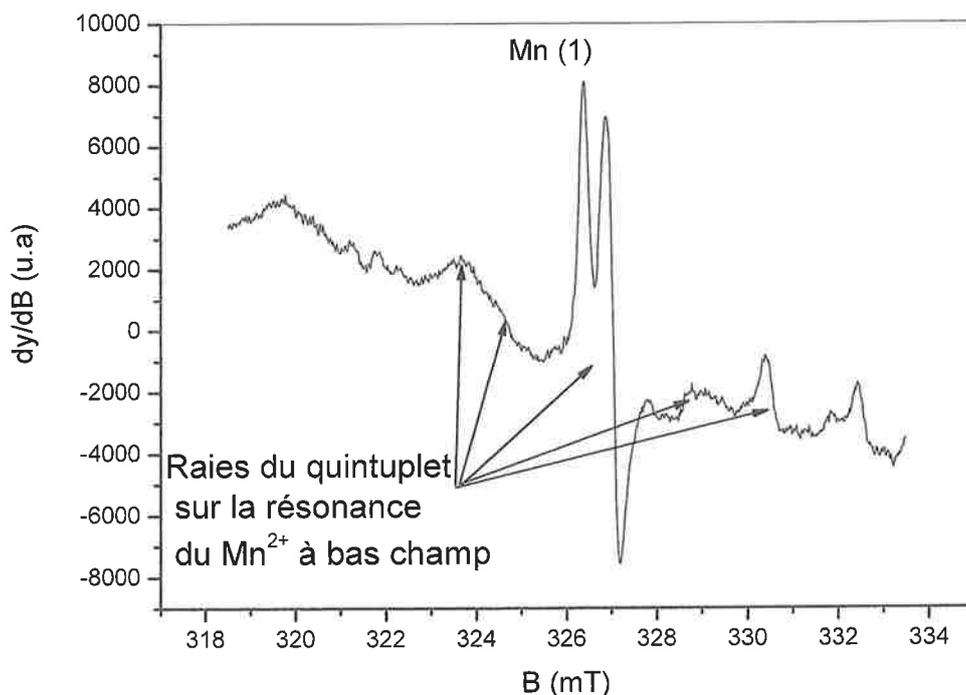


Figure III.14 : détails de la structure fine sur la raie du  $Mn^{2+}$  sur un spectre simulé en bande X, avec  $E = 0$  MHz et  $D = 1710$  MHz

Il est donc fort probable que la structure fine observée en bande Q soit uniquement associée à  $Mn^{2+}(H_2O)_6$ . Il peut paraître surprenant d'observer en bande X et à température ambiante une structure fine dans un matériau biologique. Ces dernières peuvent être mises en évidence dans

des échantillons biologiques à des fréquences élevées ( $> 115$  GHz). Lorsque des structures fines des ions de transitions sont observées en bande X, c'est généralement dans le cadre d'études réalisées sur des monocristaux. Dans le cas des échantillons poly-cristallins, parmi les 2S raies de structure fine, seule la raie correspondant à la transition  $-1/2 \rightarrow +1/2$  est relativement isotrope, les autres raies sont décalées de plusieurs dizaines ou centaines de mT. Elles ne sont donc généralement pas observables car distribuées sur une trop large plage de valeurs de champ magnétique. Le fait d'observer la structure fine à des orientations privilégiées (Fig. III.9) confirme l'hypothèse émise précédemment sur l'orientation préférentielle des ions  $Mn^{2+}$  dans leur forme aqueuse, à savoir que ces ions pourraient être liés à la surface des filaments ou protéines. Sur la Figure III.11, pour la première et la dernière résonance du  $Mn^{2+}$ , le quintet semble incomplet, mais en réalisant une mesure plus précise autour de ces deux résonances, il est possible de distinguer les raies manquantes (Fig. III.15). Ces raies correspondent également à des transitions moins intenses, ce qui peut expliquer qu'elles soient plus difficilement observables.



*Figure III.15 : Détail de la structure fine du spectre RPE du  $Mn^{2+}$  présent dans les ongles au niveau de la première résonance du  $Mn^{2+}$ .*

*En bande X, en plus de la structure hyperfine, une structure fine a également été mise en évidence. Cette structure fine est associée à la présence de  $Mn^{2+}(H_2O)_6$  dans un environnement ionique ou lié par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène à un polypeptide.*

**B.2.4 Influence de la structure fine de  $Mn^{2+}$  sur l'analyse du MIS ou du RIS**

On peut noter dans la partie centrale du spectre RPE bande X présenté sur la Figure III.16, que les raies de structure fine du  $Mn^{2+}$  peuvent se superposer au MIS ou au RIS, notamment lorsque la surface des ongles est orientée perpendiculairement à la direction du champ magnétique. En bande Q, la structure fine de  $Mn^{2+}$  se superpose également avec le RIS et le MIS, mais cette contribution est plus faible qu'en bande X et contribue dans la partie à haut champ du MIS ou RIS (Fig. III.16).

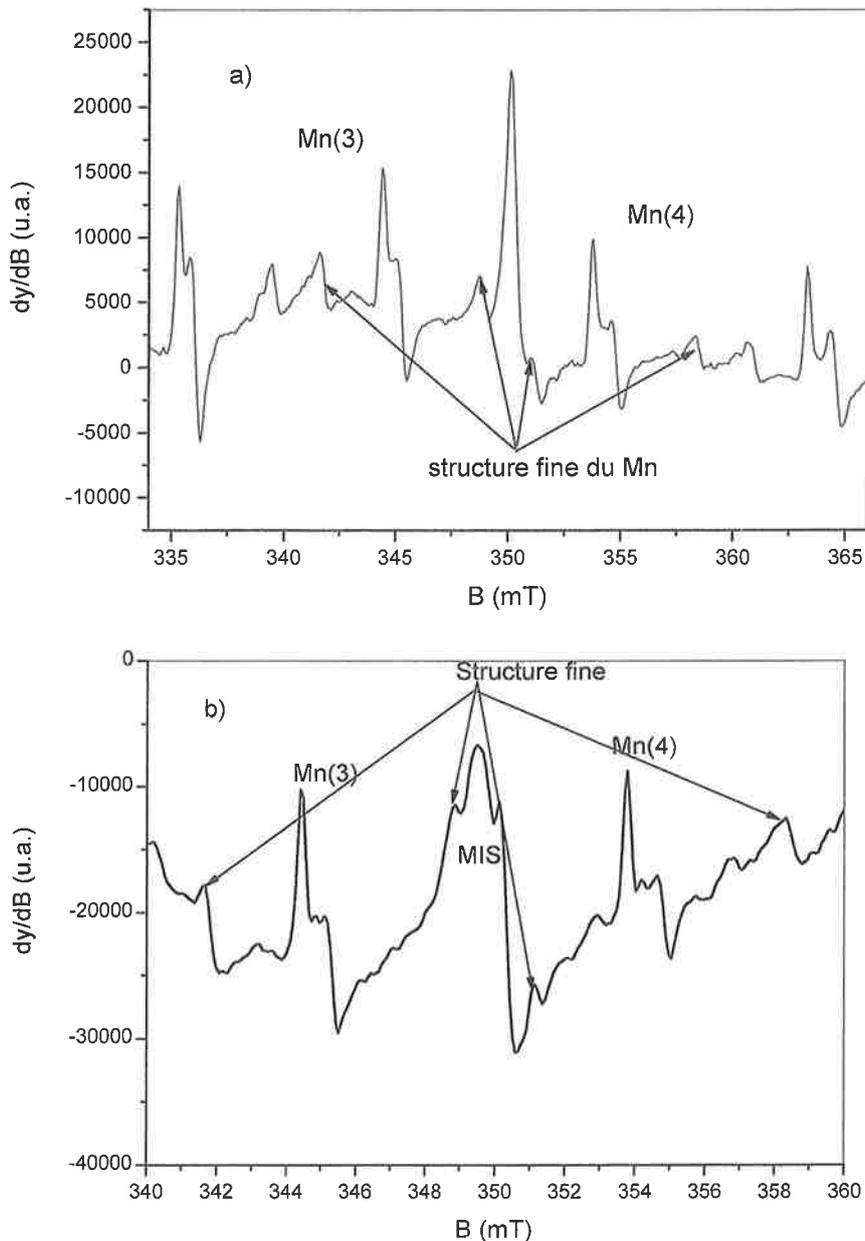


Figure III.16 : Spectres RPE bande X de deux prélèvements d'ongles non irradiés mesurés à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW et avec une modulation d'amplitude de 0,3 mT, a) échantillon 1 sur une largeur de champ de 30 mT b) échantillon 2 sur une largeur de champ de 20 mT.

La mise en évidence de la structure fine du Mn, permet de comprendre qu'une partie des raies observées dans la structure du MIS autour de  $g=2$ , notamment en bande X, est due aux raies externes des quintets de la structure fine de  $Mn^{2+}$ .

### B.2.5 Variabilité de l'intensité des raies du Mn

L'intensité des raies de  $Mn^{2+}$  mesurées en bande Q peut être variable d'une mesure à l'autre pour un même échantillon (écart-type variant de quelques % à 60%), principalement du fait de la faible intensité des raies du Mn dans la plupart des échantillons et de conditions de mesure non optimisées. L'analyse de l'ensemble des mesures réalisées en bande Q pour les différents échantillons, montre également une variation importante de l'intensité moyenne des raies d'un donneur à l'autre, comme l'illustre par exemple la Figure III.17, ce qui indique a priori que les concentrations de  $Mn^{2+}$  dans les ongles sont très variables d'un donneur à l'autre. Les analyses par PIXE (Particle Induced X-rays Emission) reportent des variations maximales atteignant un facteur 10, ce qui paraît compatible avec les variations observées sur l'intensité des raies du Mn (Olabanji et al., 2005).

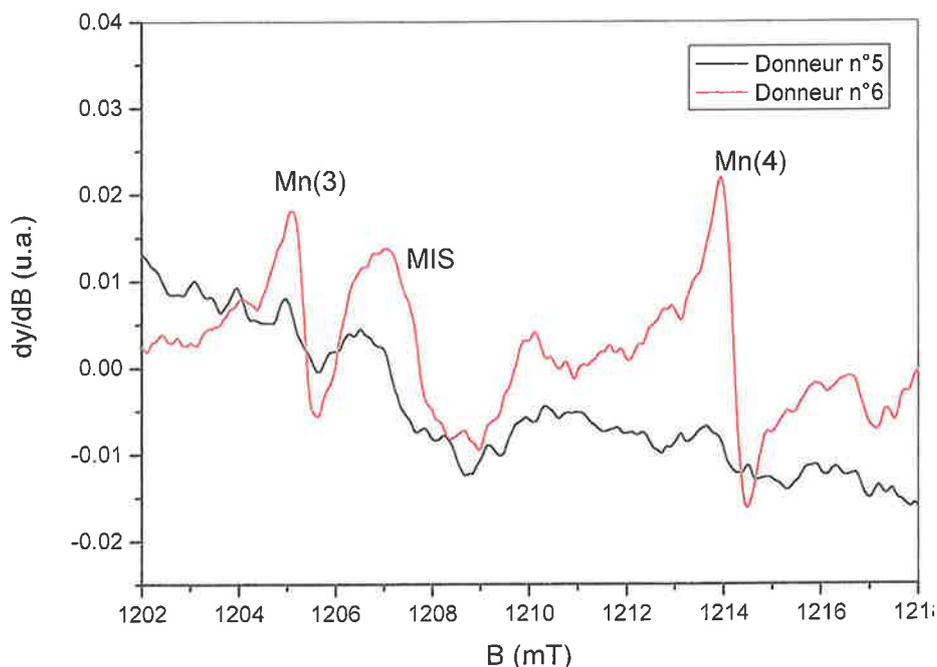


Figure III.17 : Spectres RPE bande Q de prélèvement d'ongles non irradiés mesurés à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW et une modulation d'amplitude de 0,3 mT. Les spectres sont normalisés par le nombre d'acquisitions réalisées et la masse des échantillons.

### B.2.6 Effet de l'irradiation sur les signaux RPE du Mn

D'après la littérature, il n'est pas attendu d'effet de l'irradiation sur l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$ . Aucun effet n'a été mis en évidence jusqu'à des doses de l'ordre de 100 kGy pour du  $Mn^{2+}$  conditionné dans du MgO et jusqu'à 15 kGy pour le Mn présent dans des plantes

séchées (Yordanov et al., 1999 ; Yordanov & Aleksievia, 2004). Comme la sensibilité à la dose peut être affectée par l'environnement direct de l'ion ou la composition de la matrice, nous avons vérifié qu'il en était de même dans les ongles, mais dans la gamme de doses susceptibles d'être délivrées lors d'un accident au niveau des mains (< 100 Gy). Les ongles sélectionnés provenaient de deux donneurs pour lesquels les signaux dus au  $Mn^{2+}$  étaient les plus intenses. Pour les échantillons provenant d'autres donneurs, les raies de  $Mn^{2+}$  n'étaient pas suffisamment intenses pour mettre en évidence un quelconque effet. Les ongles ont été mesurés à température ambiante en bande Q. La Figure III.18 présente les variations de l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  en fonction de la dose délivrée pour les prélèvements de 2 donneurs.

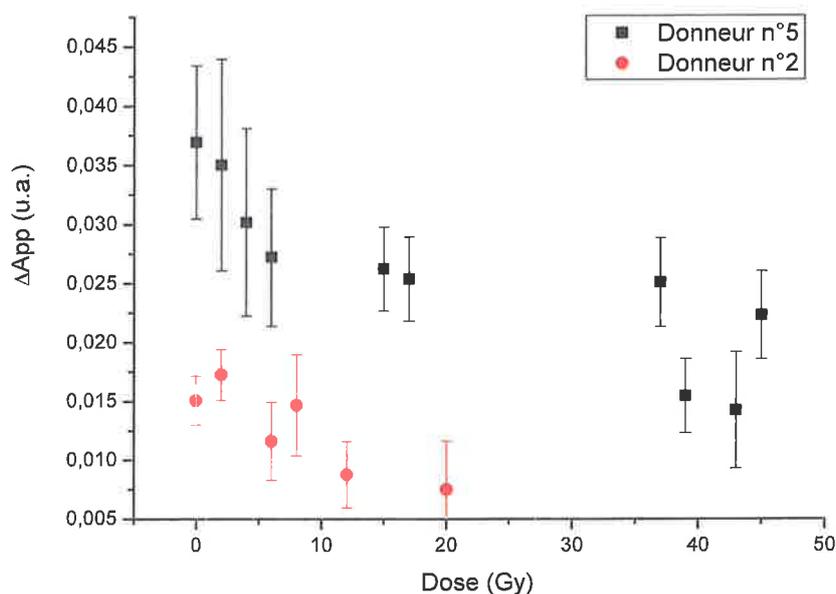


Figure III.18 : variations de l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  en fonction de la dose pour des prélèvements de 2 donneurs. Les mesures ont été réalisées en bande Q à température ambiante et à une puissance micro-onde de 1 mW.

La reproductibilité évaluée sur les séries de mesures des raies du Mn est comprise entre 12 et 55 %. Pour ces deux échantillons, on observe une baisse de l'intensité des raies entre 0 et 10 Gy et une apparente stabilisation du signal au-delà de 10 Gy. La décroissance de l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  peut s'expliquer par un changement de valence du Mn. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées, comme la perte d'électron due à l'interaction directe des rayonnements ionisants avec le  $Mn^{2+}$ , la réaction avec un produit de radiolyse, ou encore la capture d'un électron produit par interaction des rayonnements ionisants.

N'ayant pas déterminé l'ensemble des formes chimiques du Mn présent dans les ongles, il est difficile de privilégier une hypothèse. Cependant, il faut souligner que les ongles ont été humidifiés entre chaque cycle de mesure et que des réactions d'oxydation du  $Mn^{2+}$  peuvent avoir lieu avec des produits de radiolyse de l'eau dans les protéines (Daly, 2009). Nous

### *Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle*

pouvons juste noter que l'irradiation induit ou modifie l'équilibre d'une réaction d'oxydo-réduction du  $Mn^{2+}$ .

L'effet observé de l'irradiation sur l'intensité des raies du sextuplet du  $Mn^{2+}$  peut paraître surprenant par rapport aux données de la littérature. En effet, l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  dans différents types de matrice est connue pour être indépendante de la dose délivrée dans des gammes de doses élevées (3-100 kGy) (Yordanov et al., 1999 ; Yordanov & Aleksievia, 2004). Cependant, les données reportées dans notre étude ne sont pas pour autant incompatibles avec l'absence d'effet des fortes doses sur le signal du  $Mn^{2+}$ . Dans les deux articles cités, l'amplitude des raies du  $Mn^{2+}$  des échantillons irradiés n'a pas été comparée à l'amplitude avant irradiation et il n'est donc pas impossible que l'amplitude du Mn dans ces matrices présente également un effet de saturation en dose dans des gammes de doses très faibles au regard des gammes de doses étudiées dans ces travaux.

Comme la plupart des échantillons d'ongles étudiés ne présentaient pas de raies de  $Mn^{2+}$  suffisamment intenses pour être mesurées avec une reproductibilité suffisante pour mettre en évidence un effet des rayonnements ionisants, l'étude n'a pas été poursuivie plus avant pour une éventuelle application en dosimétrie, car l'utilisation des signaux radio-induits déjà identifiés dans la littérature permettait d'envisager une application plus universelle. Cependant, dans certains cas, notamment lorsque des ongles présentent des quantités de Mn supérieures à la moyenne, le  $Mn^{2+}$  pourrait très bien être envisagé comme indicateur de la dose reçue. Il faut également noter que les conditions de mesure en bande Q (puissance micro-onde, modulation d'amplitude, forme de l'échantillon, épaisseur de tube, etc.) n'ont pas été optimisées pour la mesure du  $Mn^{2+}$ . Dans le cas du Mn, il serait certainement préférable de mesurer les échantillons sous forme de petits morceaux ou en poudre, plutôt que le prélèvement dans son intégrité, le MIS n'étant pas un problème pour la détection du Mn. Il serait intéressant de vérifier qu'avec des conditions de mesure optimisées, le Mn peut être détecté à un niveau de reproductibilité satisfaisant pour la plupart des donneurs.

Il faut également souligner que les techniques conventionnelles d'estimation de la dose, ne sont pas applicables compte tenu de la variabilité sur les teneurs en Mn et compte tenu de l'allure de la courbe. Néanmoins, nous pensons qu'il est possible d'estimer une dose d'exposition à partir du point de saturation en dose du signal du Mn. Il suffit en théorie de ré-irradier à plusieurs reprises le ou les échantillons à des doses connues de l'ordre de 1 à 2 Gy jusqu'à atteindre le niveau de saturation de l'amplitude du signal du  $Mn^{2+}$  autour de 10 Gy. La dose liée à la surexposition peut alors simplement être estimée par la formule donnée dans l'Equation III.2 et ce quelque soit la teneur en  $Mn^{2+}$  et la sensibilité à la dose.

$$D_{\text{exposition}} = D_{\text{saturation}} - D_{\text{ajoutée}} \quad \text{Équation III.2}$$

Cette méthode originale d'estimation des doses n'a, à notre connaissance, jamais été reportée dans la littérature. Dans la poursuite de cette étude, il serait donc nécessaire d'estimer la

variabilité de la dose de saturation pour le  $Mn^{2+}$  sur une large palette de donneurs, car si cette variabilité est faible, une valeur moyenne de dose de saturation pourra être utilisée pour estimer les doses reçues sur un échantillon donné dans la gamme 0-10 Gy. Si ce n'est pas le cas, mais si, par contre, la variabilité est faible pour un même donneur, il sera possible d'utiliser les ongles les moins exposés (ongles des pieds si l'irradiation est localisée au niveau des mains par exemple). Il faudra également étudier l'effet des conditions environnementales (température, humidité, etc.) sur la stabilité signal du  $Mn^{2+}$ .

*Une variation de l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  en fonction de la dose est reportée dans une gamme de 0 à 10 Gy. A notre connaissance, c'est la première fois qu'est mis en évidence un effet de l'irradiation sur les raies du  $Mn^{2+}$ .*

### **B.2.7 Utilisation pratique des raies du $Mn^{2+}$**

Comme il est peu aisé d'implanter un étalon interne dans la cavité bande Q, les raies du  $Mn^{2+}$  aurait pu s'avérer être d'une aide précieuse pour localiser dans les spectres mesurés les raies d'intérêt dosimétriques de faible intensité. Compte tenu des variations observées sur les valeurs de couplage hyperfin, il n'est pas envisagé d'utiliser les raies du Mn pour localiser avec précision les raies d'intérêt.

L'utilisation du  $Mn^{2+}$  présent dans les ongles, selon le principe de « l'étalon interne » évoqué précédemment, semble également difficilement envisageable pour normaliser l'intensité des signaux dosimétriques. De plus, selon l'expérience du laboratoire, la normalisation de l'intensité du RIS ou du MIS par l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  ne permet pas d'améliorer la reproductibilité de la mesure sur des séries de mesure, quelque soit le type d'échantillons (émail dentaire ou alanine par exemple).

### **B.2.8 Perspectives et conclusions sur le $Mn^{2+}$**

Si à première vue, l'étude du  $Mn^{2+}$  dans les ongles ne semblait pas présenter d'intérêt direct pour les applications en dosimétrie, il s'avère au final qu'une partie des signaux présents dans la structure du MIS ou du RIS est en fait liée à la structure fine du  $Mn^{2+}$ . De plus, une variation de l'amplitude du  $Mn^{2+}$  en fonction de la dose délivrée a été mise en évidence dans la gamme 0-10 Gy pour les échantillons présentant la plus forte teneur en  $Mn^{2+}$ . Il pourrait donc être intéressant de poursuivre cette étude avec des paramètres de mesure et une préparation de l'échantillon optimisés. Le cas échéant, il pourrait ainsi être possible d'estimer des doses sur les ongles dans des gammes de doses comprises entre 0 et 10 Gy.

En dehors des applications envisagées en dosimétrie, la spectroscopie RPE sur les ongles peut théoriquement permettre le dosage du  $Mn^{2+}$ , mais nécessite la mise au point d'un protocole permettant des mesures reproductibles (par exemple, échantillon sous forme de poudre). Le dosage du  $Mn^{2+}$  dans les ongles peut présenter un certain intérêt. En effet, un taux élevé de Mn dans les ongles combiné avec la présence d'autres métaux a été corrélée avec différents types de pathologies (hypertension avec Cd et Cu ; affection de la peau avec Cr, Fe et Cu,

### *Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle*

etc.) (Mehra & Juneja, 2005) et la forte concentration de manganèse seule peut induire des désordres neurologiques parfois similaires à ceux de la maladie de Parkinson (Couper, 1837). Avant d'envisager une éventuelle application, il sera bien sûr nécessaire d'étudier les avantages de la RPE par rapport aux techniques PIXE (Particle Induced X-rays Emission), AAS (Atomic Absorption Spectrophotometry) ou XRF (X-Ray Fluorescence).

*La signature du  $Mn^{2+}$  a été mise en évidence dans les spectres RPE des ongles. Une structure fine a été mise en évidence, qui peut se superposer aux signaux du MIS et du RIS. Une dépendance de l'intensité des raies du  $Mn^{2+}$  avec la dose a été mise en évidence dans la gamme de dose 0-10Gy.*

#### **B.3 Signaux RPE liés à la présence de fer**

##### **B.3.1 Analyse bibliographique**

Si la concentration en fer dans les ongles est reportée dans de nombreux articles, son origine et ses formes chimiques ne sont généralement pas précisées (Mehra & Juneja, 2005 ; Olabanji et al., 2005 ; Paschoa et al., 1984, etc.). Les techniques d'analyse utilisées (PIXE et AAS par exemple) ne permettent pas de déterminer ses différentes formes chimiques. Dans l'organisme, le fer est généralement présent sous forme de complexes liés à des protéines, il peut s'agir de protéines héminiques (hémoglobine, myoglobine, etc.) ou de métalloprotéines (protéines de type Fe-S par exemple). Selon le type de complexe, le fer peut avoir différents degrés d'oxydation ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  et moins fréquemment  $Fe^{4+}$ ).

Comme le fer peut générer des raies RPE intenses dont l'intensité peut parfois être modifiée par l'irradiation (comme cela est le cas dans les verres minéraux), il était intéressant, outre l'aspect purement descriptif de la composante du signal intrinsèque lié au fer permettant d'accéder à des informations sur sa forme chimique, d'étudier également la variabilité de ces signaux et leur comportement vis-à-vis de la dose de rayonnement ionisant.

Le fer présent dans les ongles peut en fait avoir plusieurs origines et donc plusieurs formes chimiques. Il n'existe pas de données précises à ce sujet. Le fer peut être incorporé lors de la formation de l'ongle comme les autres éléments minéraux présents dans les ongles, comme le calcium, à partir du fer présent dans l'organisme. Une autre source possible est la contamination externe des ongles par exemple via des fumées ou la manipulation de produits divers. Les ongles sont connus pour incorporer la plupart des contaminants ingérés ou inhalés par l'organisme, comme l'arsenic ou les phtalates (Mehra & Juneja, 2005 ; Jackson, 2008). Néanmoins l'ongle étant un matériau poreux, une source externe de contamination est également envisageable, la coloration des ongles de fumeurs par exemple en est un bon indice. S'il est avéré dans plusieurs études que les fumeurs ou les travailleurs exposés à des fumées toxiques ont des concentrations d'éléments métalliques dans les ongles (Ni, Cd, Fe) bien plus importantes que pour des populations témoins (Sukumar & Subramanian, 1992 ; Wolfsperger et al., 1994 ; Mehra & Juneja, 2005), les processus d'incorporation n'ont pas été

explicités (inhalation et ingestion ou absorption directe dans les ongles). Une autre origine possible de la présence de fer peut être liée à des micro-saignements au niveau de la matrice de l'ongle. Lors de la croissance de l'ongle, des hémoprotéines pourraient être alors incorporées dans la matrice de l'ongle.

Le fer sous sa forme  $\text{Fe}^{3+}$  (configuration  $d^5$ ) est observé en spectroscopie RPE dans différents types de matériaux, par exemple dans les métalloprotéines, les enzymes, le sang séché, les verres minéraux, etc., que ce soit dans un état de spin haut (HS) ou bas (BS).

#### **B.3.2 Identification, étude et analyse des signaux RPE liés au Fe**

Afin de mettre en évidence la présence de fer, des mesures ont été réalisées sur des ongles provenant de différents donneurs ( $n=10$ ), en bande X pour des valeurs de champ comprises entre 100 et 600 mT. En effet, les signaux généralement attribués au fer ont des valeurs de  $g$  comprises entre 2 et 10. Les raies à bas champ sont généralement caractéristiques de la présence de fer, notamment les raies à  $g'=4,3$  et  $g'=6,0$ . Autour de  $g=2$  l'interprétation peut être plus délicate, du fait des nombreux défauts ou radicaux générant des raies RPE dans cette zone. L'interprétation des raies mesurées à bas champ ( $g'=4,3$  et  $g'=6,0$ ) a été donnée dès le début des années 1960 pour des mesures réalisées dans des verres minéraux (Castner et al., 1960). Ces raies sont liées aux valeurs des paramètres d'éclatement à champ nul,  $E$  et  $D$ . Les raies à bas champ seront observables en bande X si  $D$  et  $E$  sont très supérieurs à  $g\beta B$ . L'observation des raies à  $g'=4,3$  et  $6,0$  dépend également du paramètre  $\lambda$ , ratio entre  $E$  et  $D$ . Pour  $\lambda=1/3$ , il est prévu l'observation d'une transition à  $g'=4,3$ . L'observation de ces transitions indique la présence de charge à proximité du fer et peut donner des informations sur la répartition de ces charges. Ainsi les raies à  $g'=4,3$  et  $g'=6,0$  sont respectivement associées à la présence de  $\text{FeO}_2^{2-}$  et de  $\text{FeO}_3^{3-}$ .

Dans les ongles étudiés, seule la raie à  $g'=4,3$  a pu être mise en évidence et ce dans un seul des échantillons (cf. donneur n°1 sur la Figure III.19). Cope et al. (1998), dans leur étude sur la corne de sabots d'équidés (composés de  $\alpha$ -kératine comme les ongles), ont reporté la présence d'une raie à  $g'=4,3$  pour plusieurs échantillons. Cette raie est associée au  $\text{Fe}^{3+}$  dans un état HS en basse symétrie (orthorhombique), sous la forme d'oxyde ( $\text{FeO}_2^{2-}$ ). Cette raie a également été observée dans les produits de dégradation des protéines héminiques<sup>4</sup> (Miki et al., 1985 et 1987). On peut donc penser que la présence de la raie à  $g'=4,3$  dans les ongles est l'indication de traumatismes passés au niveau de la matrice de l'ongle et de l'incorporation de traces de protéines sanguines lors de sa formation.

<sup>4</sup> pour lesquelles le fer est lié à une molécule de porphyrine (hème). L'hémoglobine, la myoglobine sont des protéines héminiques

### Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle

Sur le spectre RPE du donneur n°1, on note également la présence du MIS, qui n'est pas observée sur les autres spectres, ces derniers échantillons ayant été humidifiés. Les effets de l'eau et du temps sur le MIS seront longuement discutés dans le chapitre IV.

Sur la Figure III.19, on peut observer des raies RPE entre  $g=3$  et  $g=2$  sur la moitié des échantillons étudiés. Ces raies ont des caractéristiques très différentes d'un donneur à l'autre, en termes de largeur de raie, de position et d'intensité, on observe également des différences d'un échantillon à l'autre pour un même donneur. Dans la littérature, des raies très larges, avec des valeurs de  $g$  comprises entre 2 et 3, sont également associées à la présence de fer dans des tissus kératinisés (Ikeya, 1993 ; Cope et al, 1998). On peut également en observer dans certains verres (Hassan et al., 2004 et 2005) ou également dans certains polymères contenant des oxydes ferriques (Wejchan-Judek et al., 2005).

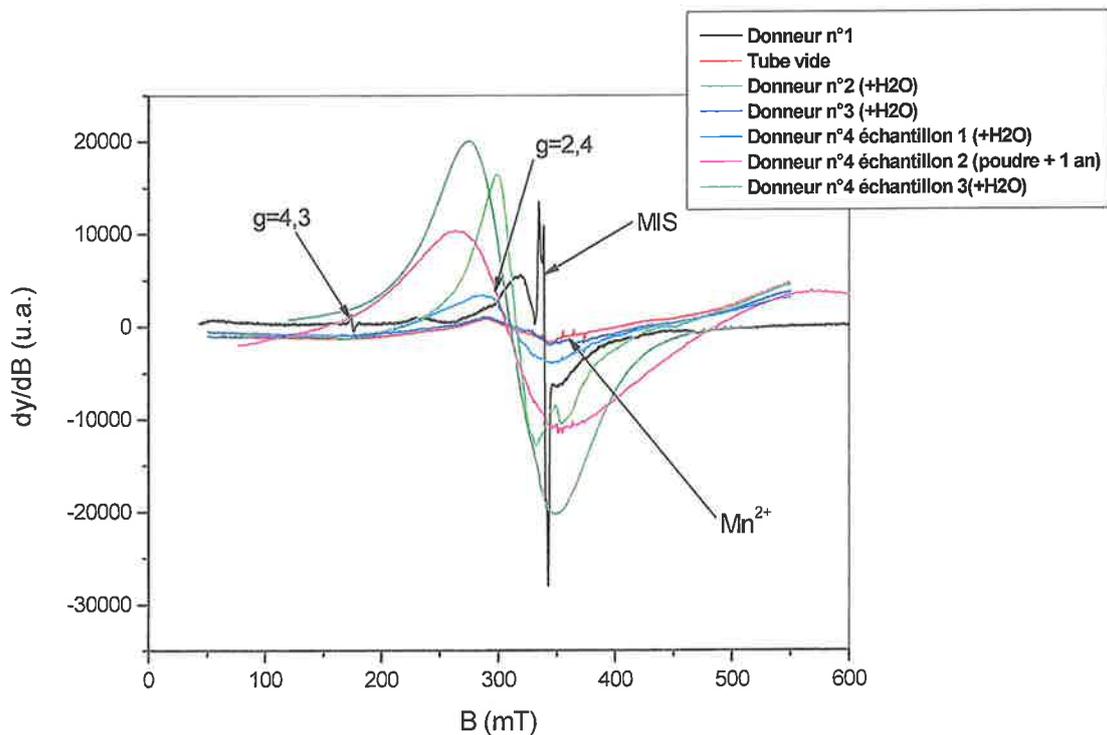


Figure III.19 : Spectres RPE de prélèvements d'ongles provenant de différents donneurs et spectre RPE du tube vide mesurés en bande X à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2mW avec une cavité de type SHQ sur une largeur de champ de 500 mT.

La raie ( $g=2,4$  et  $\Delta B= 80$  mT) mesurée dans l'échantillon 2 du donneur 4, présente les mêmes caractéristiques que le spectre RPE de tissus mous d'une momie pré-inca (Ikea, 1993). Selon Ikea (1993), ce signal serait dû à du fer ( $Fe^{3+}$ ) dans un état de spin bas (BS) contenu dans des complexes de protéines héminique-peroxydes. Néanmoins, que ce soit sur les échantillons d'ongles mesurés dans cette étude ou dans les données de la littérature, les caractéristiques des raies mesurées associées au fer sont très variables. Si l'on postule que l'origine de ces raies est bien liée à la présence de fer, il est fort probable que la forme chimique et l'environnement immédiat peuvent induire des effets significatifs sur la position et la forme

des raies. A ce stade, il est difficile de formuler des hypothèses quant aux formes de fer mises en jeu, mais on peut néanmoins souligner que la présence de fer sous forme d'oxyde  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ( $\text{Fe}^{3+}$ , HS) peut également donner des raies RPE très larges, notamment lorsque les oxydes de fer sont agglomérés sous forme de clusters. Les ongles étant constitués d'un matériau poreux, les oxydes de fer peuvent être incorporés par la simple manipulation de substances en contenant.

La variabilité des caractéristiques spectrales n'est pas uniquement liée aux seules variations de concentration, de formes ou d'environnements chimiques, mais également aux conditions d'acquisition des spectres et notamment au positionnement de l'échantillon dans le champ magnétique. Comme le montre la Figure III.20, l'intensité et la forme du spectre peuvent varier de manière significative selon l'orientation de l'ongle dans le champ magnétique.

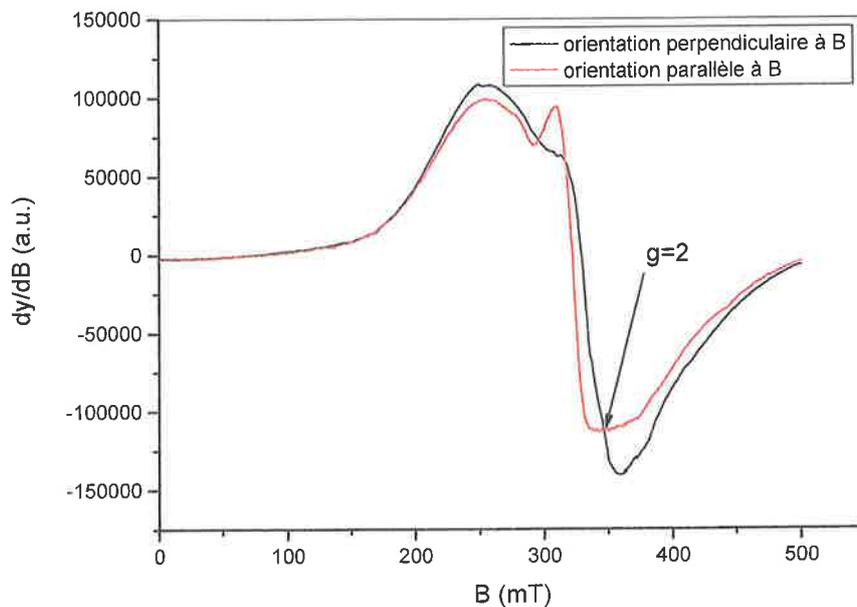


Figure III.20 : Spectres RPE bande X d'un prélèvement d'ongle du donneur 4 mesuré à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2mW selon deux orientations de l'échantillon. La surface de l'ongle est orientée a) perpendiculairement à B (courbe noire), b) parallèlement à B (courbe rouge).

On peut également noter que ce signal présente au moins deux composantes dont les intensités relatives varient avec l'orientation dans le champ magnétique de l'échantillon. D'un point de vue pratique pour les aspects dosimétriques, lorsque les mesures sont réalisées autour de  $g=2$ , une ligne de base caractérisée par une pente importante est induite par la présence de ce signal lorsque l'orientation de la surface de l'échantillon est perpendiculaire au champ magnétique. L'analyse détaillée par RPE des différentes composantes des signaux liés au fer selon différents paramètres (angle, température, puissance micro-onde, etc.) pourrait vraisemblablement permettre de mieux comprendre les différentes formes de fer présentes dans les ongles et par là-même leurs origines ou leurs voies d'incorporation.

*Plusieurs types de signaux mesurés dans les ongles sont attribués à la présence de fer. Les spectres RPE indiquent une présence de  $Fe^{3+}$  sous forme d'oxyde probablement aggloméré sous forme de micro cluster.*

### **B.3.3 Effet de l'irradiation sur les signaux RPE du fer**

Compte tenu de la variabilité observée sur les signaux RPE liés au fer, l'étude du comportement de ces signaux en fonction de la dose de rayonnement délivrée à l'échantillon n'a pas été réalisée de manière détaillée. Pour des doses de rayonnement inférieures à 100 Gy, il n'a pas été mis en évidence de variation de l'intensité du signal. Pour modifier de manière significative l'intensité des signaux RPE liés au fer, il est nécessaire de délivrer aux échantillons des doses très élevées. Ainsi, un échantillon irradié à 2 kGy présentait une diminution significative (d'un facteur 2,5) de l'intensité du signal à  $g=2,4$ . Il faut noter que, dans le cas des verres minéraux, les signaux liés au fer présentent des comportements variés pour des doses relativement élevées. Ils peuvent soit augmenter, soit diminuer apparemment en fonction de la composition du verre. Compte tenu de la versatilité du comportement des signaux du fer et de leur apparente faible sensibilité à la dose, il n'a pas été envisagé d'études plus détaillées pour les aspects dosimétriques.

### **B.3.4 Conclusions et perspectives sur le fer**

Les caractéristiques des signaux RPE liés au fer sont très variables d'un échantillon à l'autre, présentent une forte dépendance en fonction de l'orientation de l'échantillon dans le champ magnétique et ne sont pas affectées par des doses inférieures à 100 Gy. Ces signaux ne présentent pas d'intérêt du point de vue dosimétrique mais peuvent affecter l'analyse des signaux RPE dosimétriques, du fait de leur forte influence sur la ligne de base des spectres RPE autour de  $g=2$ .

Les différentes raies RPE associées au fer permettent d'obtenir des informations quant à sa forme chimique. Il ne semble pas qu'il soit possible d'envisager d'utiliser la RPE pour doser les quantités de fer dans les ongles, les signaux étant trop variés et d'autres techniques, comme le PIXE, XRF, AAS le permettent déjà. Néanmoins la RPE pourrait être une technique intéressante et complémentaire, notamment de la spectroscopie Mössbauer, pour l'étude des différentes formes du fer présentes dans les ongles.

## **B.4 Conclusions générales sur les signaux intrinsèques**

Parmi les signaux intrinsèques à l'ongle nous avons pu mettre en évidence les raies RPE liées à la présence de manganèse et de fer. D'autres éléments présents à l'état de traces (Cu et Ni) sont susceptibles de donner des raies RPE, mais nous n'avons pas été en mesure de les mettre en évidence, du fait des faibles quantités mises en jeu ou parce que les raies associées peuvent être masquées par les raies du fer par exemple. L'objectif initial de cette partie n'était pas de réaliser une étude exhaustive de tous les signaux intrinsèques à l'ongle, nous nous sommes

concentrées sur les raies qui pouvaient éventuellement interférer avec les signaux dosimétriques de l'ongle. Nous avons vérifié l'effet de l'irradiation sur l'amplitude de ces signaux et il s'est avéré que l'amplitude du  $Mn^{2+}$  mesuré en bande Q présentait une dépendance avec la dose. Cette propriété, qui n'avait jamais été reportée à notre connaissance, méritera d'être étudiée plus en détail comme une solution alternative complémentaire pour estimer les doses, car elle pourrait notamment permettre d'estimer des doses dans la gamme de dose de 0 à 10 Gy, gamme dans laquelle l'utilisation de la variation de l'amplitude du RIS atteint actuellement ses limites.

## **C. SIGNAUX RPE PARASITES**

Parmi les principales sources possibles de contamination des ongles par des éléments extérieurs susceptibles de donner des signatures RPE, l'utilisation de vernis de cosmétiques et la tabagie sont celles, si un effet était avéré, qui pourraient limiter le plus l'application des ongles notamment pour le tri de population. Dans cette partie, il s'agit de s'assurer que dans ces deux cas, la présence d'éventuels signaux parasites ne perturbe pas l'analyse du RIS, et dans le cas contraire d'étudier des solutions permettant d'éliminer ou de diminuer la ou les composantes parasites du spectre RPE. Parmi les échantillons étudiés, plusieurs provenaient de donneurs fumeurs réguliers de tabac. Sur ces échantillons, nous n'avons pas mis en évidence de différence dans les spectres mesurés par rapport aux ongles de non fumeurs. Les ongles de fumeurs réguliers sont susceptibles de présenter des concentrations plus élevées, notamment en cadmium, chrome, nickel et fer. Cependant, les variations reportées pour les éléments les plus abondants (>10 ppm) sont inférieures à la reproductibilité des mesures qui ont été réalisées en bande Q (Mehra & Juneja, 2005). Dans le cas des vernis, nous avons identifié certains vernis qui induisent une signature RPE très intense qui se superpose au RIS et qui le rend inexploitable. Cette partie traite donc principalement de l'effet des vernis.

### ***C.1 Problématique liée aux ongles vernis***

Etant donné la large utilisation de vernis (incolores ou colorés), il était important d'étudier leur effet sur le spectre RPE et notamment sur la composante dosimétrique du signal autour de  $g=2$ . Les vernis commerciaux contiennent généralement des durcisseurs et des agents couvrants constitués de résines, des polymères, des plastifiants, des agents émoullissants, des solvants, des pigments minéraux ou organiques et des oxychlorures de bismuth ou de mica pour la brillance. L'effet de ces vernis peut être potentiellement multiple, car il peut jouer sur la dureté de l'ongle, sur la teneur en eau (modification de la porosité), et les pigments (surtout ceux à base d'oxydes métalliques) peuvent notamment induire des signaux RPE additionnels. Dans cette partie, compte tenu de la variété de la composition des vernis utilisés en cosmétique, il ne s'agit pas de présenter de manière exhaustive les différentes signatures RPE de ces cosmétiques et leurs possibles effets sur les propriétés mécaniques et dosimétriques des

ongles, mais d'évaluer si l'application de vernis peut compromettre ou limiter l'utilisation des ongles en dosimétrie. Cette partie se limitera à illustrer par quelques exemples les effets possibles et les éventuels problèmes posés pour la mesure et l'évaluation de l'intensité du RIS. Une étude plus détaillée et de plus grande ampleur pourra être envisagée lorsqu'un protocole de mesure des doses de l'ordre de quelques Gy sur les ongles sera établi pour une éventuelle application pour le tri de population.

### C.2 Présentation des spectres RPE d'ongles vernis

La Figure III.21 présente les spectres RPE de deux prélèvements d'ongles vernis mesurés à température ambiante en bande X dans des conditions similaires d'enregistrement. Ces deux exemples illustrent deux cas de figure bien différents. D'une part, une apparente absence d'effet sur le spectre RPE (vernis n°1), du moins une absence de signaux parasites, et d'autre part une modification complète du spectre RPE (vernis n°2) avec une impossibilité de mesurer autour de  $g=2$  le RIS ou le MIS (Fig. III.21 et III.22). Comme le montre la Figure III.22, le vernis n°2 induit un signal très large ( $\Delta H_{pp}^5 = 240$  mT en bande X) et extrêmement intense, plus intense de plusieurs ordres de grandeur par rapport aux signaux mesurés dans les ongles non vernis.

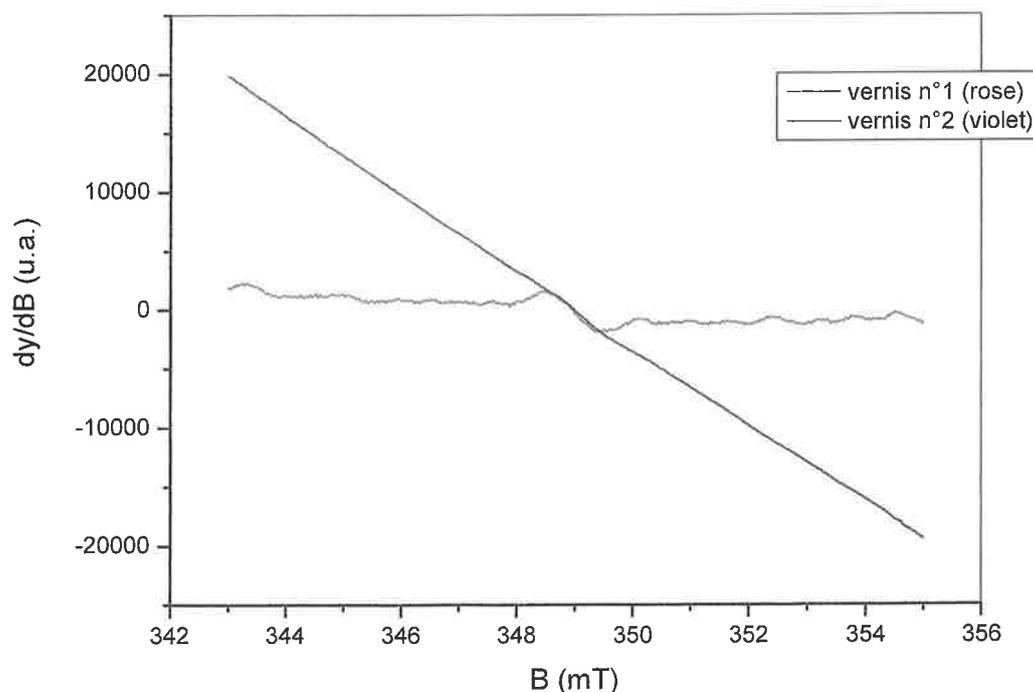


Figure III.21 : Spectres RPE autour de  $g=2$  des ongles vernis (vernis n°1 de couleur rose et vernis n°2 violet), mesurés en bande X à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW.

<sup>5</sup> Largeur d'une raie mesurée entre le maximum et le minimum de la raie

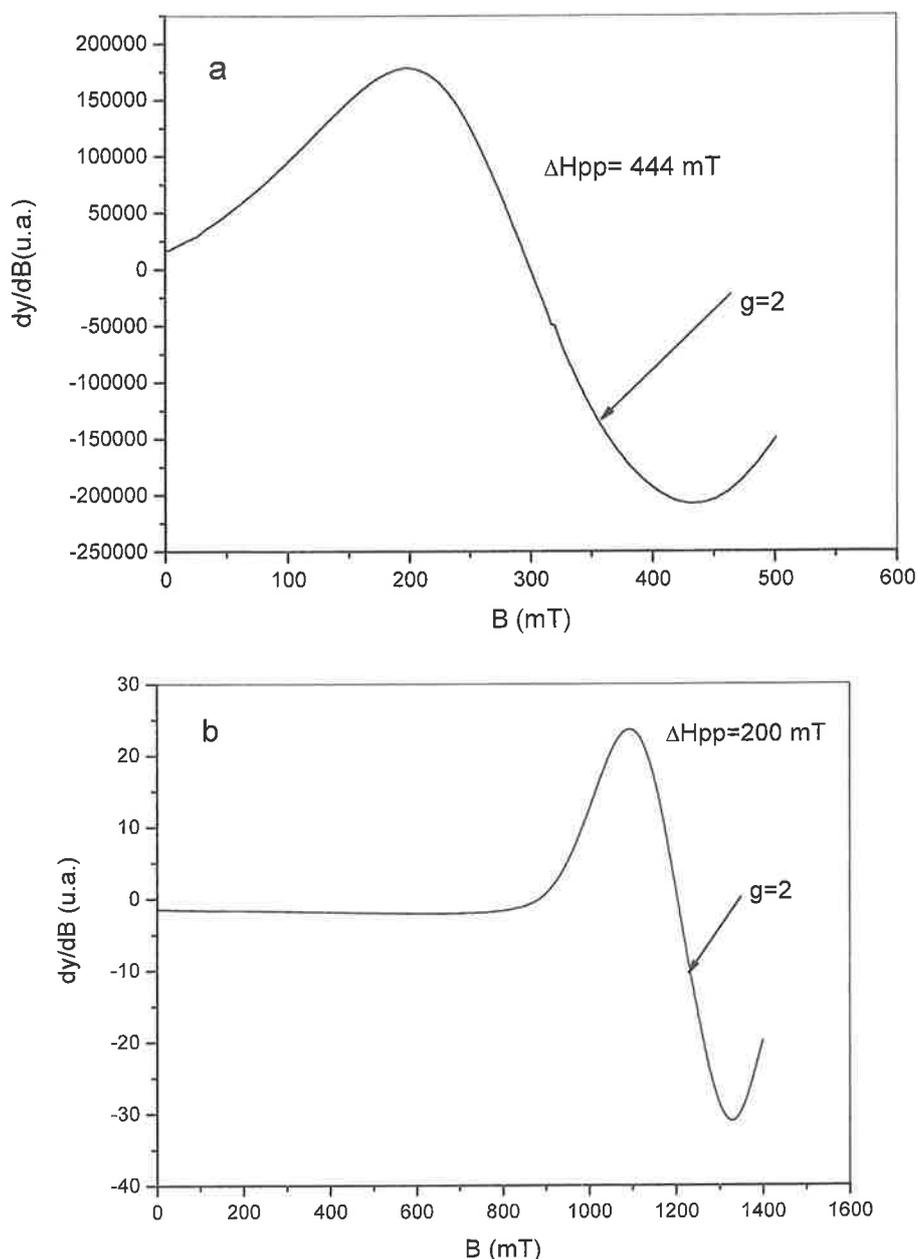


Figure III.22 : spectres RPE d'un prélèvement d'ongle vernis n°2 (violet) mesuré à température ambiante a) en bande X et b) en bande Q, avec une puissance  $\mu$ -onde de 2 mW.

Le vernis n°1 n'entraîne pas de modification notable de l'allure du spectre RPE par rapport à des ongles non vernis, notamment autour de  $g=2$  (Fig. III.21). Si le signal mesuré sur des ongles vernis avec le vernis n°2 et le RIS présentent des caractéristiques spectrales bien différentes, la superposition de ce signal sur le RIS, du fait de son extrême intensité, rend la mesure du RIS, généralement de très faible intensité, extrêmement compliquée voire impossible sans un traitement de la surface des ongles vernis (Fig. III.21). Il n'est pas non plus envisageable d'utiliser les différences de comportement en fonction de la puissance micro-onde, notamment en tirant parti des effets de saturation, car, dans tout le domaine de la puissance micro-onde (0,002-100 mW), le signal lié au vernis reste dominant.

### Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle

Des résonances aussi intenses et aussi larges sont difficilement explicables avec le paramagnétisme classique. Comme le montre la Figure III.23, la valeur de  $g$  change en fonction de l'orientation de l'échantillon dans le champ magnétique ainsi que la largeur de raie (le décalage est d'environ 28 mT entre les deux orientations de l'échantillon dans le champ magnétique).

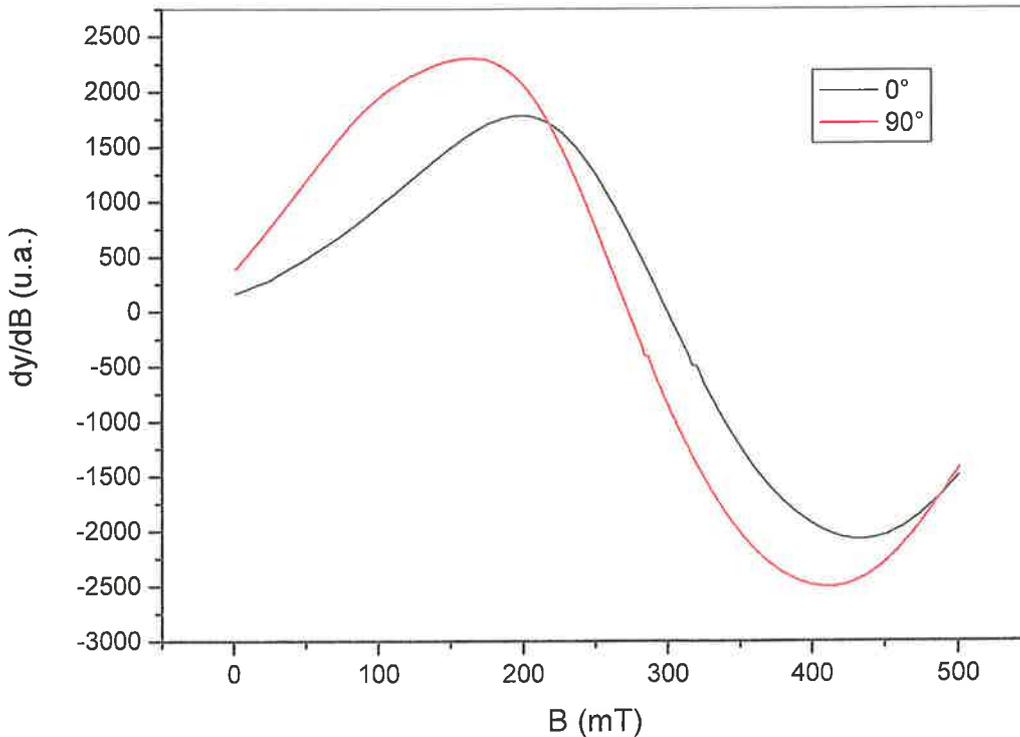


Figure III.23 : Effet de l'orientation de l'échantillon dans le champ magnétique sur le spectre RPE d'une coupe d'ongle (verniss n°2) dont le plan principal est soit orienté parallèlement à  $B$  ( $0^\circ$ ) soit perpendiculairement à  $B$  ( $90^\circ$ ).

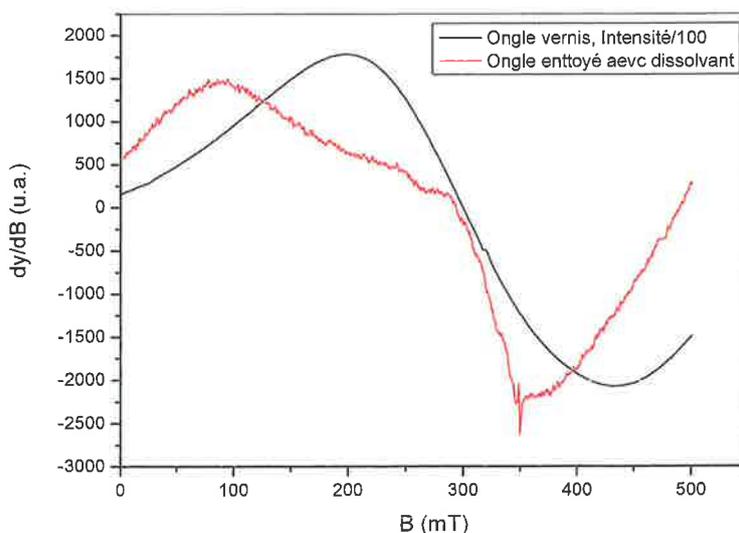
Lorsque l'échantillon est progressivement chauffé (traitement thermique isochrone), on observe une décroissance de la valeur de  $g$  et également de la largeur de raie et une augmentation de l'intensité de la résonance jusqu'à  $160^\circ\text{C}$ . L'ensemble de ces éléments fait penser à de la résonance ferromagnétique et/ou super-paramagnétique. Ces phénomènes peuvent être observés par exemple dans des matériaux diamagnétiques contenant des particules d'oxyde de fer de tailles suffisamment réduites. Dans les vernis de couleur sombre, l'oxyde de fer est utilisé comme pigment sous le nom de « noir de mars ». L'existence de ces phénomènes indique que le vernis n°2 (violet) contient très probablement des particules d'oxyde de fer de très petites dimensions. Des mesures de ces ongles ont été réalisées à basse température (4 K) pour vérifier l'hypothèse du super-paramagnétisme. En dessous de la température de blocage ( $T_B$ ), le phénomène de super-paramagnétisme n'est plus observé. Dans notre cas, les raies sont toujours observées à basse température. Ce résultat ne nous permet pas pour autant d'éliminer complètement l'hypothèse du super-paramagnétisme, il

nous permet juste de proposer que les particules sont très petites et n'induisent pas de transition vers l'état ferromagnétique.

*Les spectres d'ongles vernis peuvent présenter des signaux parasites extrêmement intenses qui empêchent l'observation du signal radio-induit. Ces signaux parasites sont probablement liés à la présence d'oxyde de fer et à des phénomènes conjugués de superparamagnétisme et de résonance ferromagnétique.*

### **C.3 Efficacité et effet de dissolvants sur les composantes RPE parasites des ongles vernis**

Dans ce paragraphe, il s'agit d'aborder l'effet de dissolvants sur les spectres RPE, notamment d'évaluer si l'élimination apparente du vernis permettait l'élimination des signaux parasites sans modifier les caractéristiques du RIS et du MIS. Avant d'envisager d'utiliser les réactifs du laboratoire, nous avons d'abord étudié les capacités de dissolvants pour vernis à ongle vendus dans le commerce. L'effet d'un tel dissolvant est montré sur la Figure III.24. Le dissolvant utilisé (principalement à base d'acétate d'éthyle) permet d'éliminer la composante large du signal dû au vernis n°2 qui masquait le RIS. L'ongle vernis a été trempé 5 minutes dans un dissolvant du commerce et a été mesuré après séchage et sans rinçage supplémentaire. Autour de  $g=2$ , le vernissage puis le nettoyage au dissolvant n'ont pas d'influence sur l'intensité du signal d'intérêt (Fig. III.25). Néanmoins, on peut noter l'apparition de raies parasites de part et d'autres du signal d'intérêt, mais qui ne devrait pas pénaliser l'analyse. Compte tenu des résultats obtenus avec les dissolvants du commerce, il n'a pas été jugé nécessaire à ce stade d'étudier d'autres produits dissolvants.



*Figure III.24 : Effet du dissolvant sur le spectre RPE bande X d'ongle vernis (vernis n°2), spectres mesurés à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW. L'intensité du spectre de l'ongle a été divisée par 100.*

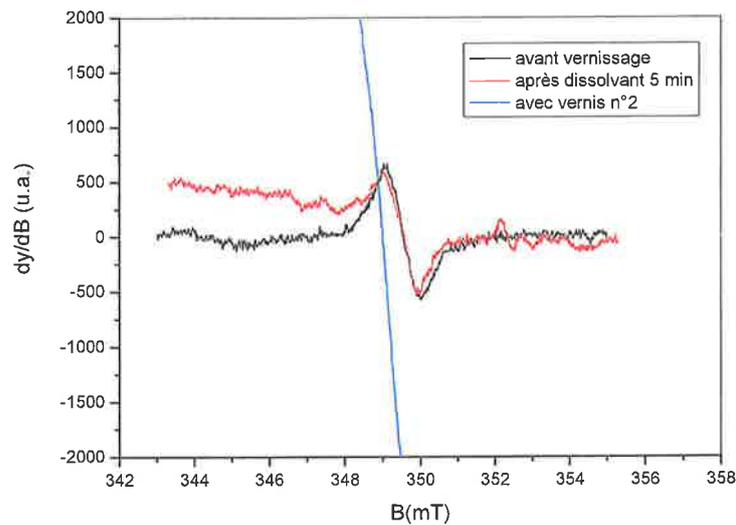


Figure III.25 : Effet du dissolvant sur le spectre RPE bande X autour de  $g=2$ . L'échantillon a été mesuré avant vernissage, avec le vernis n°2 et après nettoyage au solvant (bain de 5 minutes).

*L'utilisation des vernis n'est donc a priori pas rédhibitoire pour l'exploitation du signal dosimétrique. Dans cette étude préliminaire qui n'a pu porter que sur deux types de vernis à ongle, nous avons vu que les vernis pouvaient soit n'avoir aucune incidence sur la mesure du spectre RPE, soit générer des signaux RPE très intenses de nature à empêcher l'analyse des signaux RPE d'intérêt. Dans le deuxième cas, l'utilisation d'un dissolvant permet d'éliminer ce signal parasite sans incidence sur l'analyse des signaux RPE dosimétriques.*

#### **C.4 Conclusions sur les signaux parasites**

Dans l'optique d'une application pour le tri population, les deux principales sources potentielles de contamination des signaux RPE sont liées à la tabagie et à l'utilisation de vernis cosmétique. Les quelques ongles de fumeurs étudiés n'ayant pas révélé de signaux parasites spécifiques, l'étude portant sur l'étude des signaux parasites s'est donc limitée aux vernis cosmétiques. Les vernis donnent des signatures RPE variables qui peuvent parfois rendre impossible la mesure des signaux dosimétriques, mais qui peuvent être a priori éliminés par un traitement chimique adéquat. Si une application pour le tri de population est envisagée, il conviendra d'étudier dans le détail et de manière plus exhaustive, les conséquences du vernissage des ongles. Dans le cadre du travail mené dans cette thèse, il s'agissait de s'assurer que l'application de vernis n'était pas rédhibitoire pour l'application envisagée, ce qui aurait diminué de facto l'attractivité de la RPE pour le tri de population en éliminant de son champ d'application une partie significative de la population.

## D. CONCLUSION GENERALE

Dans cette partie nous avons identifié dans le spectre des ongles des signaux RPE dits intrinsèques induits par des ions métalliques ( $Mn^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ ). L'identification et la description de ces signaux étaient un préalable nécessaire à l'étude des signaux induits par irradiation ou par le stress mécanique. Les connaissances acquises sur ces signaux doivent permettre de mieux prendre en compte leurs contributions lors de l'analyse des signaux radio-induits. Nous avons mis également en évidence que l'application de vernis cosmétique était, selon le type de vernis utilisé, susceptible d'induire des signaux extrêmement intenses. Ces signaux liés à la présence d'oxyde fer et de phénomènes de super-paramagnétisme et de résonance ferromagnétique empêchent toute mesure de résonance paramagnétique. Ces signaux parasites peuvent être éliminés par l'utilisation de dissolvant. L'utilisation des vernis cosmétiques n'est donc pas rédhibitoire pour une application de tri de population, ce qui aurait limité considérablement le champ d'application de la technique RPE.

## E. REFERENCES

- Abragam A. and M. H. L. Pryce (1951) Theory of the Nuclear Hyperfine Structure of Paramagnetic Resonance Spectra in Crystals. *Proc. Roy. Soc. A*, 205, 135-153.
- Ashford N. and Jarke F. (1972) Electron paramagnetic resonance (EPR) investigation of limestones and their calcines and correlation with reactivity with acid gases. Report n° IITRI-C6241-7, US Environmental Protection Agency.
- Barra A.L., Caneshi A., Gatteschi D., Sessoli R., Abbati G.L., Cornia A., and Fabretti A.C. and Uytterhoeven M.G. (1997) Electronic Structure of Manganese(III) Compounds from High-Frequency EPR Spectra. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2329-2331.
- Bernards M.L., Thelen K.D., Penner D., Muthukumar R.B., and McCracken J.L. (2005) Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. *Weed Sc.*, 53, 787-794.
- Bertrand P. (2010) La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique : Fondements, Grenoble sciences, EDP sciences, ISBN 978-2-7598-055549.
- Bennur T.H., Srinivas D., Ratnasamy P. (2001) EPR spectroscopy of copper and manganese complexes encapsulated in zeolites. *Microporous and Mesoporous Mat.*, 48, 111-118.
- Bleaney B. (1951) L. hyperfine in paramagnetic salt and nuclear alignment *Phil. Mag.*, 1942, 441-458.
- Castner T.C., Newell G.S., Holton W.C., Slichter C.P. (1960) Note on the paramagnetic resonance of iron in glass. *J. Chem. Phys.*, 32, 668-673.
- Chandra H. Symons C.R. (1987) Sulphur radicals formed by cutting  $\alpha$ -keratin. *Nature*, 328, 833-834.
- Cope B., Hopegood L., Latham R.J., Linford R.G., Reilly J.D., Symons C.R., Taiwo F.A. (1998) Studies of equid hoof horn material by EPR spectroscopy. *J. Mat. Chem.*, 8, 43-45.

### Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle

- Couper J. (1837) Sur les effets du peroxide de manganèse. *Journal de chimie médicale, de pharmacie et de toxicologie*, 3, 223-225.
- Daly, M.J. (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat. Rev. Micro*, 7, 237-245.
- Hassan G.M., Sharaf M. A., Desouki O.S. (2004) A new ESR dosimeter based on bioglass material. *Radiat. Meas.*, 38, 311-315.
- Hassan G.M. and Sharaf M.A. (2005) ESR dosimetric properties of some biomineral materials. *Appl. Radiat. Isot.*, 62, 375-381.
- Ikeya M. (1993) *New Applications of Electron Spin Resonance: dating, dosimetry and microscopy*. World Scientific Publishing Co., Singapore, New jersey, London, Hong Kong.
- Jackson E.M. (2008) Sunlunugal penetration of dibutyl phtalate in human fingernails. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 21, 10-14.
- Käss H., MacMillan F., Ludwig B. and Prisner T.F. (2000) Investigation of the Mn Binding Site in Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans* by High-Frequency EPR. *J. Phys. Chem. B*, 104, 5362-5371.
- Lacroix R., (1957), Théorie de la résonance paramagnétique de l'euporium et du gadolinium soumis à un champ cristallin cubique. *Helv. Phys. Acta*, 30, 374.
- Matsumura O. (1959). Electron Spin Resonance of Mn-activated Phosphors. *J. Phys. Soc. Jpn*, 14, 108.
- Mehra R. & Juneja M. (2005) Fingernails as biological indices of metal exposure. *J. Biosci.*, 30, 253-257.
- Miki T., Yahagi T., Ikeya M., Sugawara N., Furumo J. (1985). ESR dating of oranic substance: corpse for forensic medicine. *ESR dating and dosimetry*, 440-450.
- Miki T., Kai A., Ikeya M. (1987) Electron spin resonance of bloodstains and its application to the estimation of time after bleeding. *Forensic Sc. Int.*, 35, 149-158.
- Olabanji, S. O., Ajose, O. A., Makinde, N. O., Buoso, M. C., Ceccato, D., De Poli, M. & Moschini, G. (2005) Characterization of human fingernail elements using PIXE technique. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B*, 240(4), 895-907.
- Paschoa A.S., Baptista G.B., Mauricio G.M., Leite C.V.B., Lerner Y.B., Issler P.F. (1984) PIXE analysis of elemental concentrations in human hair and nails. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B* 3, 352-356.
- Polikreti K., Maniatis Y., Bassiakos Y., Kourou N., and Karageorghis V. (2004) Provenance of archeological limestone with EPR spectroscopy: the case of the Cypriote-type statuettes. *J. Arch. Sc.*, 31, 1015-1028.
- Schmidt P., Toft K., Skotland T., Andersson K. (2002) Stability and transmetallation of the magnetic resonance contrast agent MnDPDP measured by EPR. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 7, 241-248.
- Sukumar A., and Subramanian R. (1992) Elements in hair and nails of residents from a village adjacent to New Dehli, influence of place of occupation and smoking habits. *J. Bio Trace Elem. Res.*, 34, 99-105.
- Symons M., Chandra H. & Wyatt J. (1995) Electron paramagnetic resonance spectra of irradiated finger-nails: A possible measure of accidental exposure. *Radiat. Prot. Dosim.*, 58, 11-15.
- Tikhomirova N.N., Nikolaeva I.V., et al. (1972). ESR study of various synthetic cation-exchanged zeolites dehydration under vacuum. *Journal of Catalysis*, 29, 500-506.

### **Chapitre III Etudes des signaux RPE intrinsèques et parasites de l'ongle**

- Title R.S. (1963). Electron Paramagnetic Resonance Spectra of  $\text{Cr}^+$ ,  $\text{Mn}^{++}$ , and  $\text{Fe}^{3+}$  in Cubic ZnS. *Phys. Rev.*, 131, 623.
- Un S. and Sedoud A., (2010) High-field EPR study of the effect of chloride on  $\text{Mn}^{2+}$  ions in frozen aqueous solutions. *Appl. Magn. Res.*, 37, 247-256.
- van Wieringen, J. S. (1955). Paramagnetic resonance of divalent manganese incorporated in various lattices. *Discussions of the Faraday Society*, 19, 118-126.
- Wejchan-Judek M., Hoffman S.K., Goslar J., Garbarsyk J. (2005) The role of Ferric(III) Oxyde in Poly-(1,4-Penylene sulphide) Curing. EPR and X-rays studies. *Acta Physica Polonica A*, 108, 107-112.
- Wolsperger M., Hauser G., Gobler W., Schlagenhafen C., 1994. Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy: influence of sex and smoking habits. *Sci. Total Environ.*, 156, 235-239.
- Yordanov N., Gancheva V., Pelova V. (1999) Studies on some materials suitable for use as internal standards in high energy EPR dosimetry. *J.l of Radioanalytical Nucl.r Chem.*, 240, 619-622.
- Yordanov N.D. and Aleksieva K. (2004) X- and Q-band EPR studies on fine powders of irradiated plants. New approach for detection of their radiation history by using Q-band EPR spectrometry. *Radiat. Phys. Chem.*, 69, 59-64.



## *Chapitre IV*

# *Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles*

A.	Introduction .....	149
B.	Etude et description des différentes composantes du MIS .....	149
B.1	Mise en évidence des principales composantes du MIS .....	149
B.2	Etude et description du MIS1 .....	155
B.3	Etude et description du MIS3 .....	177
B.4	Etude et description du MIS4 .....	181
B.5	Etude et description de la composante isotrope autour de $g=2$ .....	186
B.6	Processus de formation des différents composantes du MIS .....	201
C.	Conclusions et perspectives sur les effets du stress mécanique .....	205
D.	Références .....	206



## **A. INTRODUCTION**

Pour la plupart des matériaux utilisés en dosimétrie RPE, les signaux induits par le stress mécanique sont généralement de faible intensité et à vie courte et ne sont donc généralement pas étudiés. Ils ne présentent généralement pas d'enjeu majeur pour l'estimation des doses. Dans le cas des ongles, le MIS a été, dès les premières tentatives d'utiliser les ongles en dosimétrie, identifié comme un point bloquant dans le développement d'une méthodologie d'estimation des doses. En plus de la relativement faible intensité des signaux radio-induits dans la gamme de dose visée par l'application de tri de population, le MIS rend en effet encore plus délicate les mesures dosimétriques en venant se superposer aux signaux radio-induits avec des intensités du même ordre de grandeur. C'est pourquoi, d'un point de vue méthodologique, il était nécessaire, préalablement à l'étude du RIS, de développer une bonne compréhension de la mécano-chimie des ongles et des signaux RPE associés. Lorsque ce travail de thèse a débuté, peu de données étaient disponibles sur la mécano-chimie des ongles. Comme nous le verrons dans ce chapitre, le MIS est beaucoup plus complexe que ce qui ressort des premières descriptions qui en ont été données. Les différentes composantes qui ont été identifiées dans ce travail présentent notamment des comportements variés particulièrement du point de vue de leur stabilité. Dans cette partie, il s'agissait dans un premier temps d'identifier et de caractériser les différentes composantes du MIS et de préciser, si possible, la nature des radicaux associés et leur(s) mode(s) de formation. Il s'agissait également de déterminer la nature du « BG » tel que défini par Symons et al. (1995), rien n'excluant qu'il ne soit pas également induit par le stress mécanique. Dans un deuxième temps, il s'agissait de mettre en évidence les paramètres ayant une influence tant sur la formation du MIS que sur la stabilité de ses différentes composantes. L'influence de ces différents paramètres a été étudiée de manière détaillée afin de pouvoir par la suite définir les conditions optimales de prélèvement, de stockage et de mesure permettant de limiter ou d'éliminer le MIS.

## **B. ETUDE ET DESCRIPTION DES DIFFERENTES COMPOSANTES DU MIS**

Dans ce paragraphe, préalablement à l'étude détaillée de chacune des différents composantes du MIS à l'aide d'expériences très simples, nous mettons en évidence l'origine mécanique des différents signaux identifiés comme faisant partie du MIS.

### ***B.1 Mise en évidence des principales composantes du MIS***

La Figure IV.1 présente des spectres RPE mesurés à température ambiante en bande X après deux coupes réalisées sur un même échantillon d'ongle à 24 heures d'intervalle. Sur les deux spectres RPE mesurés cinq minutes après coupe de l'ongle, on note la présence d'une

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

structure complexe avec une composante à forte anisotropie de facteur  $g$  ( $g_1=2,055$  ;  $g_2=2,025$  ;  $g_3=1,998$ ) ainsi qu'une raie composite autour de  $g=2$ , tel que l'avait déjà décrit Chandra & Symons (1987).

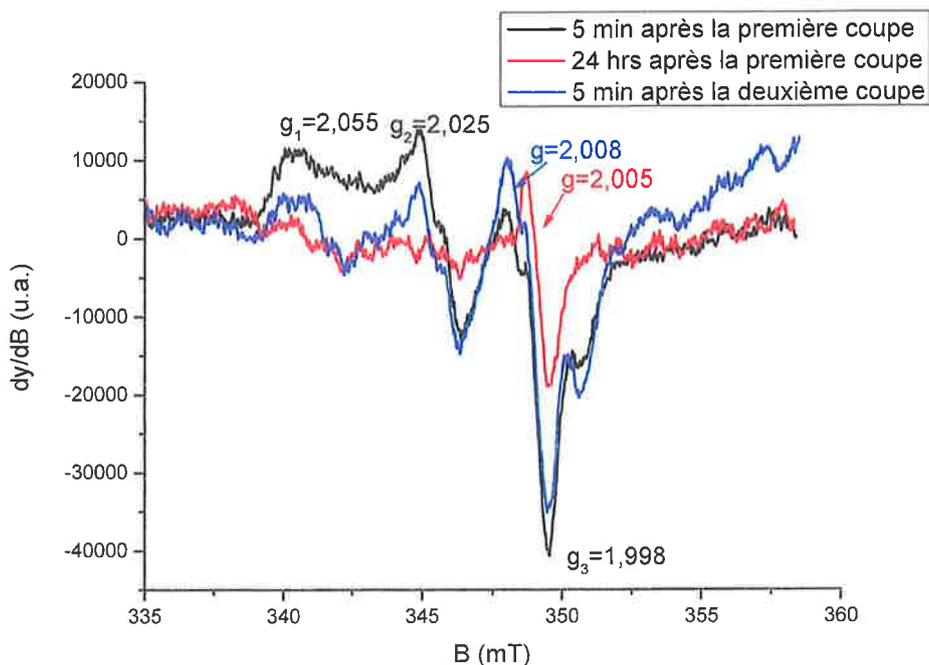


Figure IV.1 : Spectre RPE d'un ongle coupé mesuré en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW immédiatement après coupe de l'ongle, après un délai de 24 heures et après une troisième coupe.

La composante avec une forte anisotropie de facteur  $g$  présente les caractéristiques spectrales similaires à celles reportées par Chandra & Symons (1987). Cette composante est ici dénommée **MIS1**, pour reprendre la nomenclature des articles récemment publiés sur le sujet. Comme on peut le noter sur la Figure IV.1, le MIS1 est instable à température ambiante et décroît complètement après prélèvement dans un délai de 24 heures à température ambiante. Cette observation est a priori contradictoire à celle de Symons et al. (1995), pour lesquels le MIS1 était stable à température ambiante, mais pouvait être éliminé par un chauffage à une température supérieure à 45°C. Après décroissance complète du MIS1 et lorsque l'échantillon est à nouveau recoupé, un spectre RPE identique à celui initialement mesuré après la première coupe est observé. Ceci confirme bien que le MIS1 est généré par une réaction de mécano-chimie et qu'il ne s'agit pas d'un signal intrinsèque à l'ongle. Chandra & Symons (1987) ont postulé que le signal observé autour de  $g=2$  et le MIS1 correspondait en fait à deux composantes distinctes du MIS. En effet, une structure à forte anisotropie telle que celle du MIS1 est caractéristique de radicaux soufrés alors que les signaux présents autour de  $g=2$  sont généralement caractéristiques de radicaux carbonés ou oxygénés. Généralement les radicaux soufrés ont des temps de relaxation bien plus courts, ce qui permet de les mesurer sans problème de saturation du signal à forte puissance micro-onde, alors que les signaux des radicaux carbonés ou oxygénés sont déjà saturés. Ainsi, dans notre cas, une variation

importante de la puissance micro-onde lors de l'enregistrement du spectre devrait permettre de mettre en évidence la différence de nature des espèces radicalaires du MIS1 et des signaux autour de  $g=2$ . La Figure IV.2 présente des spectres RPE mesurés en bande Q à différentes valeurs de puissance micro-onde. A forte puissance micro-onde, comme attendu, c'est le MIS1 qui domine le spectre RPE, les composantes autour de  $g=2$  étant saturées. A faible puissance ( $< 1$  mW), ce sont les composantes autour de  $g=2$  qui dominent le spectre. Ceci confirme bien que ces deux composantes principales sont de natures différentes.

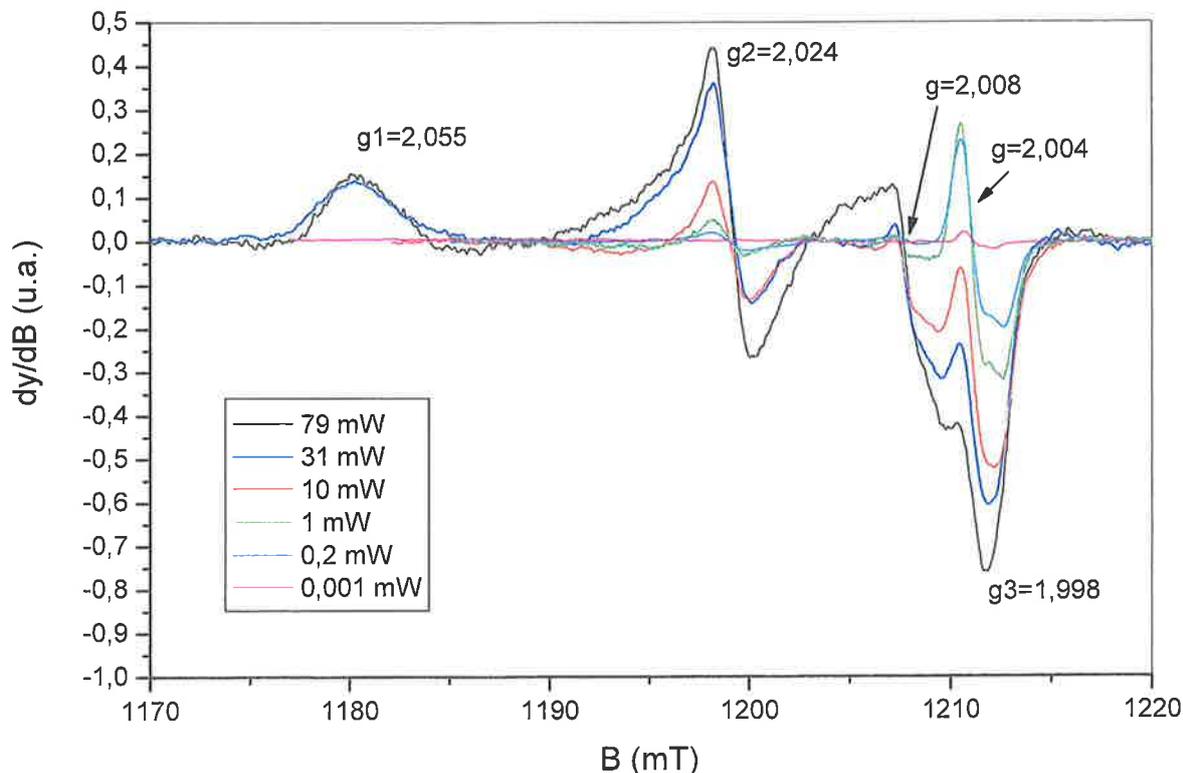


Figure IV.2 : Spectres RPE d'ongle stressé mécaniquement mesuré en bande Q et à température ambiante pour différentes valeurs de puissance micro-onde.

Si l'on compare les spectres RPE présentés sur la Figure IV.1 et ceux de la Figure IV.2, on peut noter des différences notables au niveau des signaux mesurés à  $g=2,008$  et  $g=2,004$ , notamment en termes d'amplitude en fonction du temps écoulé ou de la puissance micro-onde. Ces différences nous indiquent qu'il s'agit probablement de signaux induits par des radicaux de natures différentes. Une telle variabilité des rapports d'amplitude peut s'expliquer soit par des taux de réaction de production variables d'un ongle à l'autre, soit par l'instabilité d'une des composantes ou par des temps de demi-vie différents si les deux composantes sont instables. Comme le montre la Figure IV.3, ces deux composantes ne sont pas stables à température ambiante. De la même manière que pour le MIS1, ces données sont en apparente contradiction avec celles reportées dans la littérature, mais dans les parties suivantes nous montrerons que l'influence des conditions expérimentales peut induire de telles différences de comportement tant pour le MIS1 que pour les composantes autour de  $g=2$ . Sur la Figure IV.3,

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

on peut noter que la composante du signal à  $g=2,008$  décroît très rapidement. Après un délai après coupe inférieur à 1 heure, celle-ci n'est plus observable, alors que le temps de demi-vie de la composante instable à  $g=2,004$  a été estimé pour ces données à  $0,7 \pm 0,1$  heures (Fig. IV.4).

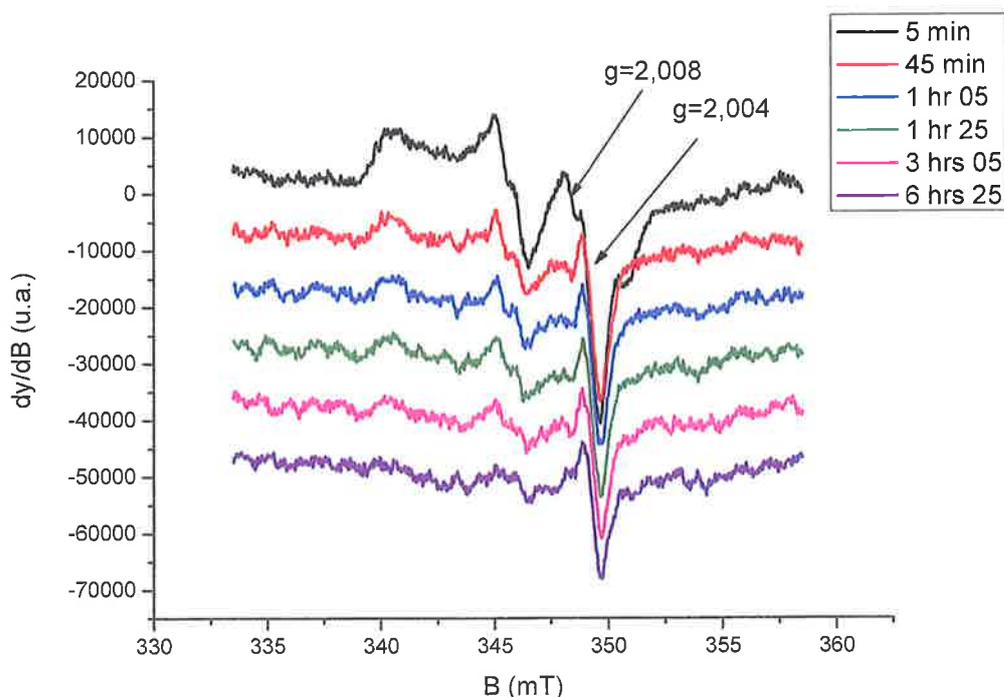


Figure IV.3 : Evolution du spectre RPE d'un ongle coupé en fonction du temps écoulé après la première coupe, mesure réalisée en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW.

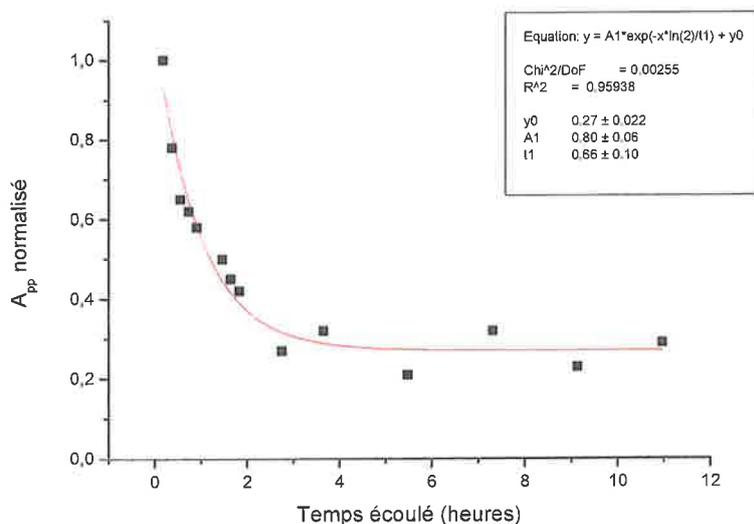
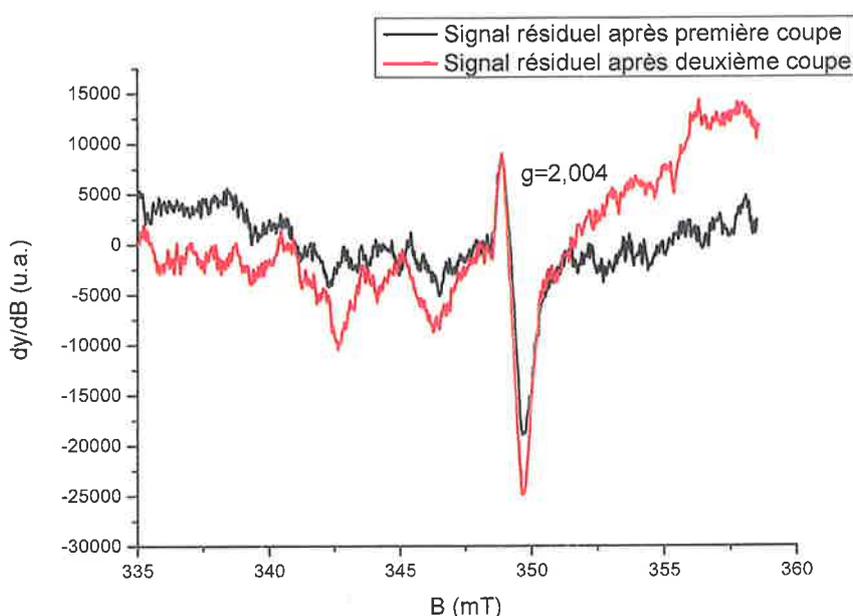


Figure IV.4 : Décroissance de la composante à  $g=2,004$  mesurée à température ambiante en bande X sur des ongles prélevés moins de dix minutes avant la mesure. L'intensité du signal a été mesurée en quadrature de phase pour s'affranchir de la composante  $g_3$  du MIS1.

Ces deux composantes sont donc bien liées à des radicaux de nature différente. La composante à  $g=2,004$  est nommée par la suite **MIS2** et celle à  $g=2,008$ , **MIS4**.

Il est intéressant de noter que les caractéristiques du MIS2 ( $g=2,004$  et  $\Delta H_{pp} = 0,8$  mT) sont identiques à celles du signal résiduel mesuré après décroissance de toutes les composantes instables à température ambiante (Fig. IV.1). Ce signal résiduel mesuré avait été nommé « BG » (pour Background) par Symons et al. (1995). Si l'on mesure ce signal résiduel après une première coupe et après une deuxième coupe, on note une augmentation de l'intensité du signal résiduel (Fig. IV.5). Cette expérience montre que le « BG » n'est donc pas un signal purement intrinsèque et qu'une composante significative de ce signal est en fait induite par le stress mécanique. C'est pourquoi l'étude de ce signal est abordée dans ce chapitre.



*Figure IV.5 : Comparaison des spectres RPE mesuré en bande X à température ambiante, 6 heures après la première coupe et 6 heures après une deuxième coupe.*

Le **MIS3** correspond à un signal très instable et qui peut être facilement mis en évidence sur des ongles ayant subi une coupe multiple comme le montre la Figure IV.6. Après une simple coupe le MIS3 est présent mais est masqué par le MIS2 (Fig. IV.1). Le MIS3 est constitué d'un doublet ( $g=2,004$  et  $a_H = 2,0$  mT). La présence de ce signal dans les ongles stressés mécaniquement n'avait pas encore été mise en évidence.

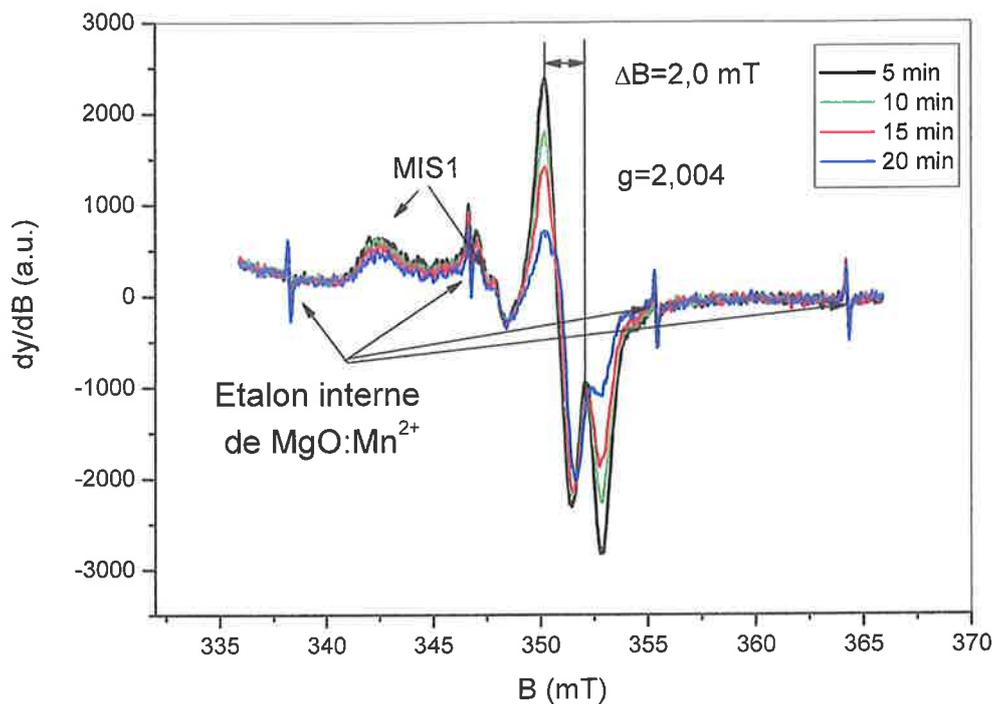


Figure IV.6 : Evolution du spectre RPE d'un ongle en fonction du temps écoulé après coupe multiple. Mesure réalisée en bande X à température ambiante avec une puissance micro-onde de 2 mW.

Dans les parties suivantes, nous présenterons dans un premier temps les études dédiées aux composantes les plus instables du MIS (MIS1, MIS3 et MIS4) qui au final ne présentent pas d'inconvénient par rapport aux signaux dosimétriques utilisés. Les singlets (MIS2 et « BG »), parce qu'ils se superposent aux signaux dosimétriques dans la gamme des doses d'intérêt (0-100 Gy) feront l'objet d'une étude plus détaillée, notamment dans la perspective de développer une méthode d'analyse permettant de s'affranchir de leur présence lors de l'évaluation des signaux dosimétriques.

*Dans les mesures RPE d'ongles effectués après prélèvement, cinq composantes ont été identifiées comme induites par le stress mécanique lors du prélèvement. Trois composantes principales sont facilement identifiables dans le spectre du MIS. En plus du MIS1 préalablement identifié dans la littérature (spectre de poudre avec une forte anisotropie de facteur  $g_3 = 2,055$  ;  $g_2 = 2,024$  ;  $g_1 = 1,998$ ), nous avons mis en évidence trois autres composantes instables à température ambiante et liées au stress mécanique, le MIS2 (singlet,  $g = 2,004$ ), le MIS3 (doublet,  $g = 2,004$ ) et le MIS4 ( $g_1 = 2,025$ ,  $g_2 = 2,008$  et  $g_3 = 2,0027$ ). Nous avons mis également en évidence que le stress mécanique est probablement l'une des origines du « BG » tel que défini dans la littérature.*

## B.2 Etude et description du MIS1

Au début de ce travail, les seules études concernant les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles auxquelles nous pouvions nous référer étaient celles publiées par l'équipe de Symons (Chandra & Symons, 1987, Symons et al., 1995). Cependant, des signatures spectrales similaires à celle du MIS1, avec des valeurs de  $g$  très proches, ont été mises en évidence dans des ongles irradiés à très forte dose (Gordy, 1955) et également dans des protéines contenant de la cystéine ou encore dans la cystine (Fig. IV.7). La cystine est constituée de deux groupements de cystéine liés par un pont disulfure. Dans ces études, ce type de spectre est généralement associé à la présence de radicaux soufrés.

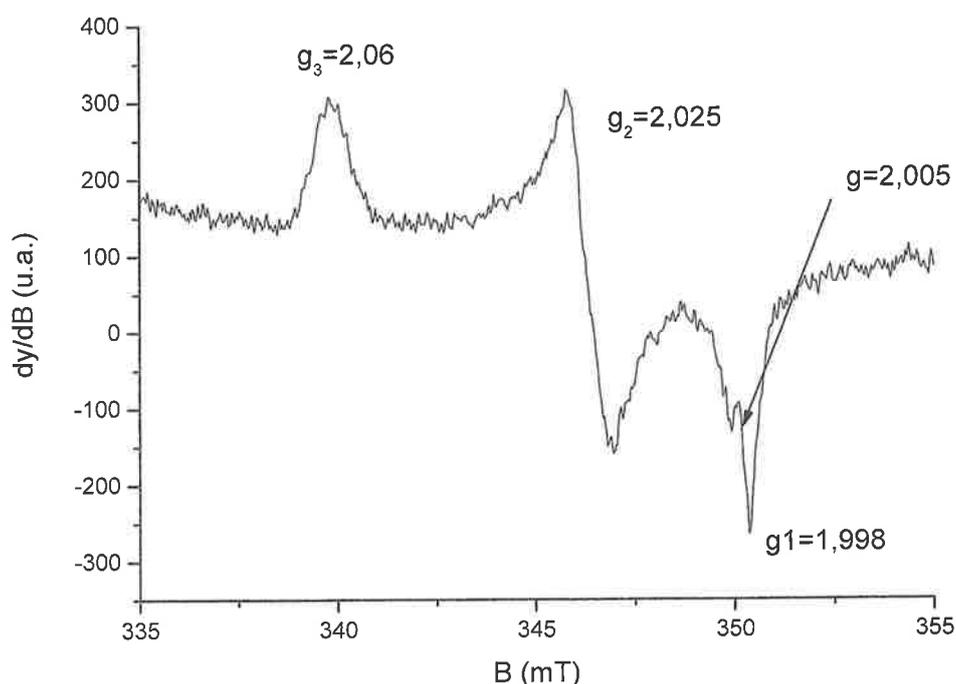
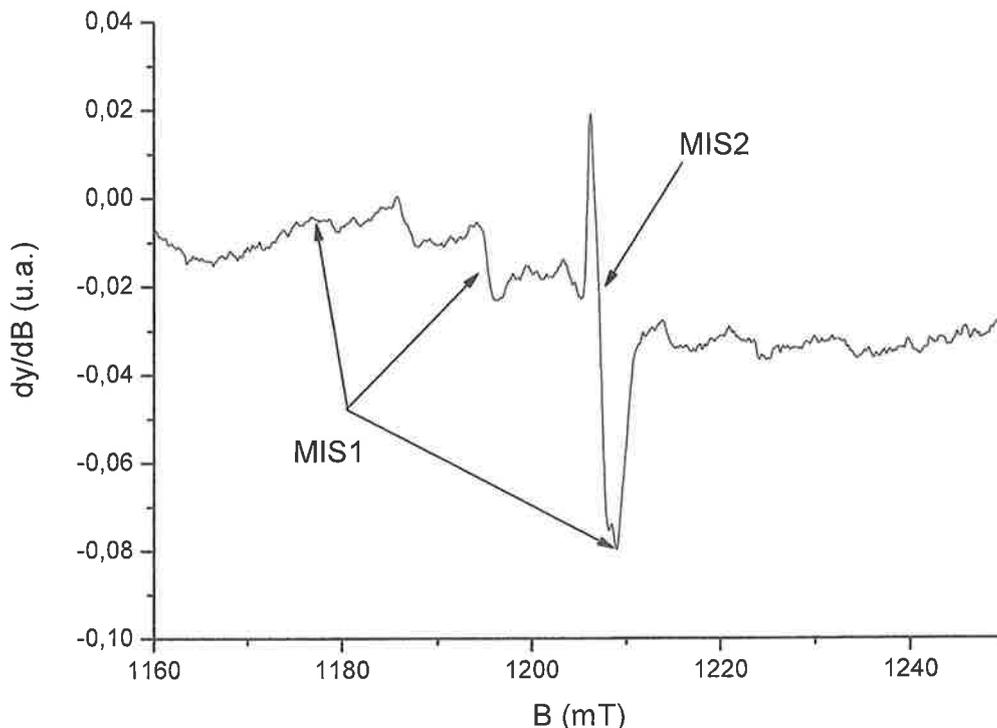


Figure IV.7 : Spectre RPE de cystine irradiée à 20 Gy mesuré en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 20 mW.

La dégradation mécanique de tissus kératinisés par broyage, telles que la soie (Gasymov et al., 1992) et la laine (Windle & Wiersema, 1964) a été étudiée par RPE. Plusieurs signaux liés au stress mécanique ont été identifiés, mais aucun ne présentait les caractéristiques du MIS1, du moins dans les conditions expérimentales des études présentées. Nous avons mesuré par RPE, après simple coupe, de la laine, de la soie et des plumes d'oiseaux (constitués de  $\beta$ -kératine) sans observer un signal induit mécaniquement. De ce point de vue, les ongles semblent donc très singuliers parmi tous les composés ou matériaux contenant de la kératine. Si des radicaux soufrés sont mesurés après broyage, par exemple dans la soie (Windle & Wiersema, 1964), ce n'est pas le cas après coupe. Les propriétés des ongles humains semblent être extrapolables à

leur équivalent chez les autres mammifères, comme la corne de sabot (Cope et al., 2008) ou les griffes (Fig. IV.8) et très probablement d'autres types d'exosquelette kératinisés telles que les cornes.



*Figure IV.8 : Spectres RPE mesurés en bande Q à température ambiante de griffes de rats coupés à température ambiante.*

Ainsi, pour l'identification de l'espèce radicalaire à l'origine du MIS1, nous nous sommes principalement référés à la littérature dédiée à l'étude des protéines et acides aminés irradiés et aux quelques articles relatifs aux matériaux kératinisés irradiés (laine, soie, etc.), parce que les caractéristiques spectrales des signaux radio-induits dans ces matériaux étaient très proches de celles du MIS1, bien que le processus de production soit initié de manière différente. Sur cette base, nous discuterons dans le détail par la suite les différents types de radicaux envisagés pour le MIS1. Dans le cas des ongles, c'est la rupture des ponts disulfures entre les groupements de cystéine adjacents qui a été proposée comme origine la plus probable des processus menant à la production des espèces radicalaires soufrées induisant le MIS1 (Chandra & Symons, 1987).

Mais avant de pouvoir étudier dans le détail les différentes propriétés du MIS1, il a été nécessaire de mettre au point une méthodologie permettant d'isoler cette composante des autres composantes du MIS, notamment le MIS2, les MIS3 et MIS4 décroissant rapidement.

### **B.2.1 Mesure sélective du MIS1**

Comme nous l'avons vu précédemment, le MIS1 et le MIS2 présentent du fait de la nature différente des radicaux associés, des comportements vis-à-vis de la puissance micro-onde

différenciés ; ceci peut être utilisé pour mesurer de manière sélective l'une ou l'autre composante. La Figure IV.9 présente la variation de l'amplitude pic à pic ( $A_{pp}$ ) pour le MIS1 et le MIS2 en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde pour des mesures réalisées en bande X. Pour le MIS1, on note que l'intensité du signal augmente linéairement avec la racine carrée de la puissance sur la gamme de puissance étudiée. Un phénomène de saturation de l'amplitude du MIS2 est observé à faible puissance micro-onde ( $> 1$  mW). Il en résulte que le MIS1 domine le spectre RPE du MIS à forte puissance. A faible puissance, seules les composantes du MIS autour de  $g=2$ , dans notre cas le MIS2, sont mesurées.

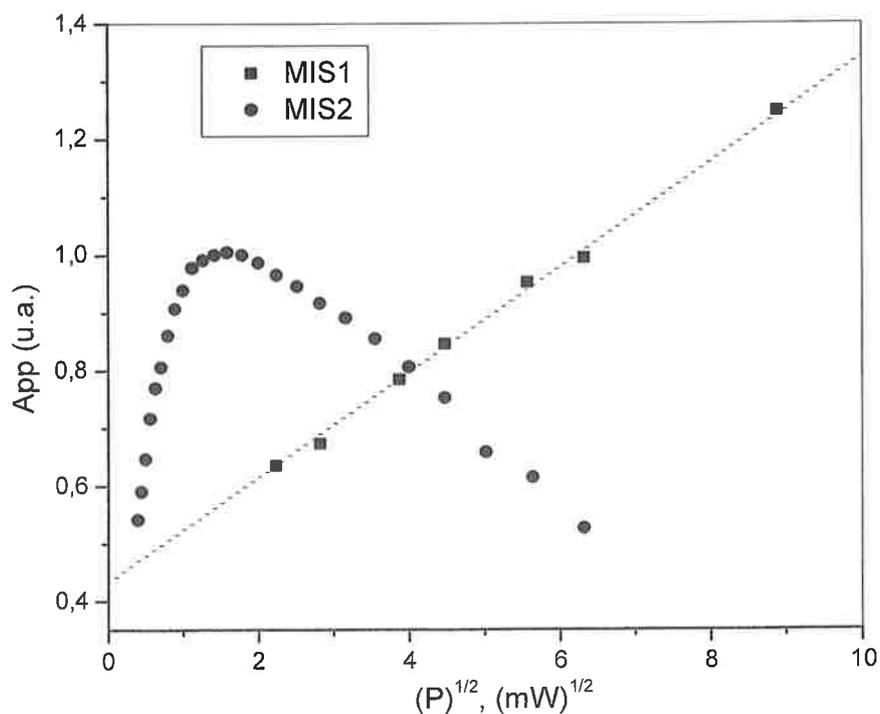


Figure IV.9 : Variation de l'amplitude pic à pic du MIS1 et des composantes du MIS autour de  $g=2$  en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde mesurée en bande X avec la cavité haute sensibilité (Courbe publiée dans Reyes et al. 2008 dans le cadre de la collaboration avec USUHS).

L'allure de ces courbes nous renseigne également sur le type de raie RPE (homogène ou inhomogène). La courbe du MIS2, avec un passage par un maximum, puis une décroissance de l'intensité, est indicative d'une raie de type homogène. Ce type de courbe est mesuré par exemple avec le DPPH, échantillon de référence, dont la raie est connue pour être homogène. Cela nous donne également des indications sur les temps de relaxation associés à ces différentes espèces. Les temps de relaxation du MIS1 sont donc plus courts que ceux des différentes composantes du MIS autour de  $g=2$ . Les temps de relaxation associés à ces espèces ont été mesurés par RPE pulsée (méthode dite d'inversion récupération pour  $T_1$  et à écho de spin pour  $T_2$ ) à basse température (20 K). Les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  associés au MIS1 sont de 2,5 et 0,027  $\mu$ s, et de 21 et 0,3  $\mu$ s pour la composante autour de  $g=2$  principalement constituée du MIS2.

#### Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

Pour obtenir uniquement le spectre RPE du MIS1, compte tenu du comportement différencié du MIS1 et des autres composantes du MIS vis-à-vis de la puissance micro-onde, nous avons appliqué la méthode développée par Ignatiev et al. (1996) pour séparer les différentes composantes du signal RPE de l'émail dentaire (Fig. IV.10). Il s'agit de soustraire au spectre enregistré avec une forte puissance micro-onde un spectre mesuré à plus faible puissance. Comme on peut le noter sur la Figure IV.9, il est possible pour deux valeurs de puissance micro-onde très différentes (1 et 16 mW), d'avoir une même amplitude du signal à  $g=2,005$ . Ainsi, en soustrayant au spectre mesuré à forte puissance le spectre mesuré à faible puissance on obtient le spectre RPE correspondant au MIS1. Cette technique permet d'obtenir simplement le spectre RPE du MIS1. A puissance maximale, si le MIS1 domine complètement le spectre RPE mesuré, les effets d'élargissements des raies ne permettent pas d'obtenir un spectre RPE aussi bien défini, et la ligne de base peut être affectée du fait de la présence de signaux parasites qui apparaissent à ces fortes puissances, tels ceux liés à la présence de l'ion  $Fe^{3+}$  (chapitre III). Les mesures réalisées à 1 et 16 mW constituent le meilleur compromis. Cette technique n'a pas pu être appliquée en bande Q, car à cette fréquence il est difficile de coupler de manière critique la cavité au pont hyperfréquence, ce qui ne permet pas de mesurer l'échantillon à différentes puissances avec le même facteur de qualité.

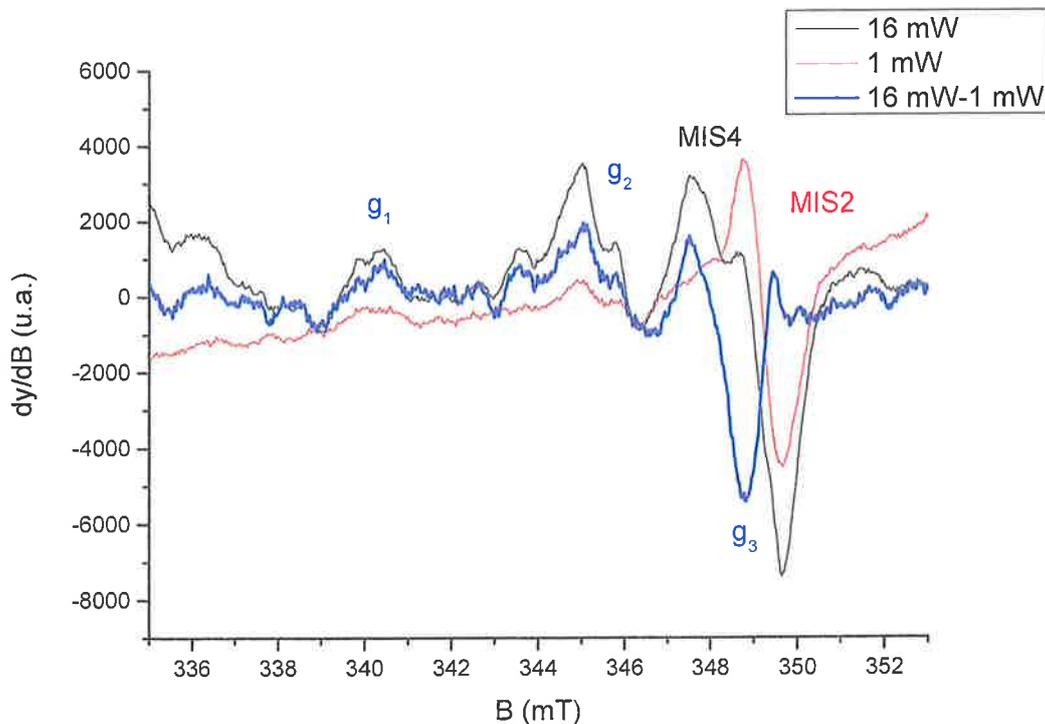
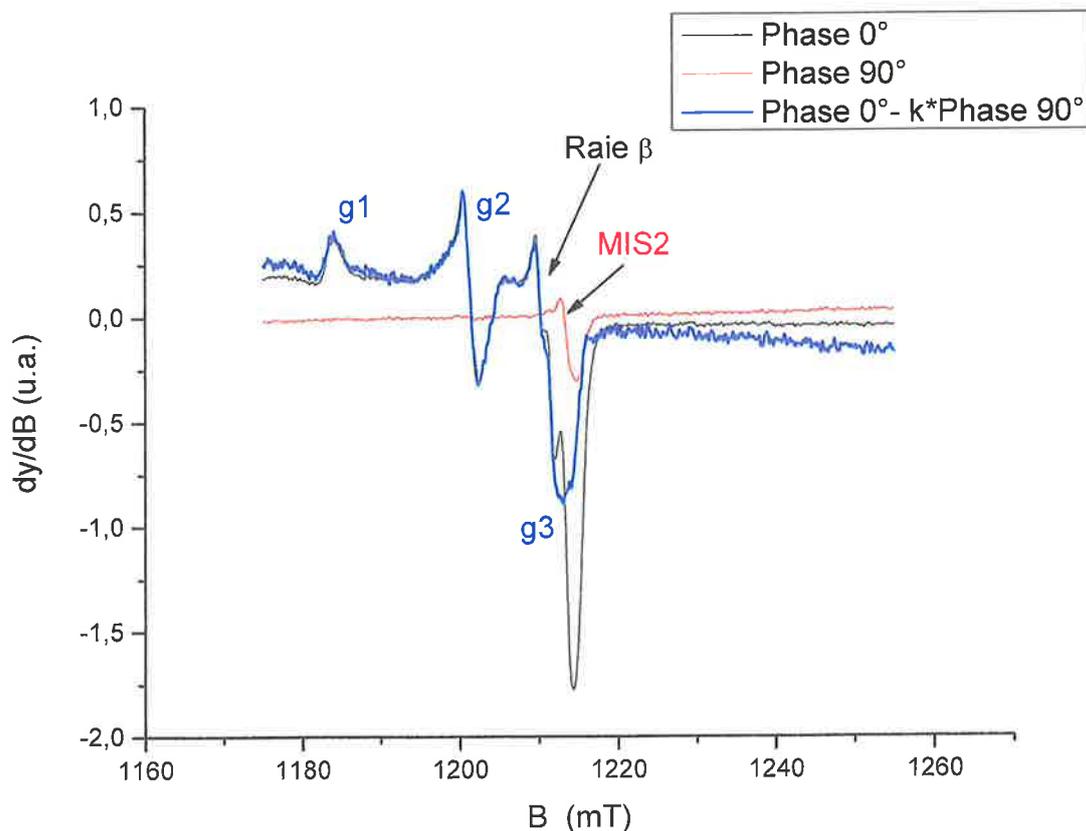


Figure IV.10 : Isolation de la composante MIS1 par la méthode d'Ignatiev et al. (1996).

Nous avons également utilisé au cours de cette étude une autre méthode pour mesurer de manière sélective les composantes du spectre en fonction de leurs temps de relaxation. En

réalisant des mesures en quadrature de phase avec la modulation, il est possible de ne détecter que les signaux des espèces paramagnétiques possédant des temps de relaxation suffisamment longs. Compte tenu des temps de relaxation mesurés avec la RPE pulsée, il est ainsi a priori possible de sélectionner les composantes du MIS autour de  $g=2$  en réalisant une mesure en quadrature de phase. La Figure IV.11 présente l'application de cette technique à des spectres RPE mesurés en bande Q. Ce principe a déjà été utilisé par exemple pour mesurer les centres E' dans des verres ou du charbon (Ikeya, 1993). Nous utiliserons ultérieurement cette technique lors de la réalisation des courbes de traitement thermiques isochrones et isothermales du MIS1 et des composantes autour de  $g=2$ , ou de l'étude détaillée des paramètres influant sur l'intensité du MIS.



*Figure IV.11 : Spectres RPE d'un prélèvement d'ongle fraisé mesuré en bande Q à 10 mW avec des phases respectivement égales à 0° et 90° et une fréquence de modulation de 100 kHz.*

### **B.2.2 Description générale du spectre RPE du MIS1**

Si en bande X comme en bande Q, la structure générale de spectre de poudre est parfaitement identifiée avec  $g_1=2,055$ ,  $g_2=2,024$  et  $g_3=1,998$ , il y a cependant une différence notable entre les spectres mesurés à température ambiante à ces deux fréquences.

En bande X, la composante  $g_2$  présente un dédoublement, qui est très bien mis en évidence par des mesures réalisées en deuxième harmonique (Fig. IV.12). Sur la Figure IV.12, le  $\Delta B$

#### Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

entre les deux raies de la composante  $g_2$  estimé sur le spectre RPE mesuré en deuxième harmonique vaut 0,8 mT. Ce dédoublement a été également reporté par Chandra & Symons (1987) avec une valeur proche (0,85 mT) et il est également présent dans un certain nombre de protéines irradiées présentant le même type de spectre RPE comme la BSA<sup>1</sup> ou la ribonucléase par exemple (Henriksen et al., 1963).

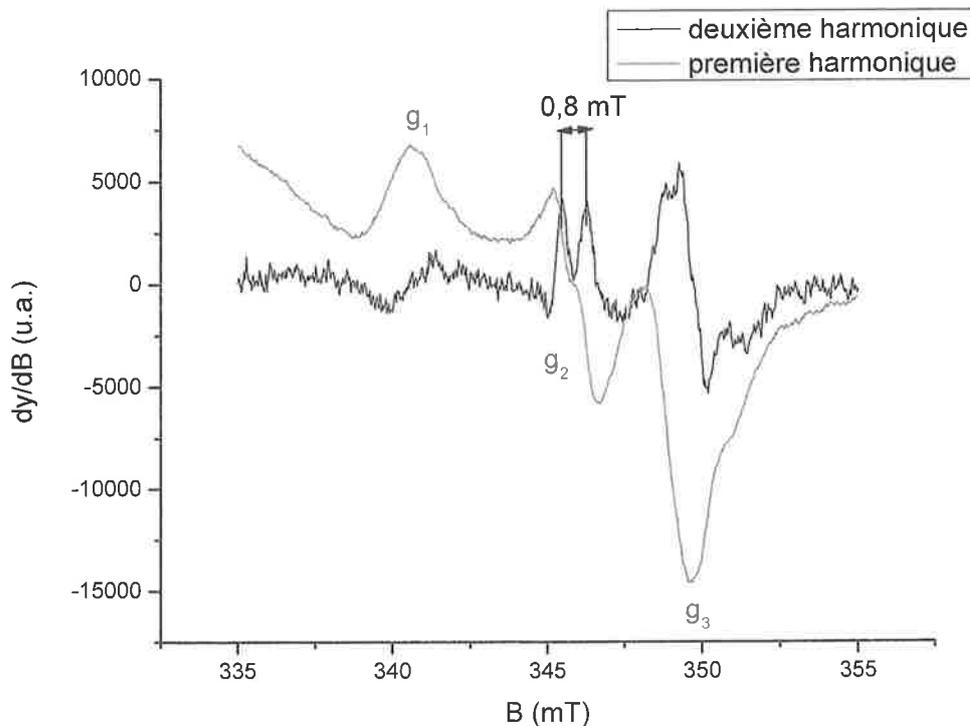


Figure IV.12 : Mesure en première et deuxième harmonique d'un ongle stressé mécaniquement réalisé en bande X à température ambiante.

En bande Q, que ce soit en première ou deuxième harmonique en phase avec la modulation, ce dédoublement n'est pas observé, du moins à température ambiante. Cette absence de dédoublement de la raie  $g_2$  en bande Q, ne permet pas de conclure quant à la nature de ce dédoublement, à savoir s'il s'agit ou non d'un couplage hyperfin ou d'un signal additionnel étranger au MIS1.

L'interprétation de ce dédoublement est susceptible de fournir des informations utiles à l'identification de l'espèce radicalaire du MIS1, notamment s'il s'agit d'un couplage hyperfin. En complément des mesures réalisées en deuxième harmonique en bandes X et Q à température ambiante, il a été possible de réaliser des mesures à basse température en bande Q en onde continue et de RPE pulsée de type HYSORE. La technique HYSORE permet d'étudier le couplage de l'électron non apparié avec des noyaux de son environnement.

Dans des conditions précises de température (entre 100 et 200 K) et de puissance micro-onde (< 1 mW), nous avons pu observer ce dédoublement en bande Q en première harmonique (cf.

<sup>1</sup> Bovine Serum Albumin

Figure IV.13). A plus basse température, la relaxation est plus longue, ce qui a pour effet de diminuer la largeur de raie. Le  $\Delta B$  entre les deux raies sur la composante  $g_2$  est égale à 0,8 mT, ce qui est très proche de la valeur mesurée en bande X. Ceci nous indique qu'il s'agit donc bien d'un couplage hyperfin du radical soufré à l'origine du MIS1. L'impossibilité de mettre en évidence ce dédoublement à température ambiante en bande Q est donc lié a priori à l'élargissement des raies du MIS1 avec l'augmentation de fréquence (effet de désordre). Pour les autres composantes  $g_1$  et  $g_3$  du MIS, en bande Q à basse température comme en bande X, il n'est pas possible de résoudre ce couplage.

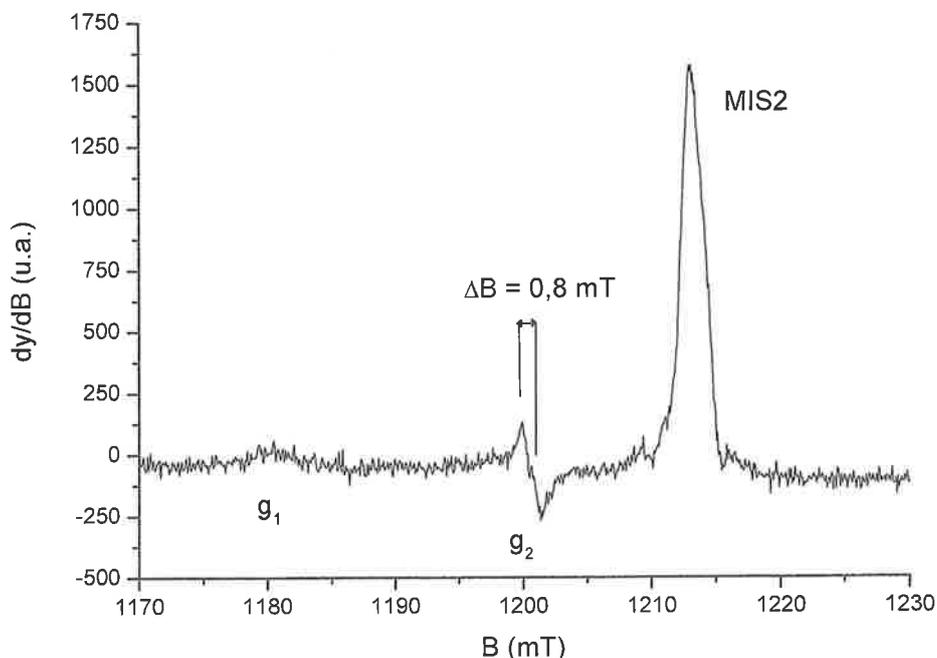


Figure IV.13 : Spectre RPE d'ongle stressé mécaniquement à température ambiante mesuré en bande Q à une température de 200 K à 0,2 mW.

Il est intéressant de noter, sur la Figure IV.13, que le MIS2 présente une allure singulière de spectre d'absorption. Lorsque la température de mesure décroît, le MIS2 est mesuré dans des conditions de passage rapide adiabatique. Ces conditions apparaissent à plus basse température (<100K) pour le MIS1, ce qui nous empêche de mieux mettre en évidence le couplage hyperfin pour des températures inférieures à 100 K. L'apparition du passage à des températures différentes confirme que les espèces radicalaires associées au MIS1 et au MIS2 sont bien de natures différentes.

Le spectre HYSORE présenté sur la Figure IV.14 a été mesuré sur la composante  $g_2$  du MIS1 à 30 K. Sur ce spectre on note un signal à 15 MHz qui est la fréquence caractéristique du proton (15,1 MHz) (Weil et al., 1994). En plus du signal centré sur 15 MHz, attribuable à des protons distants, on peut observer deux lobes de part et d'autre de l'axe d'iso-fréquence ( $\nu_1 = \nu_2$ ) caractéristique d'un couplage hyperfin avec ces protons. Ce couplage est relativement faible et peut être considéré comme majoritairement isotrope du fait de la symétrie de ces

lobes. L'ensemble de ces mesures nous indique que le dédoublement observé sur la composante  $g_2$  est bien lié à un couplage hyperfin avec un proton.

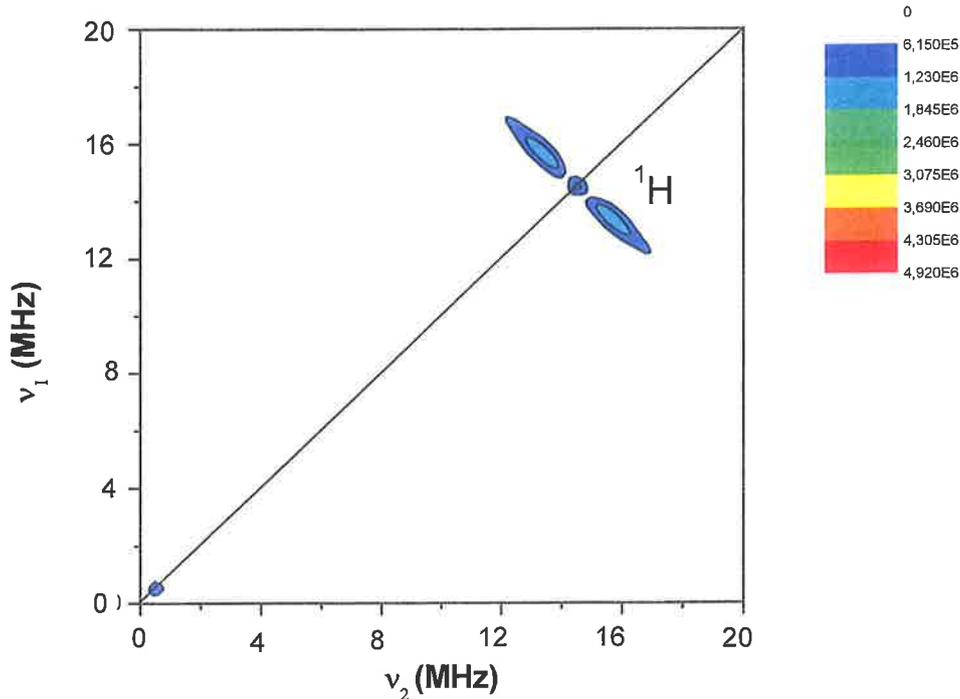


Figure IV.14 : Spectre HYSORE mesuré sur la composante  $g_2$  du spectre du MIS1 à 4 K pour  $\tau = 200$  ns.

*Le dédoublement observé sur la composante  $g_2$  du MIS1 est lié à un couplage hyperfin du radical avec un proton.*

### B.2.3 Identification et étude des paramètres influant sur la relation entre stress mécanique et intensité du MIS1

Dans le deuxième paragraphe de ce chapitre, nous présentons la mise en évidence d'un lien entre le stress mécanique (coupe ou fraisage) et la présence du MIS1. Dans cette partie, nous décrivons de manière détaillée ce lien et nous mettons en relation les effets observés sur le MIS1 avec la description histologique des ongles. L'interprétation de ces données nous permettra par la suite de confirmer les hypothèses sur la nature des radicaux soufrés et sur leur processus de formation.

#### *B.2.3.1 Mise en évidence de la proportionnalité entre intensité du MIS1 et stress mécanique*

Dans une première expérience, nous avons étudié la variation de l'intensité du MIS1 en fonction de la longueur de coupe réalisée. Afin de conserver la même géométrie de mesure dans la cavité, les coupes ont été réalisées parallèlement au bord libre. Un ongle a été

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

successivement divisé par coupe en deux parties, puis en deux fragments (Fig. IV.15), puis en quatre et dix fragments. Sur la Figure IV.16, est reportée l'intensité du MIS1 en fonction du nombre de fragments de l'ongle. On observe une relation linéaire entre le stress mécanique induit par la coupe de l'ongle et l'intensité du MIS1.

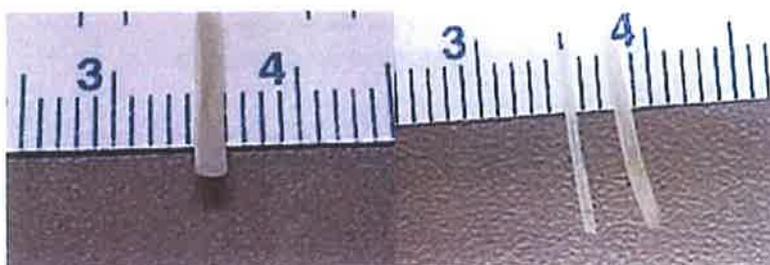


Figure IV.15 : Mode opératoire pour l'étude de la variation d'intensité du MIS1 en fonction de la longueur de coupe.

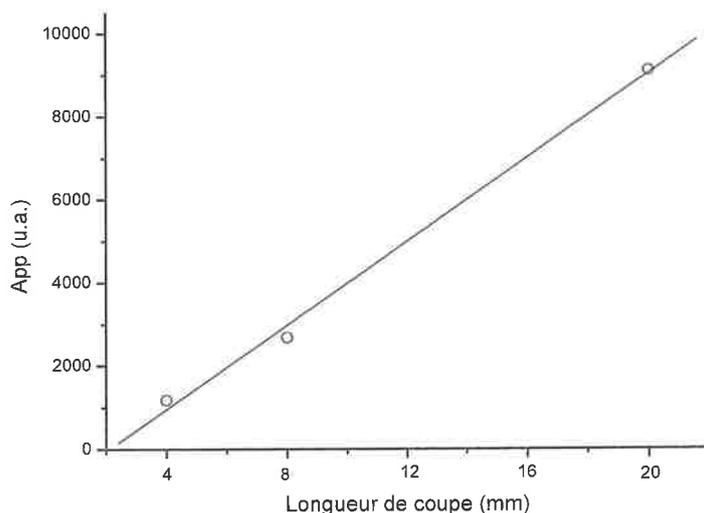
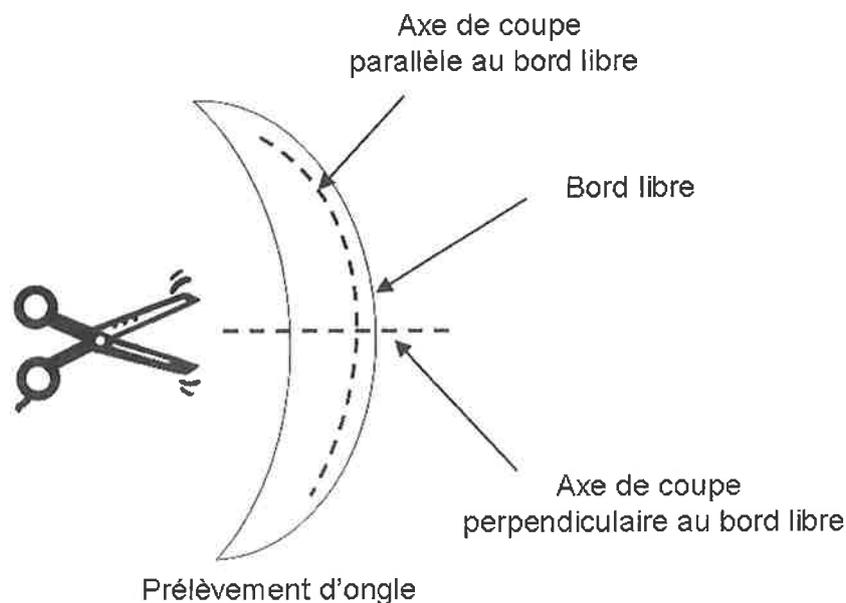


Figure IV.16 : Variation de l'intensité du MIS1 en fonction de la longueur de coupe dans l'échantillon d'ongle.

### B.2.3.2 Influence de l'orientation de la coupe de l'ongle sur la production du MIS1

Comme nous l'avons vu dans la partie descriptive des ongles (chapitre II), leur structure permet de limiter les fractures de l'ongle vers la matrice et de les orienter préférentiellement vers les bords latéraux, ce qui implique que l'énergie à fournir pour briser la structure de l'ongle est plus importante dans la direction perpendiculaire au bord libre que dans la direction parallèle (Fig. IV.17). La solidité de l'ongle étant assurée par les ponts disulfures, le nombre de liaisons à casser sera donc plus important dans la direction perpendiculaire au bord

libre. On peut donc s'attendre à ce que l'intensité du MIS1 qui est a priori proportionnelle au nombre de liaisons rompues, soit plus intense à longueur de coupe égale dans la direction perpendiculaire que dans la direction parallèle au bord libre (Fig. IV.17).



*Figure IV.17 : Schéma indiquant les deux axes de coupes réalisés sur les prélèvements d'ongles.*

La Figure IV.18 permet de comparer l'intensité du MIS généré selon que l'ongle est coupé parallèlement ou perpendiculairement au bord libre comme indiqué sur le schéma de la Figure IV.17. Comme l'analyse de la structure de l'ongle nous permettait de le prédire, l'ensemble des composantes du MIS est plus intense lorsque la coupe de l'ongle est effectuée perpendiculairement que parallèlement au bord libre. La géométrie de mesure est différente dans les deux cas : ongle 16 mm de long et 2 mm de largeur pour la coupe parallèle au bord libre et 5 morceaux de 2 mm de largeur pour la coupe perpendiculaire au bord libre. Si une correction devait être apportée par rapport à la géométrie de la mesure dans la cavité, elle ne compenserait pas l'écart observé en termes d'intensité. La longueur de coupe étant identique pour les deux orientations, la différence d'intensité indique que le nombre de liaisons disulfures détruites est plus important perpendiculairement que parallèlement au bord libre. Ce résultat montre bien qu'il y a une orientation préférentielle des fibres de kératines dans l'ongle. Ce résultat est cohérent avec la description histologique de l'ongle.

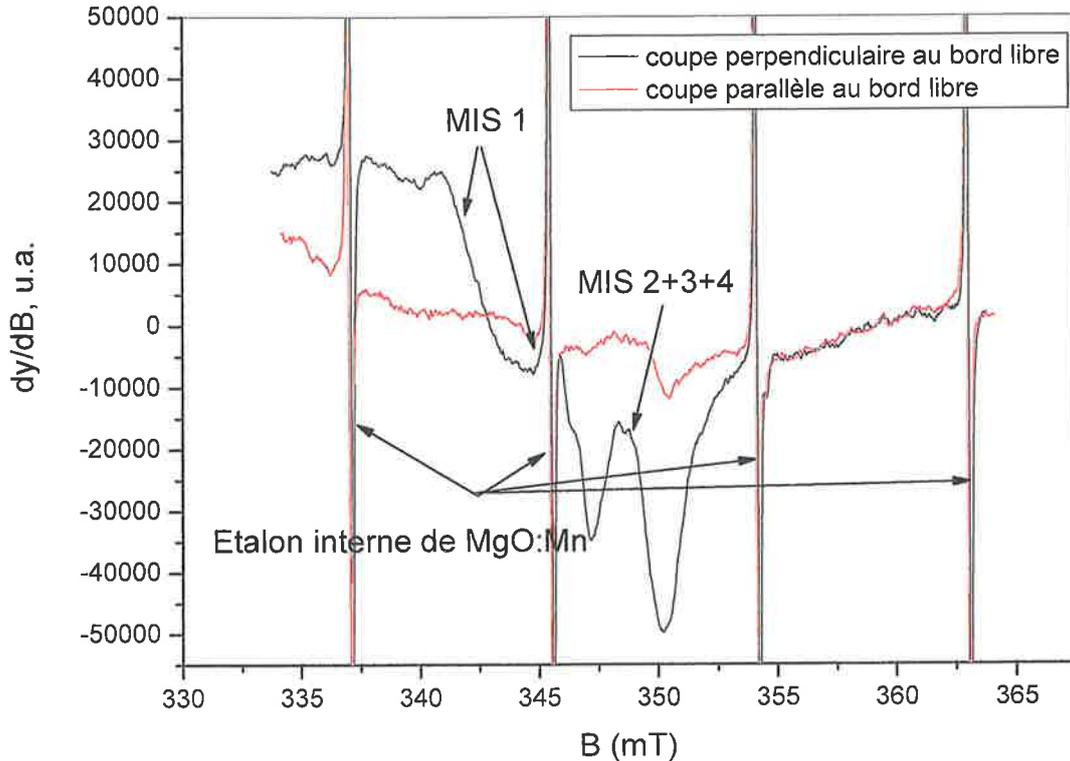


Figure IV.18 : Comparaison de l'intensité du signal d'origine mécanique pour deux orientations de coupe de l'ongle : parallèle et perpendiculaire au bord libre. La longueur de coupe totale pour les deux orientations est de 1,6 cm avec une mesure réalisée dans un délai inférieur à 1 minute après la coupe.

D'après la littérature, parmi les trois couches de l'ongle, seules les micro-fibrilles de la partie intermédiaire présentent une orientation préférentielle (parallèle au bord libre), les deux autres couches (dorsale et ventrale) ne présentant aucune orientation spécifique des fibres de kératines. Dans les deux cas présentés sur la Figure IV.18, les couches dorsales et ventrales contribuent donc de la même manière au MIS pour les deux orientations de coupe. On peut donc en déduire que la contribution des couches dorsale et ventrale est inférieure ou égale à l'intensité mesurée pour la coupe parallèle au bord libre. La contribution de ces deux couches dans le spectre RPE produit pour une coupe perpendiculaire au bord libre est donc relativement faible. **C'est donc bien dans la couche intermédiaire que sont majoritairement situés les radicaux libres induits par le stress mécanique pour la coupe perpendiculaire au bord libre.**

Si l'on considère uniquement les radicaux soufrés du MIS1, ceci implique que c'est donc bien dans la couche intermédiaire que le nombre de ponts disulfures est le plus élevé, comme supposé dans la littérature. Il peut paraître surprenant à première vue qu'une coupe avec un axe perpendiculaire à l'orientation des fibres de la partie intermédiaire induise le signal le plus intense. Le nombre de liaisons selon l'axe perpendiculaire aux fibres étant a priori moindre, on pourrait donc s'attendre à un résultat inverse comme le montre la Figure IV.19. Compte tenu que les liaisons disulfures et les liaisons ioniques de terminaison des hétérodimères sont

moins énergétiques que les liaisons entre les acides aminés formant le polypeptide, on peut penser que lors de la rupture de la structure de la kératine, les chaînes polypeptidiques et les micro-fibrilles, plutôt que d'être systématiquement scindés, peuvent être également désolidarisés des chaînes ou micro-fibrilles adjacents. Il est difficile a priori de déterminer s'il y a un mode prépondérant de rupture de la structure. Si l'on considère l'hypothèse précédente alors le nombre de liaisons disulfures rompues est effectivement beaucoup plus important pour l'axe de coupe perpendiculaire que pour l'axe de coupe parallèle (Fig. IV.19).

Cette hypothèse implique que dans le cas du MIS1, ce sont donc plutôt des ruptures homolytiques directes des liaisons S-S ou la rupture des liaisons C-S qui sont à l'origine de la formation du MIS1. Dans la suite de l'étude seront détaillés les mécanismes réactionnels pouvant mener aux radicaux observables par spectroscopie RPE à température ambiante, et responsables des différents composantes du MIS.

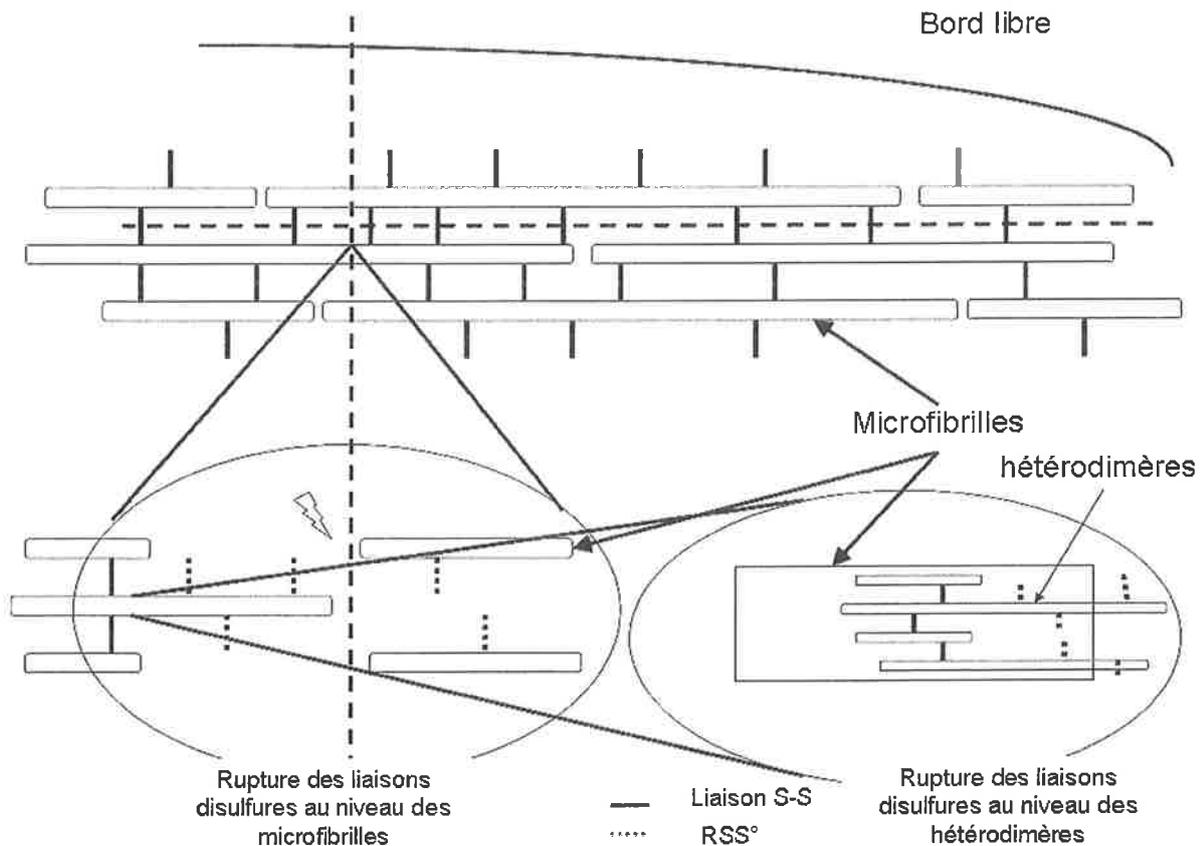


Figure IV.19 : Schéma décrivant la rupture des liaisons disulfures selon l'axe perpendiculaire au bord libre.

En conclusion de cette partie, il ressort que le prélèvement des ongles tel qu'il est effectué (coupe parallèle au bord libre) est la configuration qui génère le moins de MIS lors du prélèvement. Au cours de la préparation des échantillons pour la mesure, afin de limiter la production du MIS qui peut être pénalisant pour l'estimation de l'intensité du RIS, il

## ***Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles***

conviendra d'éviter de recouper le prélèvement d'ongle surtout selon un axe perpendiculaire au bord libre. Même si du point de vue de la mesure, il est préférable d'avoir un échantillon plus densément réparti au centre de la cavité résonante, néanmoins, pour limiter la production de MIS, il est au final préférable autant que possible de mesurer les prélèvements dans leur intégrité sans autre coupe supplémentaire.

***L'intensité du MIS est proportionnelle à longueur de coupe, mais également fonction de l'orientation de la coupe réalisée. L'orientation de coupe parallèle au bord libre est celle qui génère le moins de radicaux.***

### ***B.2.3.3 Influence de l'humidité de l'ongle sur la production du MIS1***

Après prélèvement de l'ongle, le spectre RPE de l'échantillon prélevé présente un signal RPE intense qui est lié à l'effet du stress mécanique produit lors du prélèvement. Nous avons pu observer que les ongles les plus souples ou pouvant être déformés sans occasionner de rupture du prélèvement, présentent généralement un MIS de plus faible intensité que les ongles présentant une plus grande rigidité de structure. Il est évident que l'épaisseur de l'ongle peut jouer à la fois sur la rigidité de l'ongle et donc sur la production du MIS qui en découle. Un ongle plus épais est susceptible en théorie de donner un MIS plus intense du fait du plus grand nombre de liaisons disulfures rompues par millimètre de coupe.

Par ailleurs, il est connu que les ongles peuvent présenter des propriétés de souplesse ou de dureté très différentes d'un donneur à l'autre (Farran et al., 2007). Il est très possible que, dans ce cas, des variations de la densité de liaisons disulfures soient responsables des variations de dureté observées. Un paramètre qui joue également sur la solidité de l'ongle est son taux d'humidité. Un bain prolongé d'un ongle dans de l'eau rend ce dernier extrêmement souple et celui-ci peut parfois être non plus coupé, mais simplement déchiré telle une feuille de papier. Dans le cas d'ongles « sur-hydratés » par rapport aux taux normaux habituellement constatés *in vivo*, compte tenu des qualités de souplesse de l'ongle, on peut se demander si la production de MIS ne pourrait pas être diminuée.

Sur la Figure IV.20 sont présentés des spectres RPE mesurés après prélèvement, pour des ongles ayant préalablement subi *in vivo* un bain dans de l'eau d'une durée de 5 et 10 minutes. On peut noter sur ces deux spectres que la plupart des composantes du MIS habituellement mesurées après prélèvement ne sont pas observées (MIS1, MIS2, MIS3, MIS4).

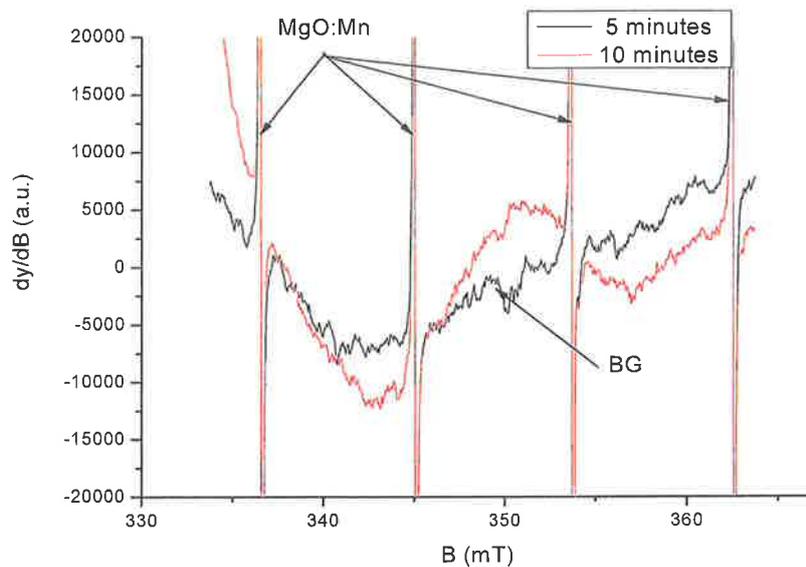


Figure IV.20 : Effet sur le spectre RPE mesuré juste après coupe, d'une humidification *in vivo* des ongles d'une durée de 5 et 10 minutes préalablement au prélèvement. Mesures réalisées en bande X à température ambiante et à une puissance micro-onde de 20 mW. Les raies du  $Mn^{2+}$  proviennent d'un étalon de MgO:Mn placé dans le bas de la cavité.

*Il semble donc qu'une humidification in vivo de l'ongle permette de limiter, voire de prévenir la formation des espèces radicalaires du MIS. Ce résultat devra probablement être intégré lors de la mise au point des procédures de prélèvement des ongles.*

#### B.2.4 Etude de la stabilité du MIS1

Dans les paragraphes précédents nous avons déjà évoqué l'instabilité du MIS1. Dans ce paragraphe nous étudierons de manière plus systématique les phénomènes de décroissance du MIS1, notamment en fonction des paramètres environnementaux tels que l'humidité et la température.

##### *B.2.4.1 Influence de l'humidité sur la stabilité du MIS1*

L'un des principaux résultats obtenus au cours de cette thèse est la mise en évidence de l'action de l'humidité, notamment sur les différentes composantes du MIS et notamment sur le MIS1 (Trompier et al., 2007 et 2009). Nous avons vu précédemment que le MIS1 mesuré sur des ongles fraîchement prélevés décroît complètement en environ six heures. Sur des ongles déshydratés, la cinétique de décroissance du MIS1 est comparativement extrêmement lente, la stabilisation du MIS1 est observée au bout de vingt heures et le MIS1 ne décroît pas complètement (Fig. IV.21). Le meilleur ajustement des données expérimentales ( $R^2=0,99$ ) est obtenu par la somme de deux fonctions de cinétique de décroissance de premier ordre. Les deux demi-vies ainsi calculées pour les ongles prélevés sur un même donneur sont respectivement de  $\tau_1=0,6$  heure et  $\tau_2=5,3$  heures pour les ongles déshydratés à comparer avec

des valeurs de  $\tau_1=0,1$  heure et de  $\tau_2=0,7$  heure obtenues pour le taux normal d'hydratation. Ces résultats tendent à montrer que la teneur en eau de l'ongle a une influence notable sur la cinétique de décroissance du MIS1.

Bien que la cinétique de décroissance du MIS1 mesurée présente deux composantes, l'explication semble davantage résider dans un phénomène de déshydratation au cours du temps lors de la mesure, que par la présence de deux espèces radicalaires distinctes. On peut également envisager le fait que les espèces radicalaires, bien que localisées au niveau du bord de coupe, soient néanmoins réparties à une certaine distance dans l'épaisseur de l'ongle, ce qui implique des probabilités de réaction avec l'humidité de l'air différentes selon la localisation, les radicaux en surface réagissant de manière prépondérante avec des cinétiques plus courtes. Le fait que le MIS1 ne décroît pas complètement dans des ongles déshydratés accreditte cette hypothèse. Les radicaux situés à une certaine distance de la coupe dans la matrice de l'ongle ne réagissent pas ou très faiblement avec l'humidité de l'air.

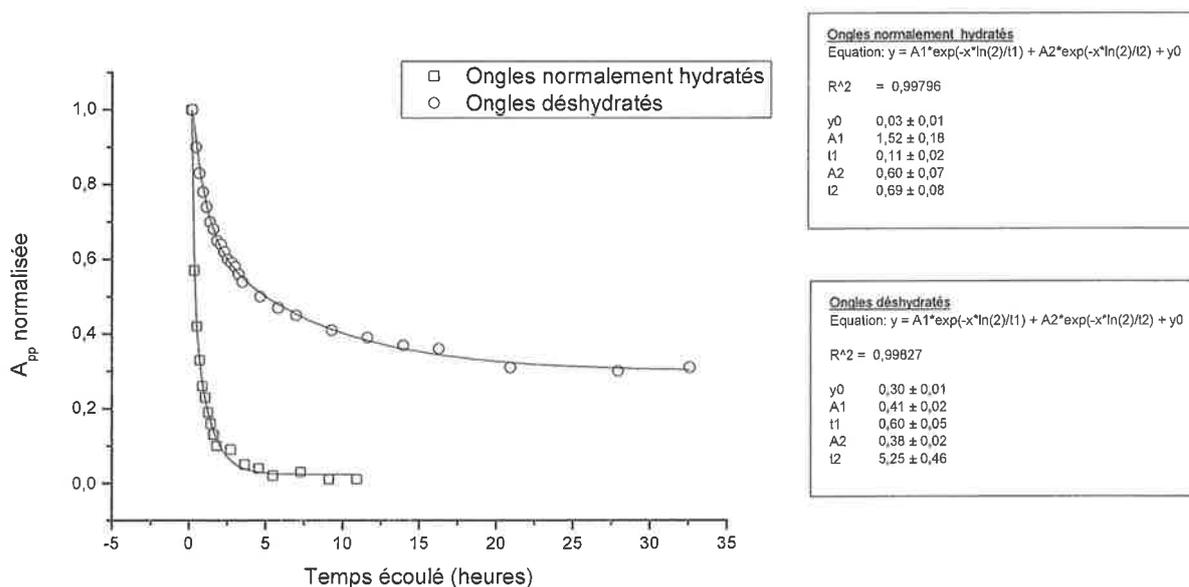


Figure IV.21 : Comparaison de la décroissance du MIS1 a) pour un ongle normalement hydraté b) pour un ongle déshydraté. Mesures réalisées à température ambiante en bande X à une puissance de 20 mW.

L'effet de l'humidité sur la stabilité du MIS1 permet d'expliquer les différences d'observation quant à la stabilité du MIS1 entre notre étude et celles réalisées par l'équipe de Symons (Chandra & Symons, 1987). En effet, Chandra & Symons (1987) n'avait pas noté de décroissance du MIS1 à température ambiante. On peut supposer que cette précédente étude a probablement été réalisée sur des ongles déshydratés. Il n'est donc pas étonnant qu'aucune décroissance notable du MIS1 n'ait été observée. Les ongles laissés à l'air libre se déshydratent très rapidement (perte de l'ordre de 5% en masse de l'ongle en 1 heure).

#### Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

Afin de mettre en évidence le rôle de la teneur en eau dans le phénomène de décroissance du MIS1, un ongle stressé mécaniquement a été mesuré avant et après avoir été trempé pendant quelques secondes dans de l'eau distillée. On peut noter sur la Figure IV.22, que le MIS1 réagit fortement avec l'eau, un contact avec de l'eau pendant quelques secondes suffit à éliminer le MIS1. On peut supposer que les espèces radicalaires liés au MIS sont localisées à la surface du bord de coupe. En effet, dans de nombreux matériaux (émail dentaire, verre, etc.), les espèces paramagnétiques induites par un stress mécanique sont localisées au niveau de la surface de l'échantillon (Walters G. & Estle T.L., 1961 ; Arends et al., 1963). Pour le vérifier, nous avons humidifié à l'aide d'un pinceau uniquement le bord de coupe (cf. Figure IV.23) et comme le montre la Figure IV.22, un résultat similaire à l'expérience précédente (bain) est observé. Ce résultat confirme que les espèces radicalaires associées au MIS1 sont localisées le long de la coupe de l'ongle.

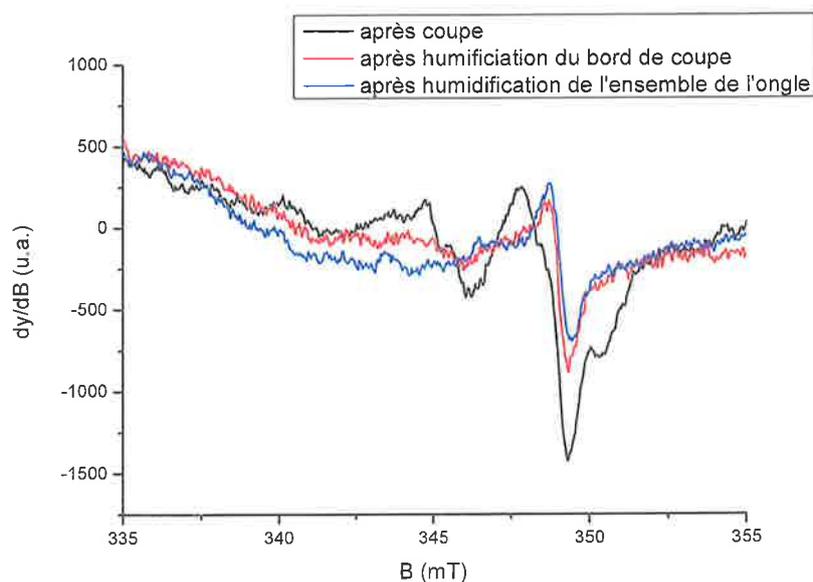


Figure IV.22 : Effet d'une humidification de quelques secondes d'un ongle stressé mécaniquement, mesure réalisée en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW a) humidification du bord de coupe, b) humidification de toute la masse de l'ongle.



Figure IV.23 : Humidification du bord de coupe à l'aide d'un pinceau humide.

Ces données indiquent que l'espèce radicalaire induisant le MIS1 réagit fortement avec l'eau et que le ou les produits des réactions radicalaires ne sont pas détectables par spectroscopie RPE, du moins dans nos conditions de mesure. Il faut noter que si l'influence de l'humidité n'a pas été mise en évidence préalablement à cette étude, Symons et al. (1995) avait néanmoins testé l'effet d'un solvant (thioglycollate) sur le MIS. Ce solvant avait un effet similaire à l'eau sur le MIS1.

*L'influence de l'humidité n'avait pas été étudiée jusqu'à présent, et aussi simple que puisse paraître ce résultat, c'est l'une des clés essentielles de la compréhension des mécanismes radicalaires dans les ongles et l'un des paramètres essentiels à maîtriser pour la préparation des échantillons.*

#### ***B.2.4.2 Influence de la température sur la stabilité du MIS1***

La température est le second paramètre ayant une influence notable sur la décroissance du MIS1. Les Figures IV.24 et IV.25 présentent les courbes de décroissance isothermes et isochrones de l'amplitude du MIS1 pour différentes températures de stockage des ongles. Afin de tenter de s'affranchir du paramètre humidité, ces mesures ont été réalisées sur des ongles préalablement déshydratés provenant d'un même donneur. On peut noter sur la Figure IV.24 que la cinétique de décroissance augmente avec la température. Les valeurs expérimentales sont ajustées au mieux avec deux fonctions de décroissance d'ordre 1. Nous avons pu observer que les deux coefficients de vitesse  $k_{MIS1}$  et  $k'_{MIS1}$  augmentent avec la température. Cependant, les valeurs expérimentales ne suivent pas la loi d'Arrhenius, qui permet de relier les coefficients de vitesse à l'énergie d'activation de la réaction suivant une fonction variant comme l'inverse de la température. Il est fort probable que des taux d'humidité résiduelle différents dans les échantillons étudiés puissent affecter de manière différenciée les vitesses de décroissance du MIS1. De plus, le taux d'humidité des ongles varie pendant le chauffage.

L'influence de l'humidité empêche donc d'étudier dans le détail l'effet de la température sur la décroissance du MIS1. Il s'agissait principalement de mettre en évidence un effet de la température susceptible d'être utilisé dans l'élaboration d'une stratégie d'élimination sélective de la contribution du MIS pour estimer au mieux les composantes les plus stables du RIS. A ce titre, l'étude de l'effet de la température a été complétée par l'établissement d'une courbe isochrone (Fig. IV. 25). De la même manière, cette courbe est donnée à titre indicatif et il n'est pas évident que d'autres échantillons présentent des comportements rigoureusement similaires. Les données présentées sur la Figure IV.25 corroborent l'instabilité du MIS1 pour des températures supérieures à 45°C reportées par Chandra & Symons (1987). Après le palier à 100°C, le MIS1 est complètement éliminé.

Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

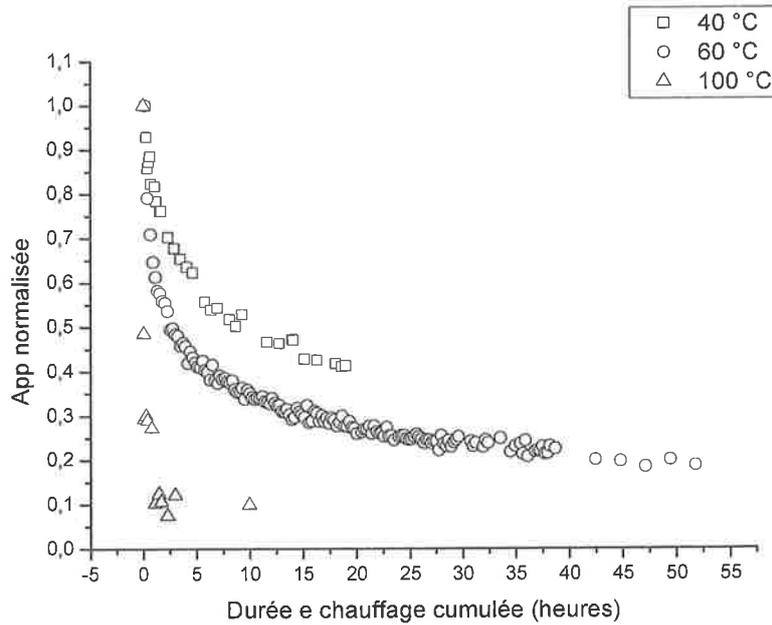


Figure IV.24 : Courbe de décroissance isotherme du MISI en fonction de durée de chauffage des ongles (courbe isothermale). Chauffage réalisé à 40 °C, 60 °C et 100 °C. Mesures réalisées en bande X à une puissance micro-onde de 20 mW.

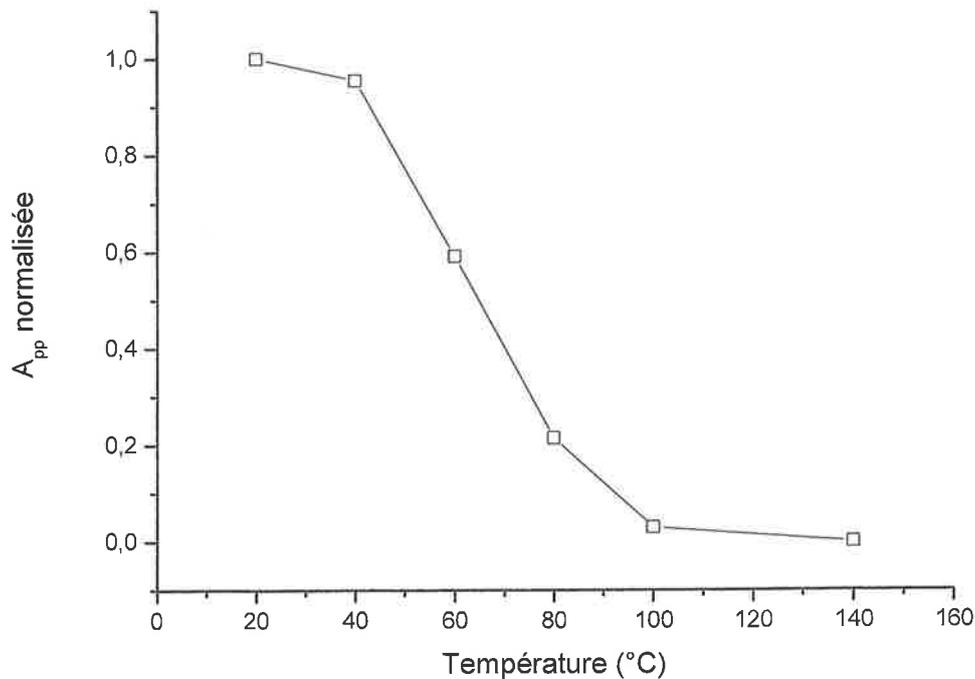


Figure IV.25 : Courbe de décroissance isochrone de l'amplitude du MISI. Mesures réalisées à température ambiante en bande X à une puissance micro-onde de 20 mW avec des durées de chauffage de 10 minutes.

La vitesse de décroissance du MISI augmente avec la température. Le MISI est éliminé par un chauffage à des températures supérieures à 45 °C.

### B.2.5 Identification des espèces radicalaires associés au MIS1

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, l'ongle est composé de trois couches. C'est dans la couche intermédiaire que l'on trouve la concentration la plus importante de ponts disulfures entre les groupements cystéines adjacents. Dans les couches dorsale et ventrale, il y a très peu de liaisons de ce type, mais un nombre important de groupement latéraux. Lorsqu'un même stress mécanique est appliqué aux différentes couches, seuls les spectres RPE de la couche intermédiaire présente les caractéristiques du MIS1. Sur les autres couches, aucun signal additionnel n'est mesuré. Cette observation nous indique donc que c'est bien la présence des ponts disulfures qui est à l'origine de la formation des radicaux du MIS1. Les processus de formation du MIS1 et des autres composantes du MIS seront explicités dans le paragraphe B.6.

Des signaux RPE avec des caractéristiques similaires à celles du MIS1 ont été reportés dès les années soixante uniquement dans des composés chimiques ou des protéines irradiées contenant de la cystéine. Seules les protéines, telles que par exemple la gliadine, la ribonucléase, la chymotrypsinogène ou la lysozyme contenant des quantités significatives de cystéine (> 2% en masse) présentent la signature caractéristique du MIS1 (Patten & Gordy, 1964). Le radical a été dans un premier temps interprété comme un radical de type  $RS^\circ$  (Patten & Gordy, 1964 ; Shields & Hawick, 1970). Les composés sans cystéine mais contenant de la méthionine (deuxième acide aminé soufré), ne présentent pas ce type de signature (Shield & Gordy, 1974). Contrairement à la cystéine, il n'y a pas de création de liaison disulfure entre deux groupements méthionines adjacents. Ceci confirme bien que l'origine du MIS1 est liée à la présence de ces liaisons disulfures entre groupements de cystéines.

Shield & Gordy (1974) ont montré avec une étude sur le couplage avec  $^{33}S$  que ce type de structure était lié à un **radical contenant deux atomes de soufre**. Ce résultat est cohérent avec une origine liée aux ponts disulfures. Deux hypothèses ont été formulées concernant le radical à l'origine du MIS1.

D'après Symons et al. (1995), le radical associé au MIS1 serait de type  $RS-S^{\circ R'}$  avec R correspondant à un groupement alkyl et R' à un atome d'hydrogène, plutôt qu'un radical perthiyl ( $RSS^\circ$ ), notamment du fait de la présence d'un couplage hyperfin avec le proton en R' (visible sur la composante  $g_2$  du MIS1). Cependant, dans de nombreux travaux portant sur des protéines contenant de la cystéine ou des cristaux de cystéine irradiés, présentant des signatures identiques, c'est l'hypothèse du radical perthiyl qui était privilégiée. Ainsi par exemple, d'après Hadley & Gordy (1974), les radicaux formés sous irradiation dans des cristaux de cystéine sont de la forme  $RSS^\circ$ . Cette hypothèse a été reprise dans de nombreux travaux concernant l'étude de composés ou protéines irradiés contenant de la

#### *Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles*

cystéine (Tab. IV.1). Dans une étude récente, des calculs quantiques par DFT<sup>2</sup> et MSCF<sup>3</sup>, ont confirmé l'hypothèse du radical perthiyl (RSS°) (Engström et al., 2000). En effet, les valeurs de g mesurées pour le MIS1 ou le signal équivalent produit sous irradiation correspondent à celles calculées pour le radical perthiyl. Les valeurs calculées pour le radical cation ou radical anion sont significativement différentes notamment pour la composante g<sub>3</sub>.

Précédemment nous avons bien confirmé la présence d'un couplage hyperfin avec un atome d'hydrogène sur la composante g<sub>2</sub> du MIS1. Cependant, il n'y a pas a priori de contradiction, comme l'affirmait Symons, avec l'hypothèse du radical perthiyl. En considérant que l'électron est localisé sur une orbitale  $\pi$ , probablement perpendiculaire au plan CSS, le couplage peut intervenir dans ce cas avec les deux atomes d'hydrogène du groupement (CH<sub>2</sub>). Dans le cas du radical perthiyl, Engström et al. (2000) ont calculé une constante de couplage hyperfin avec les deux protons égale à 0,9 mT, ce qui est cohérent par ailleurs avec les valeurs mesurées sur le spectre du MIS1 et celles de Chandra & Symons (1987).

Du point de vue de la structure de l'ongle, le cisaillement des filaments et des chaînes polypeptidiques induit des ruptures des ponts disulfures qui assurent la rigidité de la structure. Sans commencer à détailler les processus de formation des radicaux soufrés du MIS1, les radicaux a priori formés suite à la scission sont de la forme RS° ou RSS°, selon qu'il s'agit de rupture des liaisons S-S ou C-S. Dans ce cas, il est difficile d'envisager un mécanisme réactionnel pouvant alors mener à la formation d'un radical anion ou cation comme suggéré par Symons et al. (1995), alors que les mécanismes menant à la formation du radical perthiyl à partir du radical thiyl sont connus (Akasaka et al., 1964).

Sur la base des données calculées par Engström et al. (2000), nous avons simulé le spectre RPE du radical perthiyl. Les valeurs de g calculées ne permettaient pas de simuler de manière fidèle le spectre RPE mesuré. Il a été nécessaire d'ajuster les valeurs de g pour obtenir un meilleur accord, comme le montre la Figure IV.26 pour un spectre simulé en bande X.

Il faut noter que les valeurs utilisées pour la simulation restent néanmoins compatibles avec les valeurs de g communément reportées dans la littérature pour le radical perthiyl (Tab. IV.1). Les simulations réalisées en bande Q avec les mêmes paramètres que ceux utilisés pour la simulation bande X permettent également de reproduire les spectres RPE mesurés à cette fréquence. Le fait que le jeu de paramètres utilisé permet de reproduire les spectres mesurés, tant en bande X qu'en bande Q, confirme que l'hypothèse du radical perthiyl est la plus vraisemblable.

---

<sup>2</sup> DFT : Density Functionnal Theory, méthode utilisée dans les calculs quantiques de la structure électronique de la matière (atomes, molécules, solides)

<sup>3</sup> MSCF : Multi-Configurational Self-Consistent Field, méthode alternative aux calculs par DFT

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

Tableau IV.1 : Principales valeurs de g issues de la littérature pour des ongles stressés mécaniquement ou irradiés ainsi que celles de composés soufrés irradiés avec l'espèce radicalaire associée.

Référence	Nature du composé	Principales valeurs du tenseur g			Radical
<i>Symons et al., 1995</i>	Ongles stressés	2,065	2,025	2,000	$RS \div S(H)R$ et $RS \div SR^-$
<i>Nelson et al., 1977</i>		2,058	2,025	2,001	$RS \div SR^+R$
<i>Engström et al., 2000</i>	Simulation	2,047	2,017	2,002	$CH_3S \div SCH_3^+$ Planar trans configuration
	Simulation	2,031	2,020	2,002	$CH_3S \div SCH_3^+$ Planar cis configuration
	Simulation	2,028	2,009	2,002	$CH_3S \div SCH_3^-$ Planar trans configuration
<i>Bonazzola et al., 1984</i>	Cysteamine	2,059	2,023	2,007	$RCH_2SS^\circ$
<i>Bonazzola et al., 1984</i>	Dithiane	2,059	2,028	2,007	$RCH_2SS^\circ$
<i>Parast et al., 1995</i>	Cysteine	2,057	2,023	2,000	$RCH_2SS^\circ$
<i>Hadley&amp;Gordy, 1975</i>	Cysteine hydrochloride	2,055	2,023	1,998	$RCH_2SS^\circ$
<i>Hadley&amp;Gordy, 1975</i>	N-acetyl-D-L-methionine	2,063	2,026	2,004	$RCH_2SS^\circ$
<i>Hadley&amp;Gordy, 1974</i>	Cystine dihydrochloride	2,053	2,026	2,000	$RCH_2SS^\circ$
<i>Engström et al., 2000</i>	Simulation	2,063	2,028	2,002	$RCH_2SS^\circ$
<i>Bonazzola et al., 1984</i>	Dithiane	2,224	2,028	1,999	$RCH_2S^\circ$
<i>Bonazzola et al., 1984</i>	Cysteamine	2,242	1,980	1,999	$RCH_2S^\circ$
<i>Akasaka, 1965</i>	Cysteine hydrochloride	2,29	1,99	1,99	$RCH_2S^\circ$
<i>Saxebol&amp;Herskedal, 1975</i>	Acetylcysteine	2,216	2,006	1,990	$RCH_2S^\circ$
<i>Engström et al., 2000</i>	Simulation	2,428	2,017	2,002	$CH_3S^\circ$
		2,277	2,018	2,002	$CH_3S^\circ H$ -bond

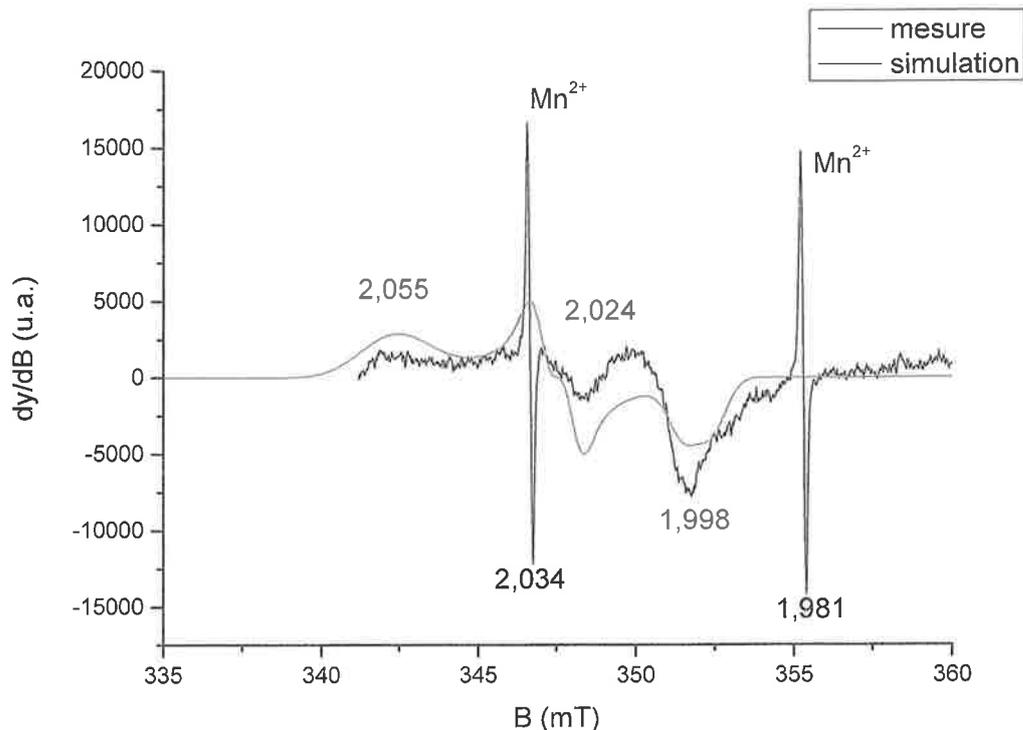


Figure IV.26 : Comparaison d'un spectre RPE d'ongle stressé mécaniquement mesuré en bande X en présence d'un étalon interne de MgO:Mn avec un spectre simulé du radical perthiyl calculé avec le logiciel SimFonia.

*Le radical perthiyl  $RSS^\circ$  est a priori l'espèce radicalaire la plus probable pour le MIS1*

## B.2.6 Conclusion sur le MIS1

Le MIS1 est produit par un stress mécanique, que ce soit une action de coupe ou de broyage. Le radical perthiyl a été identifié comme étant l'espèce associée au MIS1. Cette espèce est localisée sur les bords de coupe. Il serait intéressant d'utiliser les nouvelles techniques d'imagerie RPE pour confirmer ce résultat et éventuellement établir la distribution en profondeur de ce radical. L'un des principaux résultats de cette étude est la mise en évidence du rôle crucial de l'humidité quant à la stabilité du MIS1. L'action de l'eau permet d'éliminer cette composante du MIS si nécessaire, notamment si les ongles devaient être retailés après prélèvement. Etant donné que les radicaux sont répartis le long du bord de coupe et que les radicaux radio-induits sont répartis dans la totalité de l'ongle, il semble a priori possible d'éliminer sélectivement le MIS1, en humidifiant uniquement le bord de coupe. Cette possibilité sera évaluée dans la partie traitant du RIS.

Dans les applications de dosimétrie, le MIS1 est considéré comme un signal parasite, mais compte tenu des résultats obtenus, le MIS1 pourrait être utilisé en tant qu'indicateur de la

dureté de l'ongle comme technique complémentaire aux tests de dureté de l'ongle réalisés par micro ou nano-indentation<sup>4</sup>. En effet, le MIS1 est généré en proportion du stress mécanique appliqué à l'ongle et à stress égal l'intensité du MIS1 est a priori fonction de la dureté de l'ongle, elle-même équivalente au nombre de liaisons disulfures présentes dans l'ongle. Ainsi la mesure RPE du MIS1 induit par un même stress mécanique dans des ongles déshydratés (coupe par exemple), devrait permettre de comparer la dureté ou plutôt la résistance mécanique d'échantillons d'ongles, car, dans ce cas, ce n'est pas uniquement un test limité à la surface, la RPE permet de prendre également en compte le paramètre épaisseur. L'inconvénient principal de la RPE ici est qu'elle ne permet pas d'étudier l'influence de l'humidité sur les propriétés mécaniques de l'ongle, comme le permet la micro-indentation.

*Le MIS1 est associé au radical perthiyl. Après prélèvement, ce radical décroît complètement. La vitesse de décroissance du MIS1 est dépendante des conditions d'humidité et de température. Une humidification du bord de coupe permet d'éliminer le MIS1.*

### **B.3 Etude et description du MIS3**

#### **B.3.1 Description générale du spectre RPE du MIS3**

Cette composante n'avait pas été identifiée dans les travaux précédents, notamment ceux de Symons (Chandra & Symons, 1987 ; Symons et al. 1995). Si elle était a priori observable sur le spectre RPE du MIS reporté par Chandra & Symons (1987), elle ne dominait pas le spectre comme sur celui présenté sur la Figure IV.27, du fait probablement du délai entre la coupe des ongles et leur mesure. Le doublet est centré sur une valeur de  $g$  égale à 2,004 avec une constante de couplage hyperfin de 2,0 mT. Récemment Wilcox et al. (2010) et Black & Swarts (2010) ont également mis en évidence le MIS3 par des mesures réalisées en bande X avec des valeurs de  $g$  et de constante de couplage en accord avec les valeurs estimées dans ce travail. Ce type de signal a été reporté dans de nombreux matériaux irradiés, qu'il s'agisse de protéines, de sucres ou de matériaux contenant de la kératine (soie et laine). Il est généralement associé au couplage d'un spin électronique localisé sur un atome de carbone, avec un proton en position  $\alpha$ . Cependant, dans l'étude des phénomènes de dégradation mécanique de produits kératinisés, ce signal n'a pas à notre connaissance été mis en évidence, notamment dans les nombreuses études dédiées à la soie (Gasymov et al., 1992) alors qu'il est présent dans la soie irradiée. La présence de ce signal après dégradation mécanique de la structure de l'ongle est donc singulière.

---

<sup>4</sup> La micro-indentation permet d'obtenir la dureté de Vickers. Il s'agit de mesurer l'empreinte laissée par un poinçon appliqué sur la surface d'un matériau

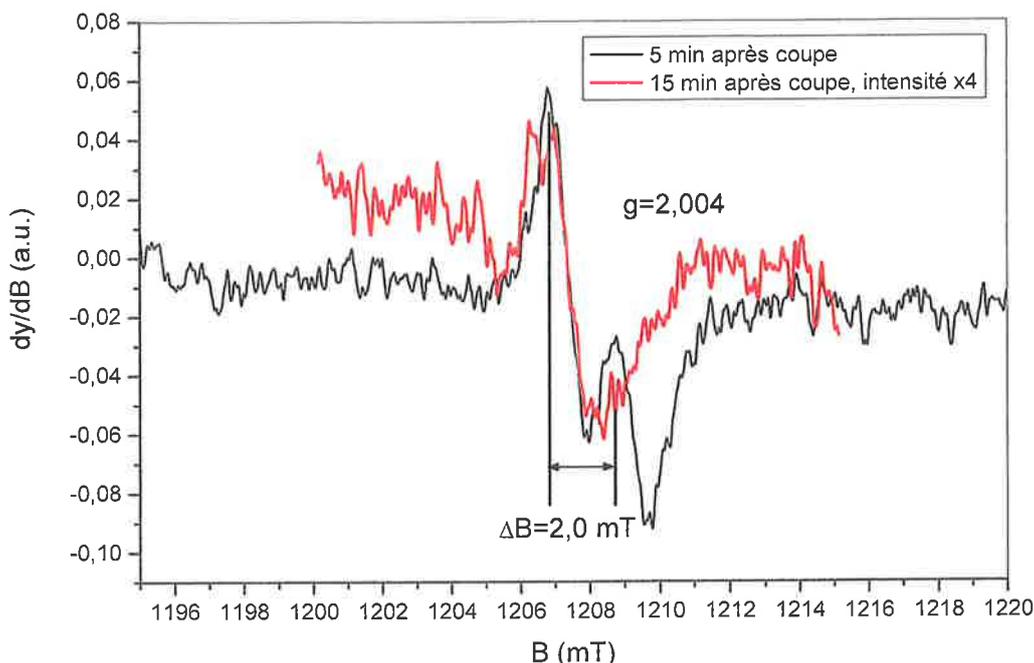


Figure IV.27 : Spectre RPE d'un ongle mesuré en bande Q à température ambiante pour une puissance micro-onde de 0,5 mW, 5 minutes et 15 minutes après son prélèvement et sans aucun traitement additionnel. L'intensité du signal après 15 minutes a été multipliée par un facteur 4.

Afin de mieux mettre en évidence le MIS3, une partie des mesures a été réalisée en bande Q pour bénéficier de la meilleure résolution qu'offre cette fréquence et également en deuxième harmonique qui permet une interprétation plus facile des signaux mesurés. La Figure IV.27 montre le spectre RPE d'un ongle mesuré en bande Q à température ambiante, 5 minutes et 15 minutes après son prélèvement, sans aucun traitement additionnel. Afin de pouvoir comparer les deux spectres, le signal mesuré après 15 minutes a été multiplié par un facteur 4. Entre les deux mesures, la position de l'échantillon est restée inchangée afin de mesurer l'évolution de la composante du MIS autour de  $g=2$  dans les minutes suivant le prélèvement de l'ongle. Le MIS3 est un signal très instable à température ambiante comme le montre la Figure IV.27. Il est intéressant de noter que ce signal décroît également rapidement dans des échantillons déshydratés. Lorsque le tube de mesure est rempli de gaz inerte ( $N_2$ ), la vitesse de décroissance du MIS3 est considérablement réduite. Il semble que le radical à l'origine de ce doublet réagisse principalement avec l'oxygène. Un comportement identique a été mis en évidence dans les protéines irradiées (Patten & Gordy, 1964).

Le MIS3, du fait de sa complète disparition à l'air libre, n'est donc en soit pas un problème pour l'analyse des signaux dosimétriques produits autour de  $g=2$ . De plus, une simple humidification du bord de coupe permet de l'éliminer complètement comme pour le MIS1.

### B.3.2 Identification des espèces paramagnétiques du MIS3

Les caractéristiques de ce doublet ( $g=2,004$  et  $a_H= 2,0$  mT) et le fait qu'il sature à faible puissance micro-onde est cohérent avec un radical centré sur le carbone couplé avec un proton. En effet, le fait que la valeur de  $g$  soit proche de celle de l'électron libre indique une localisation sur un carbone plutôt que sur un oxygène par exemple.

Une configuration telle que décrite sur la Figure IV.28, donne, d'après les études menées par Sevilla et al. (1979) sur des chaînes dipeptidiques irradiées, un doublet isotrope avec une constante de couplage d'environ 1,9 mT. On retrouve également ces caractéristiques spectrales dans des saccharides irradiés. Le couplage d'un électron non apparié suite à la perte d'un proton sur un carbone, avec un proton en  $\alpha$  donne par exemple pour le mannose un doublet de constante de couplage  $a_H=1,64$  mT et  $g=2,004$  et  $a_H=2,296$  et  $g=2,0039$  pour le sorbose (Bartlett & Brown, 1979 ; Vanhaelewyn et al., 2004).

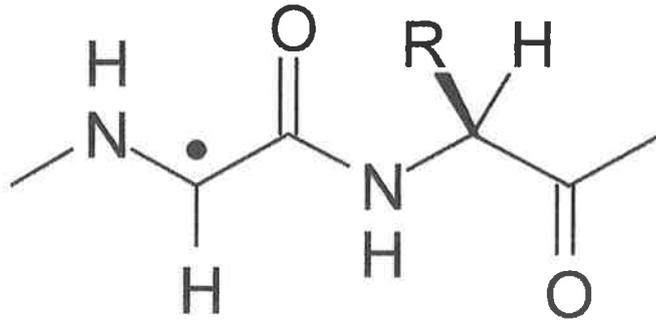


Figure IV.28 : Représentation de la structure d'un radical centré sur un carbone en  $\alpha$  sur la chaîne polypeptidique.

Pour la plupart des protéines étudiées sous irradiation (par exemple : collagène, gélatine, caséine et ovalbumine), ce type de doublet est généralement observé (Patten & Gordy, 1964 ; Copeland et al., 1968).

La configuration présentée sur la Figure IV.28 peut être induite par la perte d'un proton sur un groupement glycine (Annexe III). Les protéines contenant des quantités significatives de glycine, tels que le collagène ou la gélatine<sup>5</sup>, présentent après irradiation des spectres RPE avec le doublet caractéristique. Contrairement au collagène ou à la gélatine, les ongles contiennent une relativement faible quantité de glycine (25 mg.g<sup>-1</sup>). En RPE, il est cependant difficile d'estimer l'origine la plus probable d'un signal RPE uniquement à partir de la composition du matériau considéré car bien souvent des impuretés à l'état de traces peuvent générer des signaux relativement intenses, comme c'est par exemple le cas dans l'émail dentaire irradié. On peut ainsi noter que, bien que la teneur en alanine soit du même ordre que celle de la glycine, aucune contribution significative de l'alanine n'est observée dans le spectre RPE des ongles. L'alanine irradiée présente un spectre RPE avec une structure

<sup>5</sup> La glycine représente environ 30% et 20% des résidus dans le collagène et la gélatine

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

principale constituée d'un quadruplet. On ne peut pas pour autant en déduire que le doublet observé n'est pas lié au radical situé sur un groupement glycine. Les radicaux détectés à température ambiante sont issus de réactions multiples, notamment par le biais de réarrangements inter ou intra moléculaires, suite à la scission des polypeptides.

Cependant, il faut également souligner que des protéines ne contenant pas de glycine (par exemple : zeine, edestine et gliadine) peuvent également présenter ce type de doublet (Patten & Gordy, 1964). Les doublets de ce type présentent des raies plus larges que ceux associés à la glycine, comme pour le MIS3.

Drew & Gordy (1963) ont émis l'hypothèse que le doublet observé dans les spectres de protéines irradiées ne contenant pas de glycine, pouvait être de la forme du radical présenté sur la Figure IV.29. Dans ce cas, un doublet est observé si le groupe  $\text{CH}_2\text{X}$  est orienté de telle manière qu'un seul des protons sur le carbone en  $\beta$  soit couplé à la densité électronique du carbone en  $\alpha$ . Si l'on considère une orientation spécifique du plan  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-H}$  par rapport au plan contenant  $\text{C}_\alpha$ ,  $\text{C}_\beta$  et l'orbital  $p$  de l'électron non apparié, alors ce type de couplage peut se produire si l'on considère un phénomène d'hyper-conjugaison pour l'un des protons alors que pour l'orientation de la liaison  $\text{C}_\beta\text{-H}$  pour le second proton, le couplage devrait être trop faible pour être résolu.

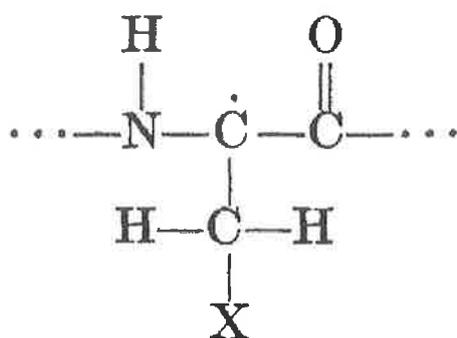


Figure IV.29 : Radical envisagé pour expliquer la présence de doublet dans des protéines irradiées ne contenant pas de glycine.

Le couplage du spin électronique avec un proton en  $\text{C}_\beta$  par un phénomène d'hyper-conjugaison est en première approximation donné par l'Equation IV. 1.

$$A = A_0 \cos^2 \theta \quad \text{Equation IV.1}$$

$A$  est la valeur du couplage et  $A_0$  la valeur du couplage quand la liaison  $\text{C}_\beta\text{-H}$  est dans le plan de l'orbitale  $\pi$  ( $\theta = 0$ ). La valeur de  $A_0$  dépend de la densité de spin dans l'orbitale  $p$  du carbone en  $\alpha$ .

Si l'on considère dans notre cas une valeur de 5 mT pour  $A_0$ , alors un couplage de 2,0 mT correspond un angle  $\theta$  d'environ  $50^\circ$  pour le proton couplé par hyper-conjugaison. Le deuxième proton sera alors orienté avec un angle de  $90^\circ$  ou  $170^\circ$ , ce qui correspond respectivement soit à  $A=0$  mT soit à un couplage de 4,8 mT. Si l'on considère une orientation

de 90°, au radical présenté sur la Figure IV.29 correspond bien un spectre RPE similaire au MIS3.

Cependant, il faut également considérer que les ongles contiennent des quantités significatives de valine, d'isoleucine et de thréonine. Ces trois acides aminés ont la caractéristique, si l'on considère le radical localisé sur la chaîne principale du polypeptide, de n'avoir qu'un seul proton en position  $\beta$  (acide aminé branché). De la même manière que précédemment, selon certaines orientations du plan contenant le  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ -H, un couplage avec une valeur de 2,0 mT peut être induit.

Au final, il est difficile de privilégier une hypothèse, seule une étude détaillée de l'isotropie du couplage hyperfin, permettra éventuellement de trancher entre les différentes hypothèses. En effet, les constantes de couplage pour le radical de la Figure IV.28 ou ceux éventuellement associé à la valine, l'isoleucine et la thréonine dépendent a priori de l'orientation dans le champ magnétique à l'inverse de la glycine.

Selon les hypothèses énoncées, les doublets associés aux deux dernières hypothèses devraient en théorie donner des raies moins larges que celles du doublet issu de la glycine. Or, ce n'est pas le cas. Comme ces différentes hypothèses sur l'origine du MIS3 ne sont pas incompatibles, il est très probable que les doublets issus de ces différents radicaux se superposent avec des constantes de couplage légèrement différentes ce qui peut induire un élargissement apparent des raies. Etant donné que le MIS3 ne constitue pas un problème du fait de son instabilité par rapport à l'analyse des raies dosimétriques, nous ne l'avons pas étudié de manière plus détaillée.

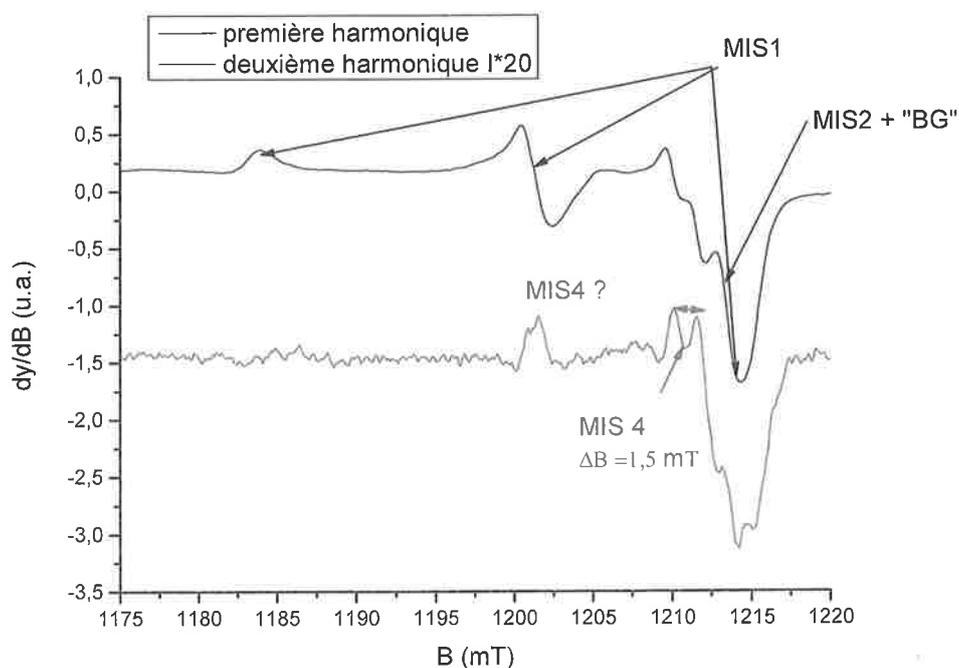
### B.3.3 Conclusion sur le MIS3

*Un signal lié au stress mécanique et constitué d'un doublet a été mis en évidence. Si un tel signal est courant dans les tissus kératinisés, la présence de ce signal suite à un stress mécanique est singulière. Ce signal nommé MIS3 décroît à température ambiante et en présence d'oxygène. Le MIS3 est lié à un radical centré sur un atome de carbone couplé avec un proton. Plusieurs localisations de ce radical sont envisageables sur la chaîne polypeptidique. Il est difficile d'en privilégier une et il est fort possible que toutes ces configurations contribuent au doublet du MIS3.*

### B.4 Etude et description du MIS4

Le MIS4 n'avait pas été identifié dans les travaux portant sur les ongles. Des mesures réalisées en deuxième harmonique en bande Q montrent que le MIS4 semble être constitué de deux raies avec un écart  $\Delta B$  entre les raies égales à 1,5 mT à environ  $g=2,01$  (Fig. IV.30). Ces raies sont difficilement observables en bande X du fait du manque de résolution et de la présence du MIS1. Dans la littérature, les spectres RPE présentés, que ce soit pour des ongles ou des protéines ou acides aminés irradiés, sont généralement mesurés en bande X, et il n'est donc pas fait mention de tels signaux. Ces deux raies mesurées en deuxième harmonique

réagissent de manière similaire vis-à-vis de la puissance micro-onde et décroissent au cours du temps dans les mêmes proportions jusqu'à disparition complète. Il semble donc que ces signaux aient pour origine un même radical et que ce radical soit également induit par le stress mécanique. Ces deux raies ne sont par ailleurs pas systématiquement observées dans les échantillons d'ongles stressés. De plus, l'amplitude de ces deux raies sature à une puissance micro-onde inférieure à celle du MIS1 mais supérieure à celle des composantes à  $g=2$ , ce qui nous indique que ce signal n'est pas lié à une composante déjà identifiée du MIS, mais qu'il s'agit bien d'un nouveau signal.



*Figure IV.30 : Mesures en première et deuxième harmonique d'un ongle stressé mécaniquement réalisées en bande Q à température ambiante à une puissance micro-onde de 10 mW, une fréquence de modulation de 100 kHz et une modulation d'amplitude de 0,3 mT. L'intensité du signal en deuxième harmonique a été multipliée par 20.*

Ces deux raies décroissent complètement à température ambiante et ne sont plus mesurées après humidification de l'ongle. Le MIS4 ne présente donc pas de problème particulier vis-à-vis de l'exploitation des signaux dosimétriques autour de  $g=2$ .

Il est fort probable que les deux raies visibles en bande Q en deuxième harmonique soient en fait une composante (possiblement  $g_2$ ) d'un signal plus complexe présentant une anisotropie du facteur  $g$  et éventuellement un couplage hyperfin. Si l'on considère une valeur de  $g_2=2,01$  avec un couplage de l'ordre de 1,5 mT, il peut s'agir de radicaux oxygénés de type sulfinyl ( $\text{RSO}^\circ$ ). Il a été montré que le radical sulfinyl est le produit final des réactions des radicaux thiyl et de l'oxygène (Sevilla et al., 1987). Dans de la cystéine irradiée et saturée en oxygène le radical sulfinyl a été identifié, avec  $g_1=2,025$ ,  $g_2=2,008$  et  $g_3=2,0027$ , avec une valeur de constante de couplage égale à 1,4 mT (Sevilla et al., 1987).

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

Afin de tenter de vérifier l'hypothèse du radical sulfinyl, nous avons stressé des ongles mécaniquement sous atmosphère inerte (azote gazeux) et conditionné les échantillons dans les mêmes conditions dans des tubes scellés. La Figure IV.31 permet de comparer des spectres RPE d'échantillons d'ongle préparés sous atmosphère normale et inerte. Les spectres RPE ont été mesurés en bande Q, car à cette fréquence, le radical sulfinyl est plus facilement mis en évidence, notamment sa composante  $g_2$ . Un délai inférieur à 15 minutes a été observé entre la préparation et la mesure. On peut noter, sur le spectre RPE sous azote, la présence du MIS3 qui indique que l'échantillon a bien subi un stress suffisant pour générer un MIS suffisamment intense pour être normalement détecté, d'autant plus que ce spectre a été mesuré à une puissance micro-onde de 10 mW, condition dans laquelle le MIS3 est déjà en régime de saturation. La composante  $g_2$  du radical sulfinyl est à peine discernable du bruit de fond du spectre sur le spectre mesuré sous azote alors que toutes les autres composantes sont détectées (MIS1, MIS2 et MIS3). On peut noter également que le radical perthiyl (MIS1) est, de manière surprenante, peu intense par rapport aux composantes du MIS autour de  $g=2$ . Sous atmosphère inerte, la décroissance de ces composantes doit être beaucoup plus faible, ce qui modifie le ratio entre le MIS1 et le MIS2 et MIS3. Ce ratio doit être normalement plus élevé lorsque les échantillons sont placés sous atmosphère inerte, ce qui peut expliquer l'apparente faible intensité du MIS1 par rapport au MIS3. Pour le MIS4, l'effet différencié des deux atmosphères sur la formation du MIS4 nous indique que l'oxygène semble jouer un rôle dans la formation du MIS4, ce qui est compatible avec l'hypothèse du  $RSO^\circ$ .

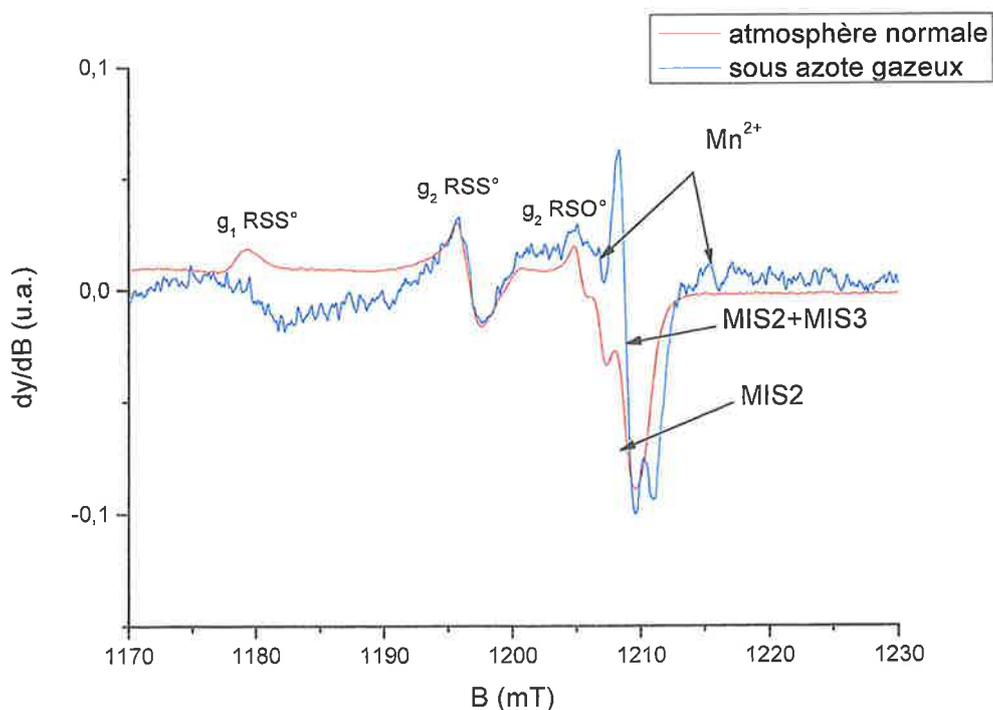


Figure IV.31 : Spectres RPE mesurés en bande Q à température ambiante à une puissance de 10 mW, pour un échantillon stressé et mesuré d'une part à atmosphère normale et d'autre part sous atmosphère inerte.

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

Afin de confirmer l'hypothèse du  $\text{RSS}^\circ$  pour le MIS4, des simulations de spectres en bande Q et X ont été réalisées sur la base des caractéristiques du  $\text{RSO}^\circ$  mesurées dans la cystéine par Sevilla et al. (1987). Les résultats des simulations réalisées avec le logiciel SimFonia des radicaux  $\text{RSS}^\circ$  et  $\text{RSO}^\circ$  sont donnés sur les Figures IV.32 et IV.33. La simulation de ces composantes permet de reproduire l'allure générale des spectres RPE mesurés tant en bande X qu'en bande Q. En bande Q, la composante  $g_2$  du  $\text{RSO}^\circ$  ne se superpose pas à d'autres signaux et peut être mesurée isolément, alors qu'en bande X, la raie bas champ du doublet de cette composante se superpose avec la composante  $g_2$  du  $\text{RSS}^\circ$ , comme par ailleurs, la composante  $g_3$  de  $\text{RSO}^\circ$ .

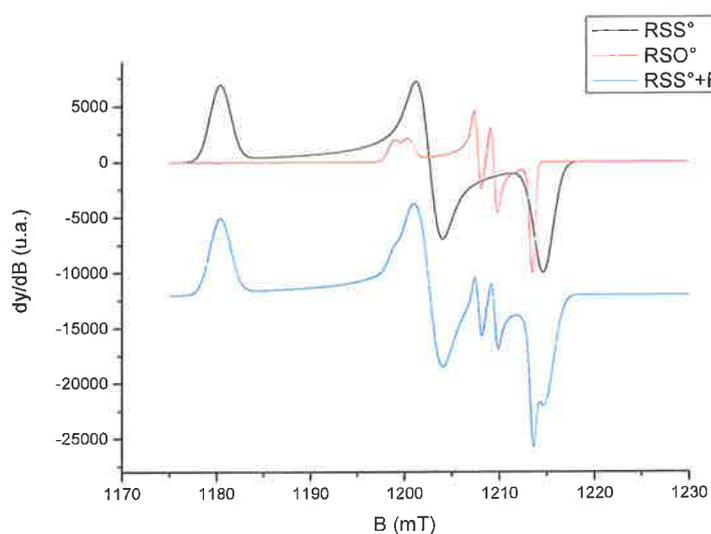


Figure IV.32 : Simulation des spectres des radicaux  $\text{RSO}^\circ$  et  $\text{RSS}^\circ$  en bande Q.

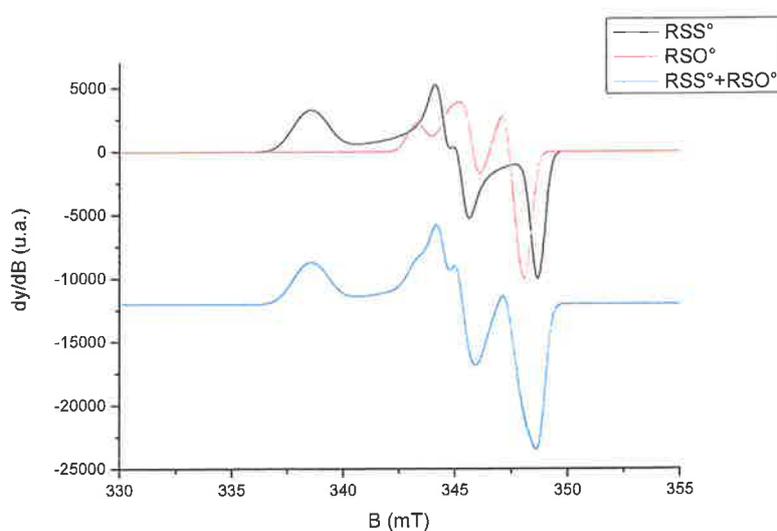


Figure IV.33 : Simulation des spectres des radicaux  $\text{RSO}^\circ$  et  $\text{RSS}^\circ$  en bande X.

La présence de ce radical permet d'interpréter les différences entre les deux spectres du MIS mesurés en bande X à des délais différents après coupe présentés sur la Figure IV.34. Il est intéressant de noter que la simulation reproduit très bien le spectre mesuré 5 minutes après coupe. La différence observée entre les deux spectres de la Figure IV.34, notamment autour de la composante  $g_2$  du  $RSS^\circ$ , peut être expliquée par la disparition du  $RSO^\circ$  entre ces deux mesures. La présence de  $RSO^\circ$  après coupe est responsable de l'élargissement apparent de la composante  $g_2$  du  $RSS^\circ$  (Fig. IV.34, point n°1) et également d'une modification visible du rapport de l'intensité des deux raies constituant la composante  $g_2$  du  $RSS^\circ$  (Fig. IV.34, point n°2).

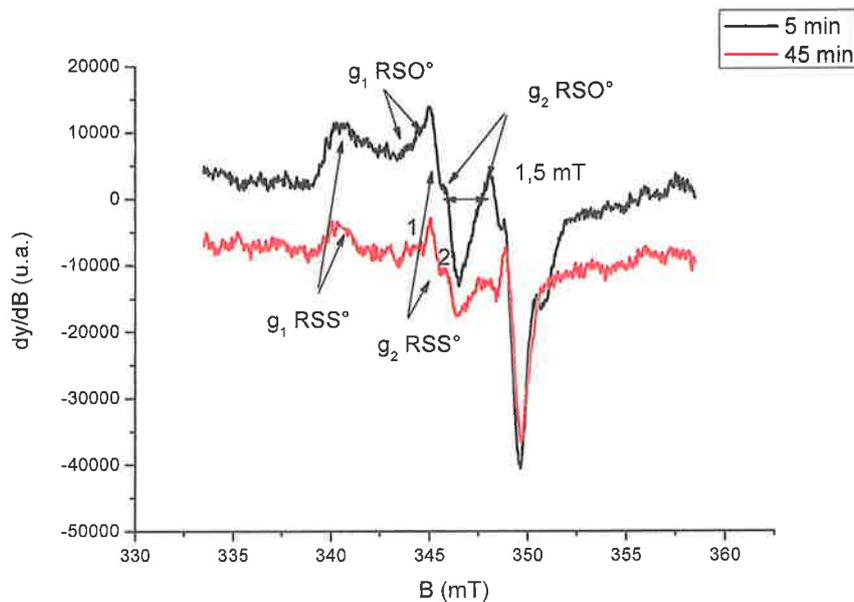


Figure IV.34 : Spectre RPE d'un ongle coupé mesuré en bande X à température ambiante 5 et 45 minutes après coupe.

A ce stade, il n'a pas été jugé utile de poursuivre les investigations concernant le MIS4, ce radical instable dans des conditions normales de température et d'atmosphère n'interfère pas avec les composantes du RIS utilisé pour l'estimation des doses. Les techniques de RPE pulsée, notamment en bande Q, pourraient s'avérer fort utile pour confirmer la nature du radical associé au MIS4.

*L'hypothèse la plus probable concernant le radical associé au MIS4 est le radical sulfinyl.*

#### B.4.1 Conclusion sur le MIS4

*Le MIS4 constitue une nouvelle composante du MIS qui n'avait pas encore été identifiée. Le MIS4 est un signal instable dans les conditions normales de température et d'atmosphère, qui décroît complètement en quelques minutes. Le MIS4 ne présente donc pas de problème particulier vis-à-vis de la mesure des espèces radio-induites stables. L'hypothèse retenue quant à la nature du radical associé au MIS4 est un radical sulfinyl ( $RSO^\circ$ ).*

## **B.5 Etude et description de la composante isotrope autour de $g=2$**

La description et la compréhension de cette composante est importante car elle se superpose au signal radio-induit (RIS) avec des caractéristiques très similaires (Symons et al., 1995 ; Trompier et al., 2007). Nous avons vu au début de ce chapitre que cette composante était constituée du MIS2 et du « BG » dont une partie semble être induite également par le stress mécanique. Il s'agissait donc principalement de déterminer la nature du « BG », car, qu'il s'agisse d'une composante stable du MIS et/ou d'un signal intrinsèque, cette composante du MIS est celle qui pourrait limiter l'analyse du RIS dans cette région. La compréhension de ce signal est donc cruciale pour développer des méthodes permettant de prendre en compte l'amplitude du « BG » lors de l'estimation de l'amplitude du RIS.

### **B.5.1 Description générale de la composante isotrope**

Après décroissance des composante instables du MIS (MIS1, MIS2, MIS3 et MIS4), le signal résiduel mesuré à  $g=2,004$  correspond à la définition du « BG » dans Symons et al. (1995). Nous avons mis en évidence précédemment que ce signal résiduel était en fait en partie induit par le stress mécanique appliqué. La dénomination « BG » dans le sens d'un signal intrinsèque n'est donc pas approprié à ce signal. Le « BG » mesuré en bande X présente des caractéristiques spectrales très proches de la composante isotrope mesurée après coupe autour de  $g=2$  (MIS2) ( $g=2,004$  et  $\Delta B=0,8$  mT).

Cependant, si après prélèvement de l'échantillon et stabilisation du signal, l'échantillon est humidifié, l'intensité du « BG » précédemment mesuré et considéré comme stable est considérablement réduite (Fig. IV.35). L'intensité du signal mesuré après humidification n'évolue pas dans le temps du moins sur des durées de l'ordre de 24 heures. Si le traitement dans l'eau est prolongé ou répété, l'intensité de ce signal demeure inchangée, du moins, si l'échantillon est suffisamment séché avant mesure pour permettre des mesures reproductibles. Ce signal peut donc être considéré comme un signal résiduel et nous le nommerons par la suite « BG » pour garder la nomenclature utilisée dans les publications. Cette composante présente les mêmes caractéristiques spectrales que le MIS2.

Le signal résiduel mesuré après coupe est donc constitué d'un signal qui réagit fortement avec l'humidité et d'une autre composante dont l'amplitude n'est pas affectée par ce paramètre. Compte tenu que le MIS2 possède à température ambiante des temps de demi-vie relativement longs par rapport aux autres espèces (MIS3 et MIS4), la déshydratation peut ralentir la décroissance jusqu'à la stopper. La déshydratation d'un ongle fraîchement prélevé et laissé à température ambiante intervient rapidement (perte de l'ordre de 5% en masse de l'ongle en 1 heure). De ce fait, le MIS2 ne décroît pas complètement dans les conditions de température et d'humidité du laboratoire. Ainsi, le signal stabilisé après coupe, défini comme intrinsèque par Symons et al. (1995), est en fait constitué par le MIS2 dont la décroissance est

stoppée par la déshydratation et d'un vrai signal résiduel dont la nature reste à définir. Il peut soit s'agir d'un signal intrinsèque, soit d'une composante stable du MIS.

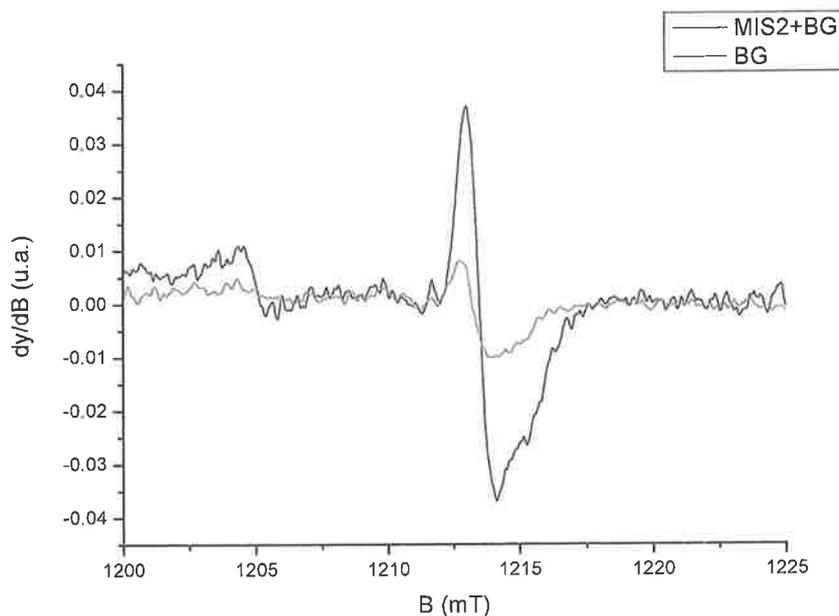


Figure IV.35 : Mesure d'un ongle stressé après stabilisation des signaux induits après coupe (en noir) et après une humidification de 10 minutes dans de l'eau distillée suivi de 12 heures dans un dessiccateur (en rouge). Mesures réalisées en bande Q à une puissance de 1 mW à température ambiante.

*Le « BG » tel qu'il avait été défini ne correspond pas à un signal résiduel. Le signal stabilisé mesuré après coupe est en fait très probablement constitué du MIS2 qui n'a pas décré complètement du fait de la déshydratation de l'ongle et d'un signal stable dont l'intensité n'est pas modifiée par une humidification. Ce signal stable est nommé « BG » et est défini comme le signal résiduel mesuré après humidification de l'ongle.*

### B.5.2 Etude de la relation entre le stress mécanique et l'intensité du MIS2 et du « BG »

Précédemment, nous avons déjà établi que le MIS2 était bien induit par le stress mécanique. La Figure IV.36 permet de mettre en évidence la relation de proportionnalité entre le stress mécanique et l'intensité du MIS2. L'intensité du MIS2 a été évaluée sur des spectres mesurés en quadrature de phase, pour s'affranchir de la présence du MIS1. Les mesures ont été réalisées sur des ongles déshydratés et dans un délai total court (durée totale de 20 minutes) vis-à-vis de la décroissance du MIS2 à ces taux d'humidité.

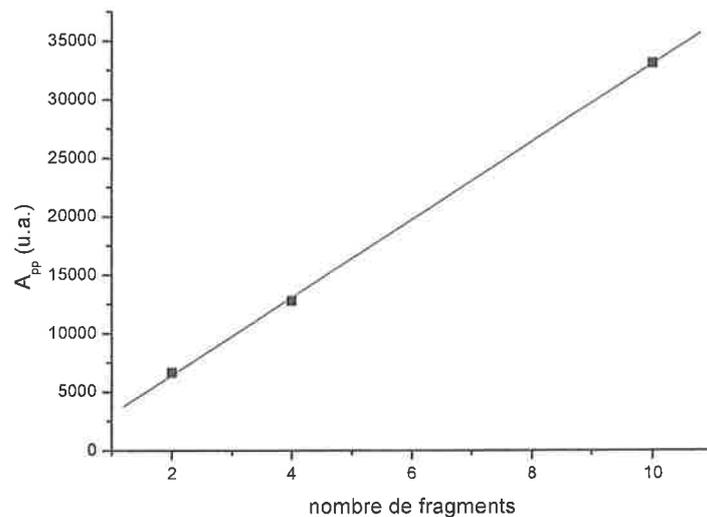


Figure IV.36 : Variation de l'amplitude pic à pic du MIS1 et du MIS2 en fonction du nombre de fragments dans l'échantillon d'ongle.

De la même manière que pour le MIS1, un effet d'orientation est observé sur l'intensité du MIS2 (Fig. IV.18). Une coupe réalisée perpendiculaire au bord libre génère une production de radicaux plus importante qu'une orientation de coupe parallèle au bord libre.

Pour déterminer si le « BG » est induit par le stress mécanique, nous avons également étudié la variation de l'intensité de ce signal en fonction du stress mécanique. Après chaque coupe, l'ongle a été humidifié au niveau de chaque bord de coupe puis séché pour ne pas perturber la mesure RPE. La Figure IV.37 présente les résultats obtenus pour l'étude de l'intensité du « BG » en fonction du nombre de coupes. L'intensité du « BG » n'augmente pas comme pour le MIS1 ou le MIS2 en fonction du nombre de coupes réalisées. L'intensité du « BG » diminue jusqu'à cinq coupes successives et semble ensuite ne plus évoluer pour les coupes suivantes.

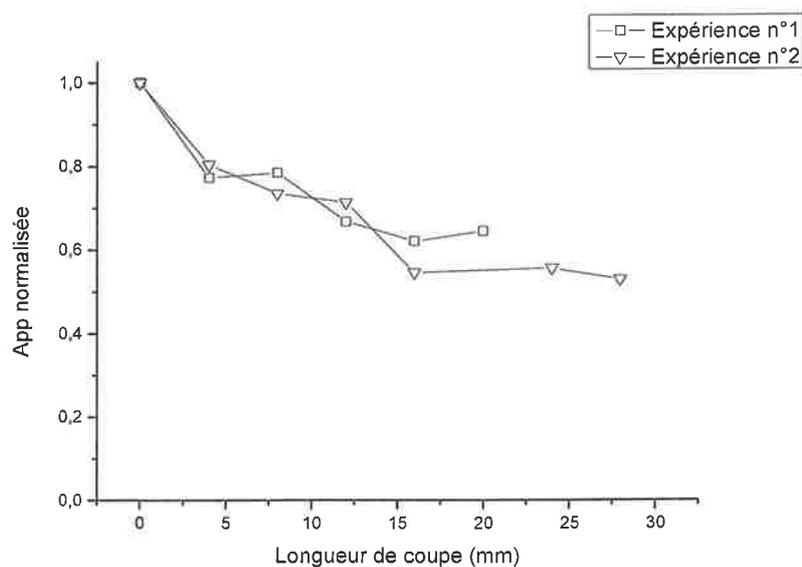


Figure IV.37 : Variation de l'amplitude pic à pic du « BG » en fonction du nombre de fragments dans l'échantillon d'ongle

**Il semble donc que le « BG », dans sa nouvelle définition (signal résiduel après humidification), ne soit pas induit par le stress mécanique, mais qu'il s'agit bien d'un signal intrinsèque à l'ongle ou d'un signal induit par un autre type de stress, comme les rayonnements ultraviolets par exemple.**

Sans les données présentées dans la partie traitant de la stabilité du « BG », il est difficile de donner une interprétation de la courbe présentée sur la Figure IV.37. Nous verrons que l'intensité du « BG » mesurée après humidification augmente dans le temps jusqu'à atteindre environ deux fois la valeur initiale et qu'une nouvelle humidification ramène l'amplitude du « BG » à sa valeur initiale. Dans cette expérience, seul le bord de coupe des ongles utilisés avait été humidifié juste avant la première mesure, donc l'amplitude du « BG » était à sa valeur maximale lors de la première mesure. L'humidification progressive de l'ongle, par humidification des coupes successives, amène probablement au bout de cinq coupes à humidifier la totalité de l'ongle, ce qui entraîne une diminution d'un facteur 2 de la valeur initiale de l'amplitude du « BG » comme nous le verrons dans le prochain paragraphe.

Lors de l'analyse des signaux dosimétriques, l'amplitude mesurée du RIS doit être corrigée de celle du « BG », car celui-ci se superpose aux signaux dosimétriques. Il semble donc important de connaître plus avant la nature du « BG », son mode de production, la variabilité inter et intra personne. Tous ces éléments pourraient permettre de mieux évaluer l'amplitude du « BG » lors de l'estimation de l'intensité du RIS et donc permettre de mieux estimer les doses. Ce signal est peu intense, ce qui empêche par exemple l'utilisation des techniques avancées de RPE, tel que la RPE pulsée. Nous avons néanmoins pu étudier la stabilité de ce signal et commencer à réaliser des études de variabilité. Ces études sont présentées dans les paragraphes suivants.

***Nous avons pu confirmer que le MIS2 était bien induit par le stress mécanique et qu'un effet d'orientation de la coupe était observée comme pour le MIS1. Le « BG », signal résiduel mesuré après humidification de l'ongle, n'est pas induit par le stress mécanique.***

### **B.5.3 Etude de la stabilité du MIS2 et du « BG »**

Nous avons déjà mis en évidence que le MIS2 et le « BG » réagissaient de manière différente vis-à-vis de l'humidité, le « BG » étant a priori insensible à ce paramètre, du moins des bains répétés dans de l'eau n'affectent pas son amplitude, alors que le MIS2 est complètement réduit. Dans cette partie nous étudions les différents paramètres pouvant affecter la stabilité de ces deux signaux. L'effet de la température a été étudié pour le MIS2 et le « BG », tandis que pour l'humidité et les ultrasons, seule l'étude de l'effet sur la stabilité du « BG » a été réalisée (le MIS2 étant éliminé par une hydratation de quelques secondes).

**B.5.3.1 Effet de la température sur la stabilité du MIS2 et du « BG »**

Des mesures selon des schémas expérimentaux isothermes et isochrones ont été réalisées. Les courbes sont présentées sur les Figures IV.38 et IV.39. Sur la Figure IV.38, on peut noter que la constante de décroissance du MIS2 est fonction de la température. Une élévation de la température de stockage induit une augmentation de la cinétique de transformation des espèces radicalaires liées au MIS2. Pour les mêmes raisons que pour le MIS1, du fait de l'impact de l'humidité, nous n'avons pas cherché à vérifier si la décroissance de ce signal suivait la loi d'Arrhenius. Jusqu'à une température de stockage de 100°C, nous n'avons pas mis en évidence d'influence de la température sur l'amplitude du « BG » (Fig. IV.39). A 40°C, condition de température proche de la température in vivo, même sur des durées plus importantes, aucun effet n'a été observé.

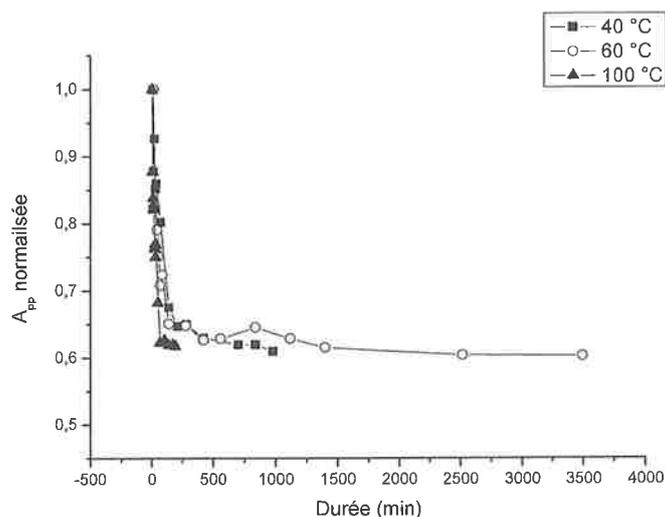


Figure IV.38 : Variation de l'amplitude au cours du temps du MIS2 pour différentes températures de stockage.

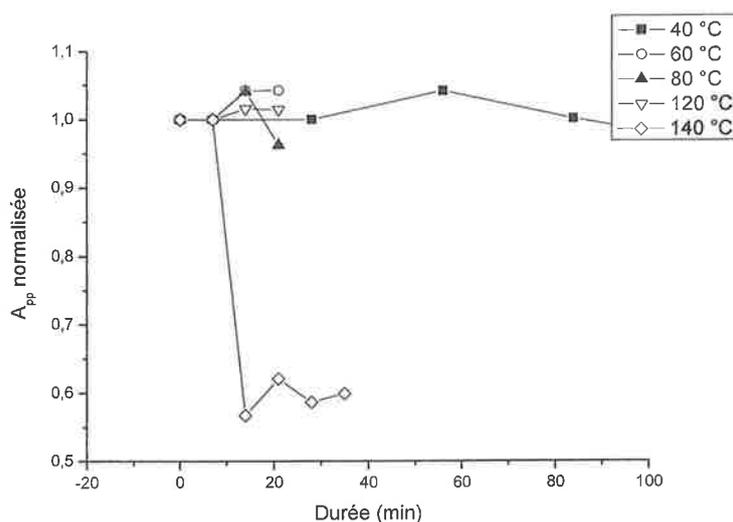


Figure IV.39 : Variation de l'amplitude au cours du temps du BG pour différentes températures de stockage.

Sur les courbes isochrones présentées sur la Figure IV.40, on peut noter que le « BG » présente une stabilité thermique plus importante que le MIS2, ce qui est parfaitement cohérent avec les courbes isothermes mesurées. Pour le « BG », une décroissance de l'amplitude du signal est observée à partir de 120°C, alors qu'elle intervient dès 40°C pour le MIS2.

Ceci confirme que ce que Symons et al. (1995) avait identifié comme un signal natif ou intrinsèque, était en fait le MIS2, probablement stabilisé par déshydratation. En effet, Symons et al. (1995) avait noté une décroissance de ce signal dès 45°C.

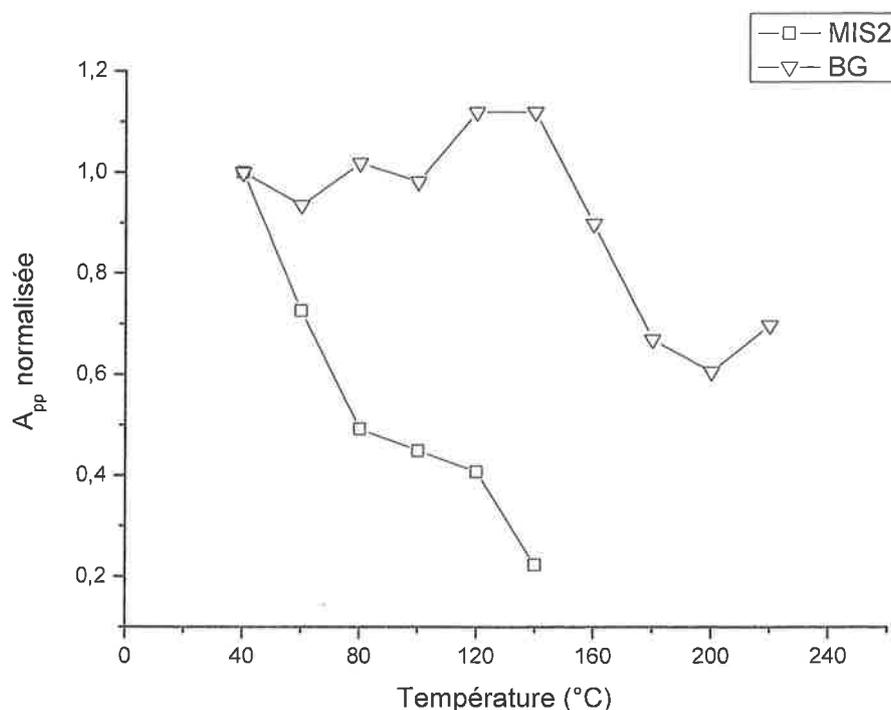


Figure IV.40 : Variation de l'amplitude pic à pic du BG et du MIS2 selon un traitement thermique isochrone ( $\Delta T=20^{\circ}\text{C}$ ,  $\Delta t=20$  min).

### B.5.3.2 Effet de l'humidité sur le BG

Précédemment nous avons établi que le BG pouvait être considéré comme stable sur une période de 24 heures. Sur des périodes plus longues, nous avons mis en évidence une augmentation de l'intensité du signal mesuré à la valeur de g correspondant au « BG » (Fig. IV.41).

deux radicaux (Fig. IV.44). Lorsque l'ongle se déshydrate, les molécules d'eau migrent vers l'extérieur et les espèces redeviennent alors paramagnétiques. Ce type de phénomène est envisageable si les espèces liées au BG sont disposées de manière régulière et si elles peuvent se trouver en vis-à-vis, donc dans une architecture bien déterminée, ce qui est compatible avec une localisation sur les polypeptides du fait de leur configuration en hélice. Seuls les radicaux possédant en vis-à-vis un même type de radical sont rendus silencieux.

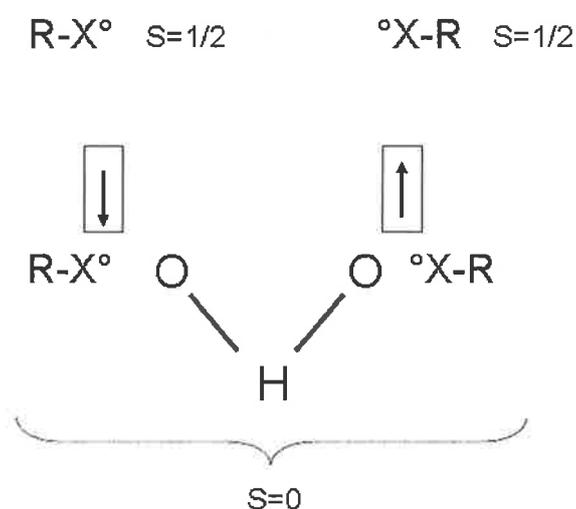


Figure IV.44 : Représentation de l'effet de l'eau sur les radicaux associés au « BG ».

### **B.5.3.3 Effet des ultrasons sur le BG**

Les ultrasons<sup>6</sup> sont connus pour jouer un rôle sur les réactions chimiques et avoir un effet mécanique sur les structures chimiques. Les effets des ultrasons sur les réactions chimiques ont été mis en évidence dès 1927 (Richard & Loomis, 1927), et sont regroupés sous le terme de sonochimie. Ainsi, il n'est pas surprenant que les ultrasons puissent avoir un effet sur l'intensité des signaux mesurés en RPE. Cet effet est dépendant du type de radical considéré et également de la fréquence et de la puissance des ultrasons utilisés. Les effets des ultrasons sur les radicaux sont expliqués par les fondements théoriques sur lesquels repose la sonochimie (Barnett, 1953). L'ensemble des effets induits par les ultrasons sont principalement induits par des phénomènes de cavitation. De nombreux laboratoires de dosimétrie RPE utilisent les bains à ultrasons pour réduire les temps de préparation de leurs échantillons et améliorer l'efficacité des traitements. Cependant, les effets des ultrasons sur les signaux mesurés n'ont pas toujours été étudiés, bien que cela puisse parfois présenter des avantages. Dans les tissus osseux, par exemple, nous avons pu noter un effet différencié des ultrasons sur le MIS et le RIS, l'amplitude du MIS étant significativement réduite sans pour autant affecter celle du RIS. La Figure IV.45 rend compte de l'effet d'un bain à ultrason de fréquence 35 kHz sur l'intensité du « BG ». Après 45 minutes de bain, l'amplitude du « BG » est significativement réduite et la réduction du signal au delà de cette durée ne semble plus

<sup>6</sup> Fréquences comprises entre 20 kHz et 10 MHz

#### Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

effective. Au bout de 45 minutes de bain, l'amplitude du « BG » a été réduite d'un facteur 5, c'est-à-dire à un niveau proche des limites de détection du spectromètre. Un bain d'une durée équivalente dans l'eau n'a pas d'effet sur l'amplitude du « BG » d'un ongle non déshydraté. Cet effet sera comparé dans la partie suivante à l'effet obtenu sur les composantes stables du RIS, afin de déterminer s'il est possible de tirer avantage d'un éventuel effet différencié pour soit éliminer sélectivement l'une des composantes, soit la réduire de manière significative et reproductible pour permettre d'estimer les contributions respectives du « BG » et du RIS. Si un tel effet est observé, une étude détaillée sera alors nécessaire pour optimiser la fréquence et la puissance des ultrasons, les conditions de température, les temps de traitement et la variabilité de l'effet.

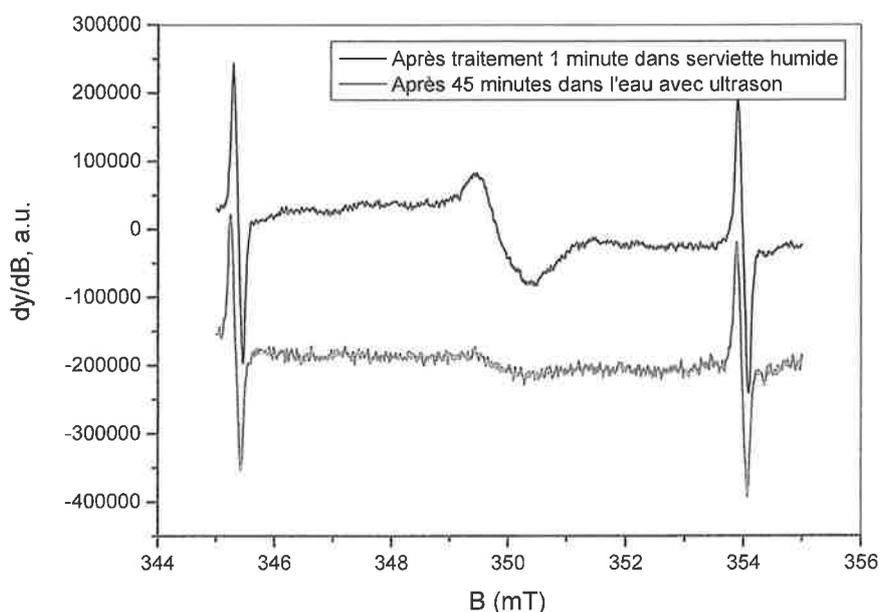


Figure IV.45 : Effet d'un traitement aux ultrasons (35 kHz) à l'eau distillée sur le signal RPE d'origine mécanique, mesure réalisée avec une puissance micro-onde de 2 mW et une amplitude de modulation de 0,3 mT.

*Le caractère instable du MIS2 a été confirmé. La température comme l'humidité permettent d'éliminer le MIS2. Le « BG » est un signal stable thermiquement et des humidifications répétées n'ont pas d'influence sur son amplitude. Lorsque l'ongle se déshydrate, l'amplitude du « BG » augmente au cours de temps de manière reproductible. Ce phénomène est probablement lié à la déshydratation des ongles, une ré-humidification des ongles ramène l'amplitude du BG à son niveau initial. Ce phénomène n'est a priori pas lié à des transformations de radicaux, mais à la connexion de deux radicaux par une molécule d'eau qui rend le tout silencieux du point de vue RPE. Les ultrasons permettent de réduire de manière significative l'amplitude du « BG ».*

#### **B.5.4 Etude de la variabilité du « BG »**

Comme nous le verrons dans le chapitre V, le « BG » se superpose aux signaux dosimétriques les plus stables et il n'est a priori pas possible de les distinguer ou de les mesurer de manière sélective. En conséquence, quelque soit la méthode d'estimation des doses (courbe d'étalonnage ou méthode des ajouts dosés), il est nécessaire de connaître l'amplitude du « BG » pour pouvoir estimer celle du RIS et la convertir en dose. Dans ce cas, l'incertitude sur la dose estimée mais également la limite de détection associée seront fortement dépendantes de l'incertitude associée sur l'amplitude du « BG ».

A ce stade, nous n'avons pas de méthode permettant de mesurer sélectivement le « BG » ou le RIS. Ainsi l'amplitude du « BG » utilisée pour estimer les doses dans le cas du tri de population, ne pourra être estimée qu'à partir d'une valeur moyenne obtenue par la mesure d'un échantillonnage d'ongle. C'est-à-dire que les limites de détection et les incertitudes associées sont directement liées à la variation observée sur l'amplitude du « BG ». Dans les paragraphes précédents, nous avons mis en évidence que le taux d'hydratation de l'ongle avait une influence sur l'amplitude du « BG ». Dans le chapitre III, nous avons vu que la présence de  $Mn^{2+}$ , parce que sa structure fine se superpose avec le « BG », pouvait être également une cause de variabilité. Dans ce paragraphe nous discutons de l'influence de ces deux paramètres sur l'évaluation de l'amplitude du « BG ».

##### ***B.5.4.1 Influence de la structure fine du $Mn^{2+}$ sur l'amplitude du « BG »***

Si les mesures sont réalisées en bande Q, la présence de la structure fine du  $Mn^{2+}$  mise en évidence dans le chapitre III, peut interférer avec le « BG » comme le montrent les Figures IV.46 et IV.47. Dans le cas d'une concentration relativement importante de  $Mn^{2+}$  dans les ongles, on peut noter que l'allure de la raie du « BG » est significativement modifiée, en effet, celle-ci est élargie et dissymétrique. Ceci nous indique que la structure fine du  $Mn^{2+}$  interfère avec le « BG ». Si l'on cherche à évaluer une valeur moyenne du « BG », cette contribution peut induire un biais ou plutôt un terme additif dépendant de la concentration en  $Mn^{2+}$  de chaque biopsie d'ongle étudié. De plus, nous avons vu que la contribution du  $Mn^{2+}$  pouvait varier en fonction de l'orientation dans le champ magnétique. Ainsi, il conviendra de réaliser l'ensemble des mesures avec l'orientation permettant de minimiser la contribution du  $Mn^{2+}$ .

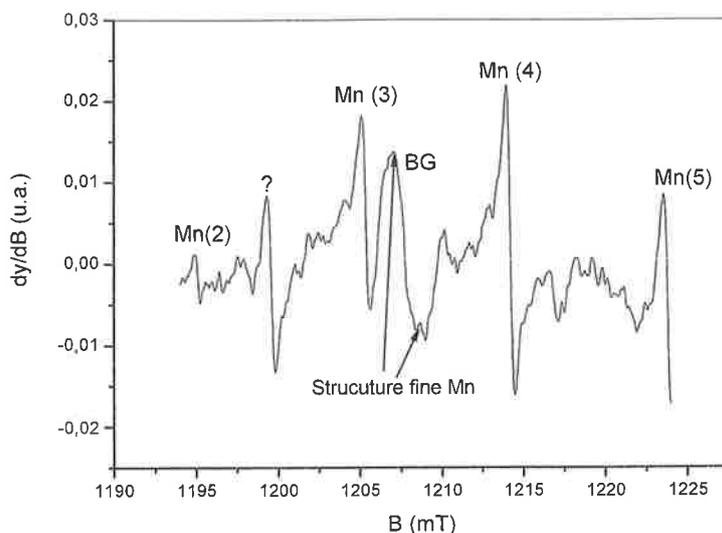


Figure IV.46 : Mesure du « BG » en bande Q avec une concentration relativement importante de  $Mn^{2+}$  dans les ongles. Mesure réalisée à température ambiante à une puissance micro-onde de 1 mW.

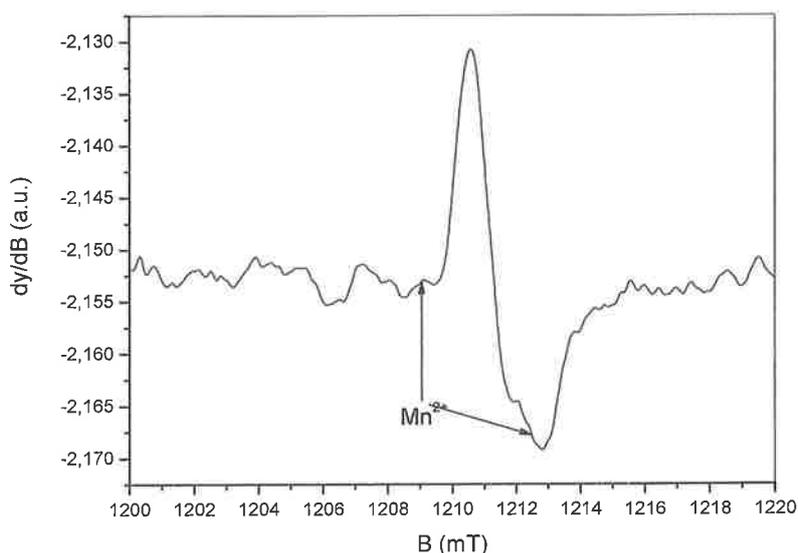


Figure IV.47 : Mesure du « BG » en bande Q avec une concentration relativement faible de  $Mn^{2+}$  dans les ongles. Mesure réalisée à température ambiante à une puissance micro-onde de 1 mW.

#### B.5.4.2 Influence de l'humidité de l'ongle sur l'amplitude du « BG »

Dans le paragraphe B.5.3.2 nous avons mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de l'amplitude du « BG » et la déshydratation de l'ongle. Il est évident que si les durées de bain ou les délais entre humidification et mesure ne sont pas maîtrisés correctement, il peut alors en résulter une dispersion plus importante des valeurs mesurées. Cet effet peut induire des erreurs au niveau de l'estimation de doses, des incertitudes de mesure plus grandes et également, comme nous le verrons dans le prochain paragraphe, augmenter significativement les limites de détection de la technique.

#### *Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles*

La maîtrise de ces paramètres est cruciale et il n'est pas aussi simple qu'il peut paraître de les contrôler. En effet, si l'on considère des ongles d'épaisseurs très différentes (ce qui est le cas entre les orteils et les ongles des mains), il n'est pas évident qu'une même durée de traitement permette par exemple de réduire dans les mêmes proportions le « BG ». De la même manière, un ongle dont le taux d'hydratation est très faible, peut nécessiter une durée de traitement plus longue que par exemple un ongle fraîchement prélevé avec un taux d'hydratation proche de la teneur *in vivo*. Nous n'avons pas mené une étude exhaustive permettant de déterminer la durée de bain minimale nécessaire pour minimiser le « BG » quelque soit les caractéristiques des ongles, mais dans Romanyukha et al. (2009) nous avons observé que pour des ongles déshydratés, il était parfois nécessaire de réaliser des bains jusqu'à des durées de 20 minutes. Dans Romanyukha et al. (2009), nous avons publié des données sur la variabilité du « BG » obtenues sur un échantillonnage d'ongles provenant de dix donneurs différents. Il est intéressant de réinterpréter ces données à la lumière de l'effet de l'humidité sur le « BG » mis en évidence dans le paragraphe B.5.4.1. Dans cette publication, les ongles étaient humidifiés après prélèvement pendant 10 minutes, ce qui a pour effet de minimiser a priori l'amplitude du « BG » comme nous l'avons vu précédemment (B.5.4.1). Les mesures RPE ont toutes été réalisées moins de 24 heures après les prélèvements. Les ongles ont été préparés et mesurés dans des conditions aussi reproductibles que possible, seuls les délais entre prélèvement et mesure étaient variables. L'écart-type relatif sur la distribution de l'amplitude du « BG » que nous pouvons calculer à partir de ces données publiées est de 13,3 %. Pour mettre en évidence le rôle de l'humidité sur la variabilité du « BG », nous avons choisi de représenter les données publiées sous forme de graphique en fonction du délai entre prélèvement et mesure (Fig. IV.48). Si nous corrigeons les valeurs mesurées de l'augmentation du « BG » du fait de la déshydratation, l'écart-type est alors réduit à 8,1 %. La correction a été réalisée à partir de la fonction linéaire (Fig. IV.28) qui permet le meilleur accord avec les données expérimentales. Lorsqu'il s'agira d'estimer les valeurs moyennes du « BG » sur un échantillonnage d'ongles représentatifs de la population ou éventuellement pour des classes de population prédéfinies (enfants et personne âgée par exemple), il conviendra de définir le délai optimal entre hydratation et mesure et de définir les conditions de séchage (air libre, dessiccateur, four, etc.) le plus scrupuleusement possible pour limiter la variabilité des valeurs de l'amplitude du « BG ».

Comme nous le verrons dans le chapitre V, la composante la plus stable du RIS (le RIS5) présente une signature similaire à celle du « BG ». Il n'est donc pas possible de différencier dans le signal mesuré la contribution du « BG » de celle du RIS. Ainsi, il est nécessaire pour estimer une dose, de connaître l'amplitude du « BG », qui sera soustraite à l'amplitude du signal mesuré pour en déduire la composante radio-induite. Pour l'estimation de dose, les mêmes exigences devront donc être respectées pour minimiser les biais de mesure liés à la variation d'amplitude du « BG ».

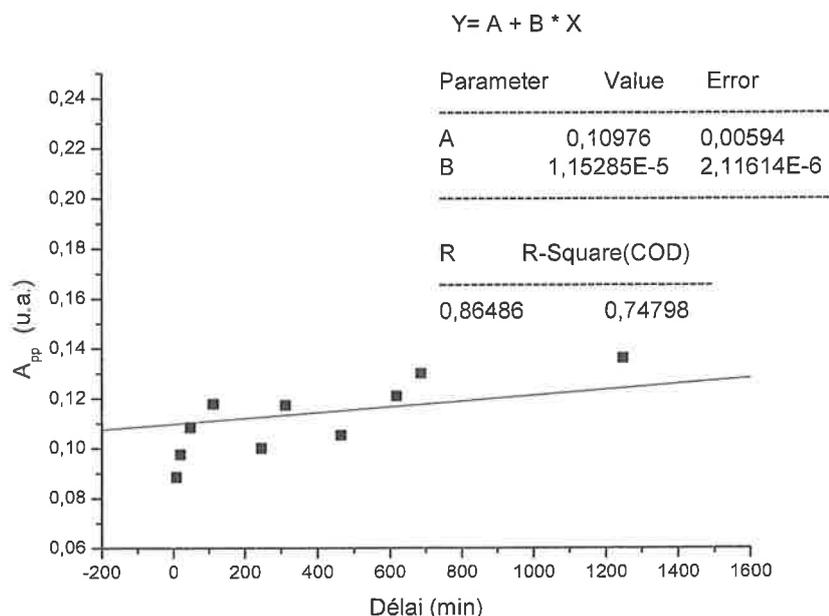


Figure IV.48 : Variation de l'amplitude pic à pic du « BG » en fonction du temps écoulé entre le prélèvement et la mesure des ongles. Les échantillons sont humidifiés après prélèvements. Graphique réalisé d'après les données publiées dans Romanyukha et al. (2009).

L'estimation de l'amplitude du « BG » nécessaire à une évaluation des doses nécessite une maîtrise des conditions de préparation de l'échantillon, principalement l'étape d'humidification. L'humidification des ongles devra être suffisamment longue pour palier les différences liées à l'épaisseur des ongles ou du taux d'hydratation initial. Le délai entre l'humidification et la mesure a une influence notable sur la variabilité observée sur l'amplitude du « BG ». Pour limiter cet effet, il conviendra de respecter rigoureusement les conditions définies pour la préparation des échantillons, notamment les conditions de séchage et le délai entre humidification et mesure RPE.

#### B.5.4.3 Influence de l'humidité de l'ongle sur la limite de détection en dose et l'estimation des doses

Pour déterminer la composante liée au « BG » dans le signal mesuré, nous n'avons pas de méthodologie établie nous permettant de mesurer de manière sélective le « BG ». Ceci implique qu'il faudra estimer les doses à partir d'une valeur moyenne du « BG ». Dans ce cas, la limite de détection dépend directement des incertitudes sur l'amplitude du « BG ». Selon la méthode proposée par Currie (1999), la limite de détection est alors exprimée selon l'Equation IV.2.

$$LD = k \times \sigma_{BG} \times a \quad \text{Equation IV.2}$$

## *Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles*

avec  $\sigma_{BG}$  l'incertitude sur l'amplitude du « BG »,  $a$  le coefficient de sensibilité à la dose et  $k$  le coefficient de niveau de confiance.

Comme nous le verrons par la suite, une dose de 2 Gy induit au mieux une augmentation de signal par rapport à l'intensité du « BG » d'environ 20%. Si l'on considère la valeur moyenne du « BG » estimée sur dix échantillons et l'écart-type associé calculé à partir des données reportées dans Romanyukha et al. (2009), la limite de détection est alors de l'ordre de 3,5 Gy. En corrigeant les données de la Figure IV.48 par la fonction d'ajustement décrivant l'évolution du « BG » en fonction du temps écoulé entre prélèvement et mesure, l'écart-type relatif est alors réduit à 8 %, soit une valeur de limite de détection associée d'environ 2,1 Gy. On comprend alors tout l'intérêt de maîtriser au mieux les conditions de préparation des échantillons. La maîtrise de ces conditions permet donc de diminuer les limites de détection mais également de réduire les incertitudes sur les estimations des doses. En effet pour des doses de l'ordre de quelques Gy, c'est le « BG » qui contribue majoritairement au signal mesuré. L'incertitude sur l'estimation de l'amplitude du « BG » contribuera donc de manière significative à celles des estimations des doses.

***La limite de détection et les incertitudes sur les doses sont significativement dépendantes de l'incertitude associée à l'amplitude du « BG ». La variabilité observée sur l'amplitude du « BG » peut être réduite si les conditions d'humidité des ongles sont parfaitement contrôlées. Dans ces conditions, il est crucial de maîtriser autant que possible les conditions de préparation des échantillons.***

### **B.5.5 Origine du BG et du MIS2**

Avec les données dont nous disposons sur le « BG », nous ne sommes pas encore en mesure de pouvoir formuler une hypothèse sérieuse quant à la nature des espèces radicalaires liées au à ce signal. Le « BG » est a priori réparti dans l'ensemble du volume de l'ongle, contrairement au MIS2 dont les espèces sont localisées sur le bord de coupe de l'ongle. Nous avons mis en évidence que l'espèce associée au « BG » est très stable mais qu'un certain nombre de radicaux associés au « BG » pouvait être rendus silencieux du point de vue RPE par l'action des molécules d'eau susceptibles de créer un pont entre deux radicaux et donc de rendre diamagnétique l'ensemble. Cette hypothèse est cohérente avec une localisation sur la chaîne principale du polypeptide qui permet que des radicaux d'un même type soient en vis-à-vis. Compte tenu que la valeur du facteur  $g$  du « BG » est proche de celle de l'électron libre et que ce signal sature à faible puissance micro-onde, il est fort probable que les radicaux induisant le « BG » soit de type carboné.

Pour le MIS2, de la même manière que pour le « BG », il est fort probable que les radicaux associés soient centrés sur le carbone. Il est difficile à ce stade de formuler une hypothèse plus précise quant à leur nature sur la seule base de nos données.

### **B.5.6 Conclusion sur le MIS2 et du « BG »**

*Nous avons mis en évidence que la composante mesurée à  $g=2,004$  qui présente la forme d'un singlet est en fait constituée de deux composantes, l'une induite par le stress mécanique (MIS2) et l'autre (« BG ») intrinsèque à l'ongle. Le MIS2 décroît rapidement à température ambiante après le prélèvement et peut être éliminé complètement lorsque l'ongle est humidifié.*

*Le « BG » est un signal qui peut être considéré comme stable thermiquement. De plus, des bains répétés des ongles dans l'eau n'ont pas d'effet sur son amplitude. Cependant, suite à une humidification, l'amplitude du « BG » croît régulièrement sur plusieurs jours. Ce comportement atypique lui confère un caractère double vis-à-vis de la stabilité.*

### **B.6 Processus de formation des différents composants du MIS**

Dans ce paragraphe, nous ne traiterons que des composantes du MIS pour lesquelles il a été possible de formuler une hypothèse précise quant à la nature des espèces radicalaires associées, à savoir le MIS1, le MIS3 et la MIS4. Les radicaux mesurés à température ambiante ne sont pas a priori directement créés par le stress mécanique, mais sont des produits de réactions radicalaires successives. Il est également très probable que certaines des réactions mises en jeu soient par ailleurs photo-stimulées.

Les études menées sur des protéines irradiées à basse température ainsi que celles menées sur la dégradation mécanique de tissus kératinisés tels que la soie par exemple ont montré que les radicaux formés initialement ne sont pas ceux mesurés à température ambiante. Dans ces systèmes, les spectres RPE mesurés à température ambiante sont très similaires à ceux mesurés sur les ongles. Pour mettre en évidence les produits primaires du stress mécanique, il peut être envisagé de broyer les ongles à basse température puis de les mesurer également à basse température. Une montée progressive à température ambiante permettra de mettre en évidence les réactions menant aux radicaux mesurés à température ambiante. Néanmoins, suite aux observations faites dans la partie précédente, il est possible de formuler des hypothèses quant aux processus de formation des différentes espèces paramagnétiques contribuant au MIS.

#### **B.6.1 Processus de formation du MIS1**

Nous avons vu dans ce chapitre que le radical associé au MIS1 était très certainement le radical perthiyl ( $RSS^\circ$ ). La production du MIS1 est liée à la présence des ponts disulfures établis entre deux molécules de cystéine. La méthionine (acide aminé soufré) également présente dans les ongles ne permet pas l'établissement de liaisons disulfures.

Lorsque l'on compare les spectres RPE de cystine irradiée et du MIS (Fig. IV.49), on peut noter que le spectre de la cystine irradiée présente des caractéristiques spectrales très similaires au MIS1. Dans le cas de la cystéine, la structure est plus complexe. Ceci nous

indique que le radical associé au MIS1 est a priori associé à la rupture de la liaison disulfure plutôt qu'à un radical issu d'une réaction uniquement liée aux groupements thiols (SH) de la cystéine.

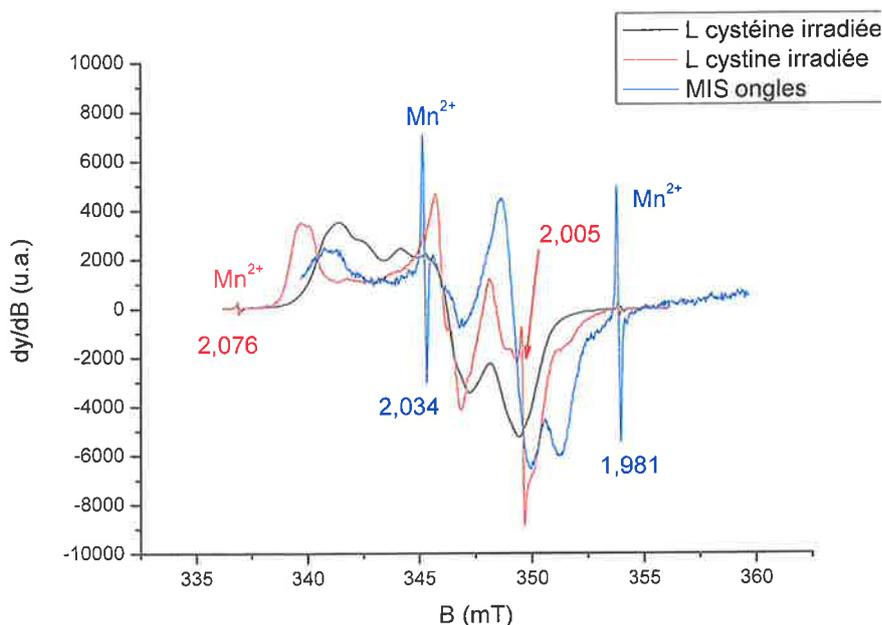


Figure IV.49 : Comparaison des spectres RPE de la cystéine et de la cystine irradiées à forte dose mesurés en bande X à température ambiante.

Plusieurs mécanismes sont susceptibles de mener à la production du radical perthiyl à partir de la rupture de ces liaisons disulfures. Le radical perthiyl peut être formé soit à partir d'une rupture homolytique des liaisons S-S établies entre deux molécules de cystéines adjacentes (mécanisme 1), soit d'une rupture d'une liaison C-S au niveau des molécules de cystéine (mécanisme 2). D'un point de vue énergétique, les liaisons de type C-S ( $270 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) sont plus solides que les liaisons S-S ( $170 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). La rupture homolytique du pont disulfure est donc a priori le mécanisme prépondérant (cf. Equation IV.3). Ce mécanisme donne lieu à la formation de deux radicaux thiyls.



Dans les spectres d'ongles broyés et mesurés à basse température (77 K) présentés par Dondi et al. (2010), on peut noter la présence de radicaux thiyls, mais également de radicaux perthiyls. Il est difficile de déterminer si les radicaux perthiyls sont issus d'une rupture des ponts disulfures au niveau de la liaison C-S (Equ. IV.4) ou de la réaction des radicaux thiyls avec les groupements thiols, groupements très réactifs (Equ. IV.5).





La rupture des ponts disulfures peut également être induite par la migration d'électrons sur la liaison disulfure. Cette liaison est très électronégative et est donc un site privilégié pour stabiliser les électrons issus de la scission des polypeptides et de la stabilisation des produits de scission. La présence d'un électron sur la liaison disulfure forme un radical anion. Ce radical instable à température ambiante peut être observé à basse température. Akasaka et al. (1964) ont montré que le radical anion peut se dissocier en RS<sup>-</sup> et RS<sup>°</sup>. Il est intéressant de noter que sur les spectres RPE de Dondi et al. (2010), le radical anion n'est pas observé consécutivement à un broyage à basse température. Il semble donc que les radicaux thiyls à l'origine de la formation du radical perthiyl soient principalement issus de la dégradation mécanique des ponts disulfures. Des résultats d'étude de la photolyse par rayonnement UV de molécules soufrées montrent que le radical perthiyl est bien souvent le produit final de réactions initiées par la formation de radicaux thiyl et qu'il est considéré comme le radical soufré le plus stable à température ambiante parmi les différents radicaux qui peuvent être induits dans les protéines (Lassman et al., 2003).

### B.6.2 Processus de formation du MIS3

Le MIS3 est lié à la présence de radicaux centrés sur le carbone et couplés avec un proton. Si l'on comprend que les rayonnements ionisants peuvent facilement induire la perte d'un proton et donc donner directement ce type de radical, dans le cas du stress mécanique, le processus pouvant mener à ce type de radical sur le squelette de la chaîne polypeptidique n'est pas direct. Si le stress mécanique entraîne a priori la rupture des ponts disulfures qui assurent l'assemblage de l'hélice  $\alpha$ , mais également les liaisons entre les protofilaments et les microfibrilles, la désolidarisation des polypeptides doit entraîner la rupture des liaisons terminales (terminaisons N et C) entre les hétérodimères de kératines. Les terminaisons ne sont pas satisfaites en liaisons hydrogène et une déprotonation d'un carbone sur la chaîne pourrait s'expliquer par une migration d'un proton vers la fonction carboxylate de la terminaison C du polypeptide. Dans le cas d'une scission des chaînes polypeptidiques lors de la coupe, les migrations de protons et d'électrons qui stabilisent les produits de la rupture de la chaîne peuvent notamment conduire à des radicaux centrés sur les atomes de carbone localisés sur la chaîne principale des polypeptides. Dans ce cas, on comprend facilement qu'une coupe perpendiculaire à l'orientation des polypeptides de la couche intermédiaire de l'ongle puisse générer un signal plus intense que pour une orientation de coupe parallèle à l'orientation des chaînes polypeptidiques, comme on peut le noter sur la Figure IV.18 pour la composante autour de  $g=2$ .

Le MIS3 ( $g=2,004$ ) est constitué d'un doublet avec une constante de coupage hyperfin égale à 2,0 mT. Après irradiation, des peptides de petites tailles montrent des signaux RPE avec des

#### *Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles*

caractéristiques très similaires, qui ont été attribués par Drew & Gordy (1963) et Sevilla et al. (1979) à des radicaux centrés sur un atome de carbone avec un couplage hyperfin avec un proton en  $\alpha$ . Ces radicaux seraient d'après les mêmes auteurs localisés sur le squelette du polypeptide plutôt que dans les chaînes latérales des acides aminés. Le fait que les temps de relaxation associés à ces espèces soient longs (phénomène de saturation) nous confirme qu'il s'agit d'un radical centré sur un carbone. En effet, le MIS3 sature avec une puissance micro-onde beaucoup plus faible que le MIS1 et MIS4, et il est de plus mesurable en opposition de phase. Ce type de radicaux est très courant dans les peptides ou protéines irradiés, que ce soit en solution aqueuse, en solution gelée ou à l'état solide (monocristaux ou poudre) (Garrison, 1987). Il faut souligner que des ongles irradiés présentent également un doublet (RIS3) avec des caractéristiques similaires.

Dans le cas de la scission des polypeptides, il est fort probable que des migrations de protons et d'électrons permettent de stabiliser les chaînes ainsi formées. Dans les polypeptides, il est très courant que, suite à une réaction d'oxydation ou de réduction, des réarrangements intramoléculaires s'opèrent pour stabiliser le polypeptide. Ces réarrangements peuvent notamment induire des déprotonations sur des atomes de carbone de la chaîne principale des polypeptides. Des doublets avec des caractéristiques similaires ont été observés à température ambiante dans différents acides aminés ou protéines irradiés (Drew & Gordy, 1963 ; Morishima & Hatano, 1975). Si le mode de création de ces espèces est a priori différent, il est néanmoins intéressant d'étudier les données disponibles dans la littérature, les radicaux mesurés à température ambiante présentant des signatures similaires. Lorsque l'irradiation et la mesure sont réalisées à basse température (77 K), le doublet n'est pas observé, mais d'autres composantes sont mesurées qui sont a priori liées à des molécules chargées ou ionisées (Drew & Gordy, 1963). Lorsque la température augmente, ces espèces paramagnétiques disparaissent et à température ambiante seul le doublet est mesuré. Il en a donc été conclu que les espèces mesurées à basse température sont des espèces précurseurs du doublet. De plus, une autre étude a mis en évidence que les radicaux mesurés à basse température étaient distribués aléatoirement le long des chaînes de polypeptides (Sugimoto et al., 1968). Tous ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse d'un réarrangement des charges le long du polypeptide et la déprotonation d'atomes de carbone sur la chaîne principale des polypeptides comme étant à l'origine du doublet. Les phénomènes mis en évidence pour les effets de l'irradiation sont a priori transposables à l'effet du stress mécanique si l'on considère une scission des chaînes.

De même que pour le MIS1 une étude à basse température permettrait de confirmer les hypothèses formulées ci-dessus quant au processus de formation du MIS3. Une étude plus détaillée des espèces formées à basse température permettrait également de préciser les mécanismes réactionnels mis en œuvre.

### **B.6.3 Processus de formation du MIS4**

Nous avons mis en évidence notamment par des simulations que le radical sulfinyl ( $RSO^\circ$ ) peut être considéré comme l'espèce la plus probable à l'origine du MIS4. Les données publiées par Sevilla et al. (1987) quant à la formation de ce radical dans la cystéine irradié sous oxygène, nous donnent des éléments sur la nature des réactions à l'origine de la formation du radical sulfonyl dans les ongles.

Sevilla et al. (1987) ont montré que ce radical n'était pas formé directement à partir de la réaction des radicaux thiyls et de l'oxygène mais que le radical thiol peroxy était un intermédiaire métastable qui se dissocie pour former le radical sulfinyl comme décrit dans l'Equation IV.6.



Il est très probable qu'un mécanisme similaire intervienne pour le MIS4. On peut imaginer que dans notre cas, le radical thiol peroxy réagisse avec un groupement thiol pour former d'une part le radical sulfinyl et d'autre part un groupement thiol hydroxyle ( $RSOH$ ).

## **C. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES SUR LES EFFETS DU STRESS MECANIQUE**

Dans cette partie, en plus du MIS1 (radical perthiyl), nous avons identifié et caractérisé trois composantes supplémentaires (MIS2, MIS3, MIS4) par rapport aux travaux de référence publiés avant cette thèse. Nous avons également mis en évidence le rôle primordial que joue l'humidité dans les phénomènes de décroissance de ces différentes composantes du MIS. L'effet de l'humidité permet d'expliquer les différences entre nos données et les données publiées, notamment pour ce qui concerne la stabilité des signaux. Le MIS1 était ainsi considéré comme stable. Nous avons mis en évidence que l'ensemble des composantes du MIS sont éliminées par une humidification de l'ongle. De ce fait, le MIS, contrairement à ce qui a été longtemps postulé, ne constitue pas un problème pour les applications en dosimétrie. Ce résultat est capital car des efforts importants sont réalisés par ailleurs pour développer soit des systèmes de mesure *in vivo*, soit des codes de déconvolution pour s'affranchir du MIS ou le prendre en compte.

Nous avons pu établir que le signal qui est mesuré après élimination de tous les signaux connus du MIS par humidification n'était pas une composante stable du MIS. Ce signal, dont l'origine reste encore à déterminer, entre très probablement dans la catégorie des signaux intrinsèques. De ce fait, il est nommé « BG ». Ce signal est stable thermiquement, mais son amplitude varie en fonction du taux d'humidité de l'ongle. De manière surprenante, lorsque l'ongle se déshydrate l'amplitude de ce signal augmente. La présence de ce signal constitue la principale difficulté dans l'analyse des signaux dosimétriques, car ces derniers se superposent

au « BG ». De la connaissance de ce signal et de la capacité à déterminer son intensité dépendra la précision de l'évaluation dosimétrique et les limites de détection associées.

Il sera sûrement nécessaire pour consolider les données acquises sur le « BG » et confirmer les hypothèses quant à sa nature de réaliser des études supplémentaires. Ainsi l'utilisation de l'imagerie RPE bande X pourrait permettre de confirmer que les radicaux associés sont bien localisés dans l'ensemble de la matrice de l'ongle et pas uniquement sur le bord de coupe comme c'est le cas des radicaux associés au MIS. Afin d'établir sa nature, des mesures avec des techniques de RPE avancées (RPE pulsée et bande W) ou de luminescence pourraient être envisagées. La meilleure compréhension de ce signal est une étape nécessaire pour définir des protocoles permettant soit de mesurer ou d'éliminer sélectivement le « BG » ou les signaux radio-induits.

## D. REFERENCES

- Akasaka K., Ohnishi S., Suita T., and Nitta I. (1964) ESR study of a single crystal of L-Cystine Dihydrochloride irradiated at low temperature. *J. Chem. Phys.*, 40, 3110-3116.
- Akasaka K. (1965) Paramagnetic resonance in L-cysteine hydrochloride irradiated at 77 K. *J. Chem. Phys.*, 43, 1182-1189
- Arends I., Dekker A.I., and Perdok W.D. (1963) Colour centers in quartz produced by crushing. *Phys. Status Solidi*, 3, 2275-2279.
- Bartlett D.T., Brown J.K., 1979. Irradiation effects in D-Mannose as studied by electron spin resonance spectroscopy. *Rad. Eff.*, 41, 43-46.
- Barnett R. J. (1953) The histochemical demonstration of sites of protein-bound sulphhydryl and disulphide groups. *Anat. Rec.*, 115, 280.
- Black P. J. & Swarts S. G. (2010) Ex vivo analysis of irradiated fingernails: Chemical yields and properties of radiation-induced and mechanically-induced radicals. *Health Phys.*, 98(2), 301-308.
- Bonazzola L., Fackir L., Leray N., Roncin J. (1984) ESR study of some sulfur-centered radicals formed in irradiated Cysteamine and 1,4-Dithiane single crystals. *Radiat. Res.*, 97, 462-467.
- Chandra H. and Symons C.R. (1987) Sulphur radicals formed by cutting  $\alpha$ -keratin. *Nature*, 328, 833-834.
- Cope B., Hopegood L., Latham R.J., Linford R.G., Reilly J.D., Symons C.R., Taiwo F.A., (1998) Studies of equid hoof horn material by EPR spectroscopy. *J. Mat. Chem.*, 8, 43-45
- Currie L.A. (1999) Nomenclature in evaluation of analytical method including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995). *Anal. Acta Chem.* 391, 105-126.
- Debnath R. (1998). Observation of two different types of stable  $[\text{FeO}_4/\text{Na}^+]_0$  centres in a silica glass. *Chem. Phys. Lett.*, 291, 231-236.
- Dondi D., Buttafava A., Faucitano A., Fattibene P. (2010) Basic radicals reaction in mechanolysis and photolysis of nails, Présentation orale au congrès EPRBiodose, Mandelieu-la-Napoule, Octobre 2010
- Drew R.C. and Gordy W. (1963) Electron spin resonance studies of radiation effects on Polyamino acids. *Radiat. Res.*, 18, 552-579.

## Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

- Farran L., Ennos A.R. & Eichhorn S.J. (2009) Microindentation and nanoindentation of human fingernails at varying relative humidity. *J. Mater. Res.*, 24(3), 980-984.
- Garrison W.M. (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.*, 87(2), 381-398.
- Gasimov O.K., Mamedov S.V., and L'vov K.M. (1992) Free-Radicals processes in the mechanical destruction of proteins. *Polymer Sci., USSR* 34(3), 196-204
- Gordy W. & Shields H. (1958) Electron Spin Resonance studies of radiation damage to proteins. *Radiat. Res.*, 9, 611-625.
- Hadley J. H. & Gordy W. (1975) Nuclear coupling of  $^{33}\text{S}$  and the nature of free radicals in irradiated crystals of cysteine hydrochloride and *N*-acetyl methionine. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 72(9), 3486-3490.
- Hadley J. H. & Gordy W. (1977) Nuclear coupling of  $^{33}\text{S}$  and the nature of free radicals in irradiated crystals of *N*-acetyl-L-cysteine. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 74(1), 216-220.
- Henrikssen T., Sanner T., Pihl A. (1963) Transfer of radiation-induced unpaired spins from proteins to sulfur compounds. *Radiat. Res.*, 18, 168-176.
- Ignatiev E. A., Romanyukha A. A., Koshta A., Wieser A. (1996). Selective saturation method for EPR dosimetry with tooth enamel, *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 333-337
- Ikeya M. (1993) New Applications of Electron Spin Resonance: dating, dosimetry and microscopy. World Scientific Publishing Co., Singapore, New jersey, London, Hong Kong.
- Lassman G., Kolberg M., Bleifuss G., Gräslund A., Sjöberg B.M., and Lubitz W. (2003) Protein thiyl radicals in disordered systems: A comparative study at low temperature. *Phys. chem. Chem. Phys.*, 5, 2442-2453.
- Nelson D.J., Petersen R. L., and Symons M. C. R. (1977) Unstable intermediates. Part 178. The structure of intermediates formed in the radiolysis of thiols. *J.C.S. Perkin II*, 15, 2005-2015.
- Parast C. V., Wong K. K., Kozarich J. W., Peisach J., and Magliozzo R. S. (1995) Electron Paramagnetic Resonance Evidence for a Cysteine-Based Radical in Pyruvate Formate-lyase Inactivated with Mercaptopyruvate. *Biochem.*, 34, , 5712-5717.
- Patten R.A. & Gordy W. (1964). Further studies of radiation effects on the proteins and their constituents. *Radiat. Res.* 22, 29-44.
- Reyes R.A., Romanyukha A., Trompier F., Mitchell C.A. , Clairand I., De T. , Benevides L.A. & Swartz H.M. (2008) Electron paramagnetic resonance in human fingernails: The sponge model implication. *Radiat. Envir. Biophys.*, 1-12.
- Richard W.T. & Loomis A.L. (1927) The chemical effects of high frequency sound wavesI. A preliminary survey. *J. Am. Chem. Soc.*, 49, 3086-3100.
- Romanyukha A., Trompier F., Leblanc B., Calas C., Clairand I., Mitchell C., Smirniotopoulos James G. & Swartz H. (2007) EPR dosimetry in chemically treated fingernails. *Radiat. Meas.*, 42, 1110-1113.
- Saxebol G., Herskedal O. (1975) ESR studies of electron irradiated peptides: a single crystal of *N*-acetyl-L-cysteine at 77 K. *Radiat. Res.*, 62, 395-406.

#### Chapitre IV Les signaux induits par le stress mécanique dans les ongles

- Sevilla M.D., D'Arcy J.B., Morehouse K.M. (1979) An electron spin resonance study of  $\gamma$ -irradiated frozen aqueous solutions containing dipeptides. Mechanism of radicals reaction. *J. Chem. Phys.*, 83, 2887-2892.
- Sevilla M.D., Becker D., Swarts S., and Herrington J. (1987) Sulfinyl radical formation from the reaction of cysteine and glutathione thyl radicals with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 144(2), 1037-1042.
- Sugimoto S., Ohnishi S., and I., Nitta (1968), *JAERI*, 5018(1), 41.
- Symons M., Chandra H. & Wyatt J. (1995) Electron paramagnetic resonance spectra of irradiated finger-nails: A possible measure of accidental exposure. *Radiat. Prot. Dosim.*, 58, 11-15.
- Trompier F., Kornak L., Calas C., Romanyukha A., Leblanc B., Mitchell C. A., Swartz H. & Clairand I. (2007) Protocol for emergency EPR dosimetry in fingernails. *Radiat. Meas.*, 42, 1085-1088.
- Trompier F., Romanyukha A., Kornak L., Calas C., Leblanc B., Mitchell C., Swartz H. & Clairand I. (2009) Electron paramagnetic resonance radiation dosimetry in fingernails. *Radiat. Meas.*, 44(1), 6-10.
- Truby F. (1964) Ionic paramagnetic species associated with  $\gamma$ -irradiated Amyl Disulfide. *J. Chem. Phys.*, 40, 2768-2774.
- Walters G., and Estle T.L. (1961) Paramagnetic resonance defect introduced near the surface of solid by mechanical damage. *J. Appl. Phys.* 32, 1854-1858.
- Wilcox D. E., He X., Gui J., Ruuge A. E., Li H., Williams B. B. & Swartz H. M. (2010) Dosimetry based on EPR spectral analysis of fingernail clippings. *Health Phys.*, 98(2), 309-317.
- Windle J.J., Wiersema A.K., (1964) Effects of mechanical action on the electron paramagnetic resonance of wool and silk. *J. Polymer Sci.*, 8, 1531-1539.

## *Chapitre V*

# *Les signaux induits par irradiation dans les ongles*

A.	Introduction .....	211
B.	Etudes des signaux radio-induits.....	212
B.1	Description du RIS 1 .....	214
B.2	Description du RIS 3 .....	216
B.3	Description du RIS 4 .....	217
B.4	Etude et description du RIS 2.....	218
B.5	Etude et description du RIS 5 : composante stable du RIS .....	227
B.6	Conclusion sur le RIS5.....	240
C.	Conclusion-Perspectives .....	240
D.	Références .....	241



## **A. INTRODUCTION**

De la même manière que nous avons décrit dans le chapitre IV les signaux induits par le stress mécanique (MIS), les différentes composantes radio-induites (RIS) du signal RPE des ongles sont détaillées dans ce chapitre V. Dans un premier temps, nous avons identifié les différentes composantes du RIS. Au début de ce travail, seule une composante du RIS (RIS2<sup>1</sup>) avait en partie été identifiée autour de  $g=2$  (Symons et al., 1995). Cependant, elle n'avait pas été correctement identifiée du fait de la présence de composantes du MIS (MIS2, MIS3 et MIS4), qui n'avait pas encore été mise en évidence. La caractérisation des signaux intrinsèques et du MIS était le préalable à l'étude des signaux RPE radio-induits. Dans ce chapitre, nous reportons l'identification de cinq composantes dans le RIS. Nous verrons que les quatre premières composantes (RIS1, RIS2, RIS3, RIS4) présentent de fortes similarités avec des composantes identifiées du MIS (MIS1, MIS2, MIS3 et MIS4).

La complexité du signal mesuré dans les ongles n'est pas le seul point qui a limité le développement de l'utilisation des ongles en dosimétrie. Comme pour le MIS, l'un des principaux résultats de ce chapitre réside dans la mise en évidence de l'effet de l'humidité dans la décroissance de la plupart des signaux identifiés. L'instabilité de la plupart des signaux radio-induits dans des conditions *in vivo* d'humidité et de température est le principal facteur qui limite la possibilité d'une application en dosimétrie.

En effet, il est nécessaire que le ou les signaux susceptibles d'être utilisés pour estimer les doses soient suffisamment stables *in vivo* pour être mesurés après des délais de plusieurs semaines ou mois. La complexité du signal RPE et le fait que les composantes du RIS les plus intenses (notamment le RIS2) soient affectées par l'humidité sont très probablement responsables du fait qu'à ce jour aucun cas d'application de dosimétrie des ongles n'a été reporté, à notre connaissance. L'étude détaillée des comportements respectifs de ces différents signaux vis-à-vis de l'humidité, mais également de la température et de la dose, présentée dans ce chapitre, avait pour principal objectif d'identifier une ou plusieurs composantes suffisamment stables pour être utilisées pour évaluer une dose.

**Le résultat le plus important de ce travail de thèse réside dans l'identification d'un signal radio-induit a priori suffisamment stable pour être mesuré dans des délais compatibles avec les exigences de la dosimétrie d'accident ou du tri de population.**

---

<sup>1</sup> La nomenclature du RIS ne suit pas l'ordre chronologique de la mise en évidence des signaux, mais pour faciliter la lecture est calquée sur celle du MIS, la plupart des signaux du MIS et du RIS étant très similaires.

Ce signal est nommé par la suite **RIS5**. Nous verrons que **la formation de MIS ne gêne pas l'analyse du RIS5**. Cette information est également d'importance, car la présence du MIS est la principale motivation dans le développement de technique de mesure *in vivo* des ongles pour la dosimétrie ou de méthodes de déconvolution permettant de séparer MIS et RIS (He et al., 2011). Cependant, le RIS5 présente des caractéristiques spectrales très similaires au « BG » et son intensité est du même ordre de grandeur que celle du « BG ». Cette similarité est la principale difficulté dans l'analyse et l'estimation de l'intensité du RIS5 et donc dans l'estimation des doses. L'incidence de la présence du « BG » sur l'analyse du RIS5 et l'estimation des doses est discutée dans ce chapitre et plusieurs approches pour tenter d'éliminer sélectivement l'une ou l'autre de ces deux composantes ont été testées. Ces données ont permis d'élaborer deux protocoles complémentaires d'estimation des doses, l'un dédié aux fortes doses ( $D > 10$  Gy) et l'autre aux plus faibles doses ( $D < 10$  Gy) très probablement applicable au tri de population. Ces deux protocoles font l'objet du chapitre VI, de même que les premières applications à des cas concrets d'accident radiologiques.

### B. ETUDES DES SIGNAUX RADIO-INDUITS

La présentation sur la Figure V.1 de spectres RPE d'ongles irradiés à différentes doses permet de mettre en évidence plusieurs composantes dans le RIS. En effet, si pour les plus faibles doses l'allure du spectre est très similaire au signal avant irradiation (« BG »), à plus forte dose ( $> 1$  kGy) des composantes supplémentaires sont observées. Il faut noter que les spectres présentent un certain nombre de similarités avec les spectres du MIS. Les spectres mesurés pour des ongles irradiés à forte dose sont très similaires à ceux mesurés après broyage ou coupe.

On distingue nettement une structure anisotrope avec des valeurs de  $g$  identiques au MIS1 (radical perthiyl), nommé par analogie RIS1 sur la Figure V.1. Il est tout à fait envisageable que des modes de production différents induisent des espèces radicalaires identiques et il semble opportun d'analyser les spectres d'ongles irradiés à la lumière des résultats obtenus dans le chapitre IV sur le MIS. D'autant que pour l'analyse du MIS nous nous sommes souvent référés à des travaux portant sur des acides aminés ou des polypeptides irradiés.

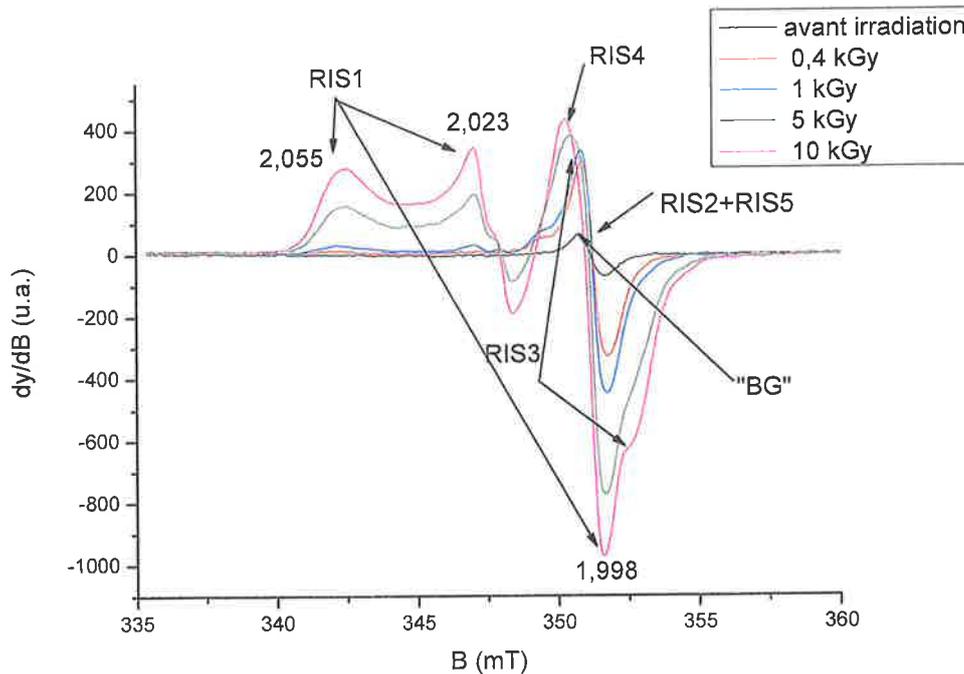


Figure V.1 : évolution du spectre RPE d'ongle irradié en fonction de la dose d'irradiation, irradiations et mesures en bande X réalisées à température ambiante.

Ainsi, il est possible sur la Figure V.1, pour les spectres d'ongles irradiés à 5 et 10 kGy, de distinguer un doublet à  $g = 2,004$  que nous nommerons RIS3 par analogie avec le MIS3. Sur ces spectres, il n'est pas observé de signaux radio-induits comparables à la signature du MIS4. Néanmoins, cela ne signifie pas, dans des conditions différentes de mesure et d'irradiation, que l'équivalent du MIS4 ne soit pas observable. Compte-tenu que ce signal n'est pas observable dans les conditions normales de température et d'atmosphère et donc ne présente pas d'intérêt du point de vue dosimétrique, nous n'avons pas tenté de le mettre en évidence avec des conditions de mesure particulières.

Pour les doses les plus faibles, le spectre est dominé par un singlet, du moins en bande X, avec des caractéristiques proches de celles du MIS2 ou du « BG ». Il s'agit bien d'un signal radio-induit, l'amplitude augmentant avec la dose. Nous établirons dans la suite de ce chapitre que ce signal est en fait constitué de deux singlets, avec des propriétés de stabilité très différentes. La composante la plus intense est également la plus instable et présente donc un comportement proche du MIS2. Cette composante est nommée RIS2, même si les caractéristiques spectrales sont légèrement différentes ( $g=2,005$ ). La composante stable de ce signal radio-induit n'a pas d'équivalent dans le MIS (toutes les composantes étant instables), mais présente des caractéristiques spectrales identiques à celle du MIS2 et du « BG ». Cette nouvelle composante du RIS est nommée RIS5.

Le Tableau V.1 résume la nomenclature des différentes composantes du RIS, leurs principales caractéristiques et l'éventuelle correspondance avec les composantes du MIS. Ces correspondances sont établies sur la base des caractéristiques spectrales et du comportement du signal, notamment la stabilité.

Tableau V.1 : nomenclature et caractéristiques des différentes composantes du RIS

Nomenclature des composantes du RIS	Caractéristiques spectrales	Signal correspondant dans le MIS	Remarques
RIS1	$g_1 = 2,055$ ; $g_2 = 2,023$ ; $g_3 = 1,998$ et $a_H = 0,85$ mT	MIS1 (RSS°) ( $g_1 = 2,055$ ; $g_2 = 2,023$ ; $g_3 = 1,998$ et $a_H = 0,85$ mT)	Mêmes caractéristiques spectrales et d'instabilité
RIS2	Singlet ( $g = 2,005$ )	MIS2 (C°) ? (Singlet $g = 2,004$ )	Valeur de $g$ légèrement différente, espèces instables
RIS3	Doublet, $g = 2,004$ et $a_H = 2,0$ mT	MIS3 (C°) (Doublet, $g = 2,004$ et $a_H = 2,0$ mT)	Mêmes caractéristiques spectrales et d'instabilité
RIS4	$g_1 = 2,025$ , $g_2 = 2,008$ et $g_3 = 2,003$ et $a_H = 1,4$ mT	MIS4 (RSO°) ( $g_1 = 2,025$ , $g_2 = 2,008$ et $g_3 = 2,003$ et $a_H = 1,4$ mT)	Mêmes caractéristiques spectrales et d'instabilité
RIS5	Singlet (2,004)	Pas de correspondant, pas de composante stable dans le MIS	Caractéristiques spectrales similaires au « BG » et MIS2

Etant donné que les RIS1, RIS3 et RIS4 sont des signaux instables et qu'ils n'apparaissent qu'à de très importantes valeurs de doses, leur étude n'a pas été détaillée et notre travail s'est principalement concentré sur les signaux apparaissant autour de  $g=2$  qui sont susceptibles d'être utilisés pour estimer les doses de rayonnement.

### B.1 Description du RIS 1

Comme le montre la Figure V.2, le RIS1 et le MIS1 présentent des caractéristiques spectrales identiques. Il est donc très probable que les radicaux à l'origine du RIS1 soient de même nature que ceux associés au MIS1 ou ceux induits dans les polypeptides irradiés contenant de la cystéine. Ainsi le radical perthiyl (RSS°) est l'espèce radicalaire la plus probable pour expliquer le RIS1. Il est intéressant de noter que le RIS1 est observable pour les échantillons irradiés aux doses les plus importantes. Dans la gamme de dose habituellement rencontrée pour les accidents radiologiques (0-100 Gy), cette composante n'est pas mise en évidence. D'après la Figure V.1, la relation dose – signal est linéaire sans effet de saturation jusqu'à au moins 10 kGy.

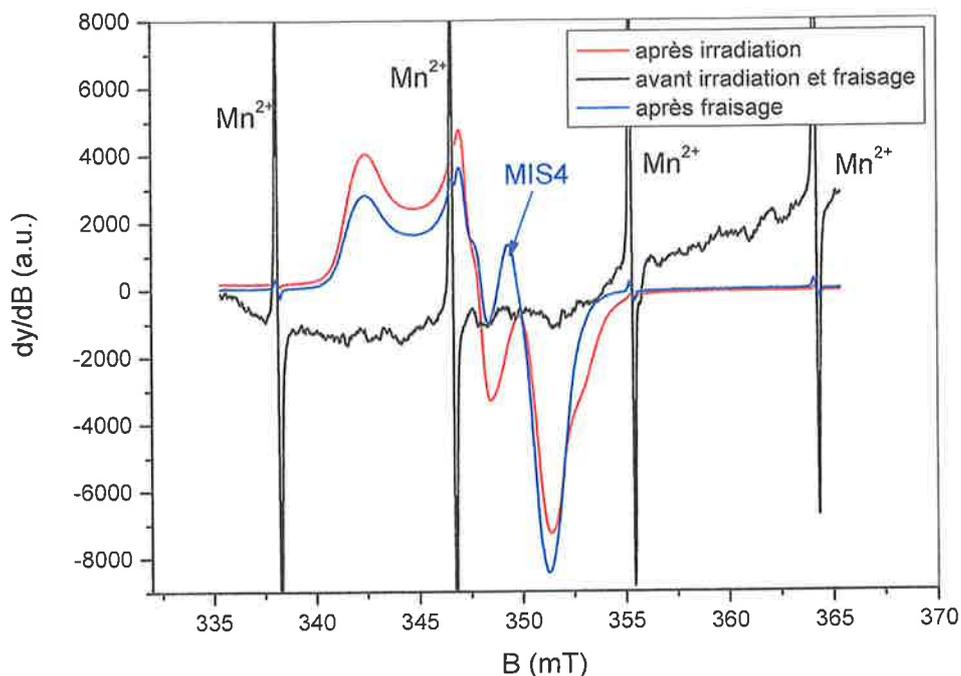


Figure V.2 : comparaisons de spectres du MIS et du RIS (10 kGy) mesurés en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 20 mW.

Dans le cas de l'irradiation, si l'on se réfère aux travaux publiés sur les protéines irradiées, le radical perthiyl n'est a priori pas le produit primaire de l'interaction des photons. Lors d'irradiations de protéines ou d'ongles réalisées à basse température et pour des mesures réalisées dans les mêmes conditions, le radical perthiyl n'est pas mis en évidence (Truby, 1964 ; Akasaka et al., 1964 ; Dondi et al., 2010). Lorsque la température augmente, la signature du radical perthiyl apparaît progressivement pour finalement dominer à température ambiante. Le radical perthiyl n'est donc pas formé directement par la scission d'une liaison C-S au niveau des ponts disulfures par l'interaction des rayonnements ionisants. Il semble également que la formation du radical à partir de radicaux thiyls issus d'une scission directe au niveau des liaisons S-S n'est pas non plus envisageable. A basse température, dans différents types de protéines contenant des résidus de cystine, il a été mis en évidence la présence de radical anion de type  $(R-S-S-R^{\circ})^{-}$  (Truby, 1964 ; Akasaka et al., 1964). Dans les ongles irradiés à forte dose (1 kGy) et mesurés à basse température, le radical anion domine le spectre RPE et une composante peu intense liée aux radicaux thiyls est également observée (Dondi et al., 2010). La liaison disulfure est un site très électronégatif qui tend à capter les électrons qui migrent le long des polypeptides suite à des phénomènes d'ionisation ou de réarrangements intra ou inter moléculaires. Cette espèce n'est pas stable à température ambiante et il est très probable que le radical perthiyl soit le produit final des processus réactionnels liés au radical anion. Akasaka et al. (1964) ont montré que le radical anion se dissocie en  $RS^{-}$  et  $RS^{\circ}$ . Les mécanismes réactionnels menant à la formation du radical perthiyl à partir du radical thiyl ont déjà été décrits dans la partie traitant du MIS1. La réaction des

radicaux thiyls ( $RS^\circ$ ) avec les groupements thiols (RSH) donne lieu à la formation du radical perthiyl.

*Au final, bien que le MIS1 et le RIS1 soient liés au même radical perthiyl ( $RSS^\circ$ ), les processus de formation sont très différents. Dans le cas du MIS, il s'agit a priori principalement d'une rupture homolytique des liaisons S-S, alors que pour le RIS1, la scission de la liaison passe par la formation du radical anion ( $R-S-S-R^\circ$ ) suite au piégeage d'un électron sur la liaison disulfure. Dans le premier cas, deux radicaux thiyls ( $RS^\circ$ ) sont formés, alors que, pour l'irradiation, la dégradation du radical anion mène à la formation d'ion thiolate ( $RS^-$ ) en plus du radical thiyl.*

## **B.2 Description du RIS 3**

Le RIS3 est constitué d'un doublet présentant des caractéristiques similaires à celui observé pour le MIS3 ( $g=2,004$  et  $a_H = 2,0$  mT). De la même manière que le RIS1, cette composante n'apparaît que pour les doses les plus élevées, et ne présente donc pas d'intérêt particulier pour les applications en dosimétrie. D'après ses caractéristiques spectrales, il est fort probable que le ou les radicaux associés soient, comme pour le MIS3, centrés sur le carbone avec un couplage hyperfin comportant un unique proton dans l'environnement immédiat. Si les caractéristiques du RIS3 et du MIS3 sont similaires, il n'est pas évident que les radicaux soient pour autant localisés sur les mêmes types d'acide aminé. Seule une étude détaillée de ce signal pourrait le cas échéant apporter des éléments de compréhension vis-à-vis des mécanismes de formation et de la nature des espèces radicalaires associées à ces signaux.

Pour le MIS3, c'est a priori des réarrangements inter ou intra moléculaires, suite aux ruptures mécaniques des polypeptides, qui sont à l'origine de ces radicaux carbonés. Dans le cas de l'irradiation, ces phénomènes de scission sont généralement observés à forte dose, ce qui pourrait expliquer que le RIS3 n'apparaît qu'à forte dose. Cependant, dans le cas de l'irradiation, en plus des phénomènes de scission de la chaîne principale, la perte d'un proton sur les atomes constituant les acides aminés peut également intervenir directement par l'interaction des rayonnements ionisants ou par l'action de  $OH^\circ$ , produit de la radiolyse de l'eau. Dans le cas de l'irradiation, les pertes de protons peuvent également avoir lieu sur les chaînes latérales des polypeptides, ce qui permet d'envisager un grand nombre de possibilités quant à la nature des radicaux primaires, sans compter la variété des mécanismes réactionnels secondaires qui peuvent également intervenir. En effet, suite à la perte d'un proton, le site radicalaire peut migrer le long de la chaîne polypeptidique par des mécanismes internes d'abstraction de l'hydrogène. La migration est stoppée lorsque l'abstraction intervient sur les liaisons les moins énergétiques, c'est-à-dire celles de type X-H. Comme plusieurs radicaux peuvent être formés sur la même chaîne, toute tentative de prédiction des radicaux effectivement formés au final est rendue difficile.

Si l'on considère les radicaux primaires formés par un mécanisme d'abstraction d'un proton sous l'effet des photons, alors les radicaux centrés sur le carbone tels ceux à l'origine du RIS3

devraient être observés sur le spectre RPE d'ongles irradiés à 1 kGy et même dominer le spectre RPE. En effet, si l'on considère l'irradiation de quantités similaires d'acides aminés (de l'ordre du mg) sous leur forme cristalline (glycine ou alanine par exemple), il est possible de détecter les signaux associés à partir de dose de l'ordre de quelques dizaines de Gy. Dans notre cas, nous devrions également détecter des signaux RPE de type triplet, quadruplet du fait de l'interaction des radicaux avec les protons environnants, comme c'est le cas par exemple pour le spectre de l'alanine irradiée qui présente un quadruplet (interaction avec 3 protons).

Ceci signifie que le RIS3 n'est donc pas a priori lié à un radical primaire formé par perte d'un proton induit par l'interaction des photons. On peut donc considérer que soit les atomes de carbone ne sont pas forcément les sites privilégiés pour stabiliser les radicaux formés suite à la perte d'un proton par interaction directe des rayonnements ionisants ou par réaction avec  $\text{OH}^\bullet$ , soit que la plupart des radicaux formés se recombinent. De la même manière que pour le MIS3, même si le stress initial est différent, les radicaux à l'origine du RIS3 sont issus des réarrangements moléculaires suite à la scission des chaînes polypeptidiques.

*A ce stade, nous pouvons juste supposer que le RIS3 est lié au couplage d'un électron non apparié sur un atome de carbone avec un unique proton et que le mode de production des radicaux associés est très probablement lié, comme pour le MIS3, à des phénomènes de scission des chaînes polypeptidiques qui interviennent uniquement à fortes doses.*

### **B.3 Description du RIS 4**

Le RIS4 (du moins sa composante  $g_2$ ) peut être clairement observé sur les spectres d'ongles irradiés à des doses supérieures à 1 kGy (Fig. V.1). En bande X, le RIS4 et le MIS4 présentent une signature spectrale très similaire. Sur la Figure V.1, il est intéressant de noter que le RIS4 apparaît de même manière concomitante au RIS1. A faible dose (<100 Gy), le RIS4 n'est pas mis en évidence. De ce fait, il présente peu d'intérêt pour les applications en dosimétrie. Les spectres RPE d'ongles irradiés en bande Q, permettent de mieux mettre en évidence la composante  $g_2$  de ce signal (Fig. V.3). La valeur de constante du couplage hyperfin mesurée sur la composante  $g_2$  est similaire à celle observée pour le MIS4 (1,5 mT). Il est donc très probable que le radical à l'origine du RIS4 soit de même nature que pour le MIS4 ( $\text{RSO}^\bullet$ ). Ce radical est produit à partir des radicaux thiyls comme pour le RIS1. Les réactions de formation du radical perthiyl (MIS1 et RIS1) et sulfinyl (RIS4 et MIS4) nécessitent la présence de groupements thiols. En conditions normales d'atmosphère (présence d'oxygène), ces deux types de radicaux sont donc susceptibles d'être produits de manière simultanée, ce qui est cohérent avec le fait que ces deux signaux apparaissent au même niveau de dose.

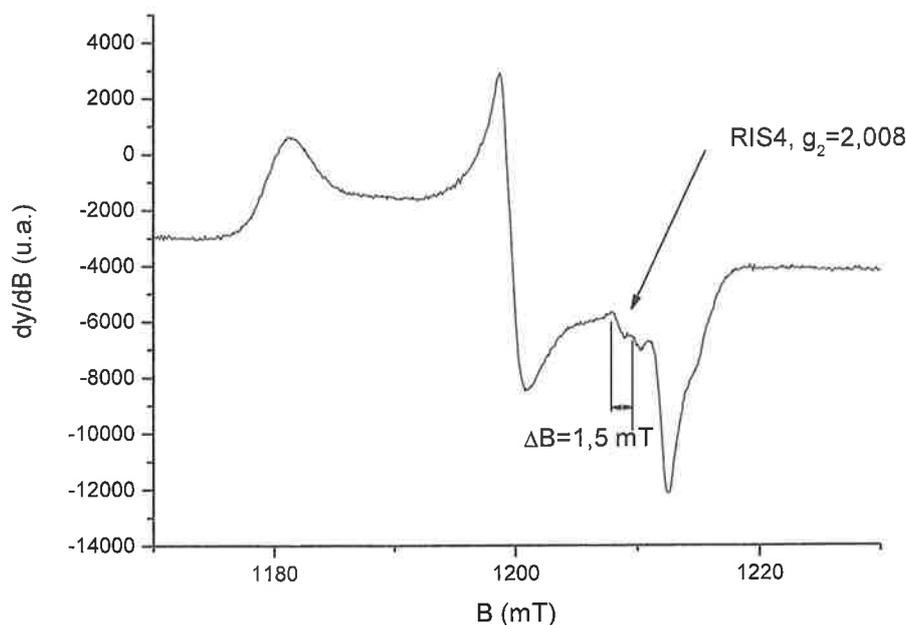


Figure V.3 : spectre RPE d'ongle irradié à 10 kGy mesuré en bande Q à température ambiante et à une puissance de 23 mW.

Le RIS4 est associé à la même espèce radicalaire que le MIS4, le radical sulfinyl ( $RSO^\circ$ ). Ce radical n'est mesurable que pour des doses élevées ( $>1kGy$ ) et est par ailleurs instable à température et humidité ambiante. De ce fait, il ne présente pas d'intérêt particulier pour la dosimétrie, et dans la gamme de dose des applications envisagées ( $<100 Gy$ ), le RIS4 ne pose donc pas de problème pour l'analyse des signaux utilisée pour estimer les doses (RIS2 et RIS5).

## B.4 Etude et description du RIS 2

Dans cette partie, nous décrivons plus en détail le RIS2, seul signal préalablement identifié qui pouvait présenter un intérêt pour la dosimétrie, principalement du fait de sa présence à partir de doses de l'ordre de quelques Gy.

### B.4.1 Description du RIS 2

Le RIS2 domine le spectre du RIS jusqu'à des doses de l'ordre de 1 kGy. Au-delà, le MIS1 et MIS3 se superposent au RIS2. En bande X, le RIS2 apparaît comme une raie isotrope à  $g=2,005$  avec une largeur pic à pic de 0,9 mT. Une saturation de ce signal peut être observée sur la Figure V.1 pour des doses supérieures à quelques centaines de Gy. Le RIS2 présente une valeur de  $g$  (2,005) légèrement supérieure à celle du « BG » ( $g=2,004$ ).

Des mesures réalisées en bande Q permettent de mettre en évidence cette légère différence de  $g$  avec le « BG ». La Figure V.4 présente des spectres RPE mesurés en bande Q à température ambiante, après irradiation et après que l'ongle irradié ait été humidifié. On peut ainsi noter qu'après humidification, la composante la plus intense du signal à  $g=2,005$ , correspondant au RIS2, est éliminée. La deuxième composante du signal observable sur le

spectre mesuré après humidification à  $g=2,004$  est une composante stable qui correspond au « BG » et au RIS5, tels que nous les avons définis.

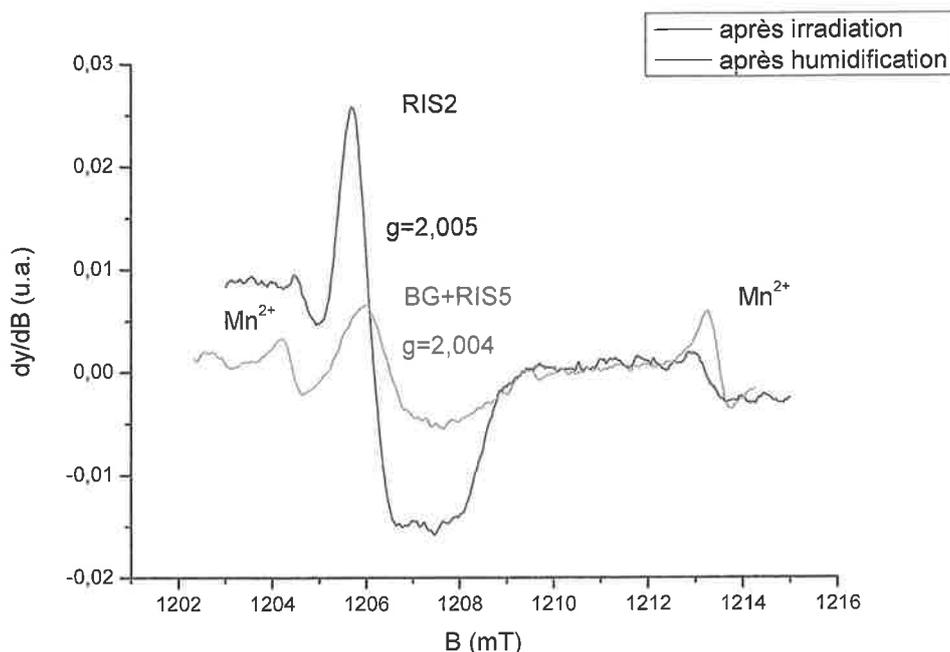


Figure V.4 : spectres RPE mesurés en bande Q d'un échantillon d'ongle irradié à une dose de 20 Gy, préalablement humidifié. Les mesures ont été réalisées après l'irradiation, et après humidification de l'échantillon irradié à température ambiante et à une puissance de 23 mW.

*En bande Q, il est possible de séparer le RIS2 du « BG » et du RIS5. Le RIS2 est constitué d'un singlet avec une valeur de g égale à 2,005. Ceci indique que le radical associé au RIS5 est vraisemblablement d'une nature différente de ceux associés au MIS2 ou au « BG ».*

#### B.4.2 Influence de l'humidité sur la stabilité du RIS2

Le RIS2 est éliminé suite à l'humidification de l'ongle de la même manière que pour le MIS2 (Fig. V.4). Il est donc très probable que la stabilité du RIS2 soit corrélée, comme pour le MIS2, aux conditions d'humidité et de température. Concernant l'effet de l'humidité, nous avons réalisé une étude plus détaillée que pour le MIS2, car le RIS2, même instable dans les conditions normales de température et d'humidité, peut néanmoins être envisagé pour estimer des doses pour peu que l'on puisse corriger le signal mesuré de sa décroissance et prélever les échantillons dans des délais très courts après irradiation (de l'ordre de quelques heures). La Figure V.5 montre la variation de la décroissance de l'amplitude du RIS2 en fonction de l'humidité présente dans l'ongle au début de la mesure.

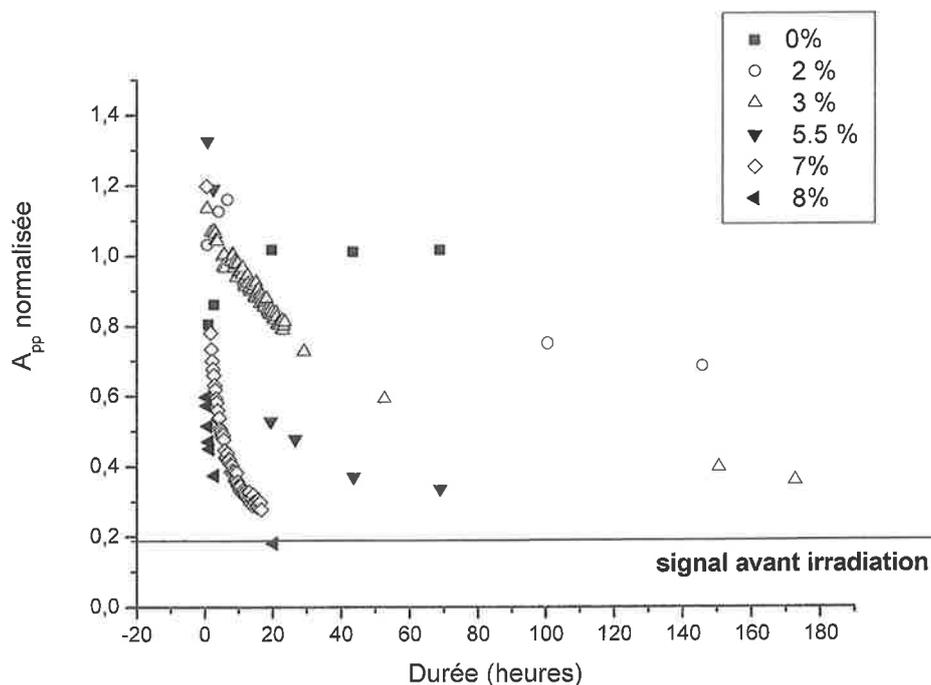


Figure V.5 : Influence du taux d'humidité de l'ongle exprimé en % de la masse de l'ongle sur la décroissance du RIS2. Mesures réalisées à température ambiante en bande X. Echantillons irradiés à 100 Gy par des rayons  $\gamma$  ( $^{60}\text{Co}$ ).

L'humidité a été exprimée en fonction de la perte de masse de l'ongle entre le début de la mesure RPE et après déshydratation de l'échantillon. On note que plus l'humidité initiale de l'échantillon est élevée, plus la décroissance est rapide. Le taux de 7% correspond au taux moyen d'humidité *in vivo*. Avec ce taux initial, une diminution de 50% du signal est observée en environ deux heures. Sur des ongles déshydratés, le signal mesuré augmente de 20 %, dans les vingt premières heures puis se stabilise.

On peut également noter que le signal se stabilise à des valeurs d'amplitude qui semblent être corrélées au taux d'humidité. Plus le taux d'humidité est faible et plus l'amplitude du signal stabilisé est élevée. Entre 8 % et 0% d'humidité initiale, un facteur 5 est observé entre les deux valeurs d'amplitude du signal stabilisé. L'humidité est bien un paramètre déterminant dans la compréhension du comportement du RIS2. De plus, le taux d'humidité de l'ongle varie au cours de la mesure, ce qui rend l'interprétation des données délicate. Il semble donc difficile d'évaluer les fonctions de décroissance par des modèles simples. En effet, une fois prélevé, et laissé à température et humidité ambiante (20°C et 40% d'humidité), l'ongle se déshydrate très rapidement, 5% en 2 heures, et la perte d'humidité se poursuit ensuite de manière plus lente sur les jours suivants (Fig. V.6). Lorsque l'échantillon mesuré est laissé dans la cavité pour suivre la décroissance du signal, du fait de l'action du rayonnement micro-onde (échauffement), la déshydratation est encore plus rapide, ce qui fait que les mesures réalisées ne sont pas représentatives de la réalité. Il s'agissait surtout de mettre en évidence le rôle de l'humidité dans les processus de décroissance du RIS2.

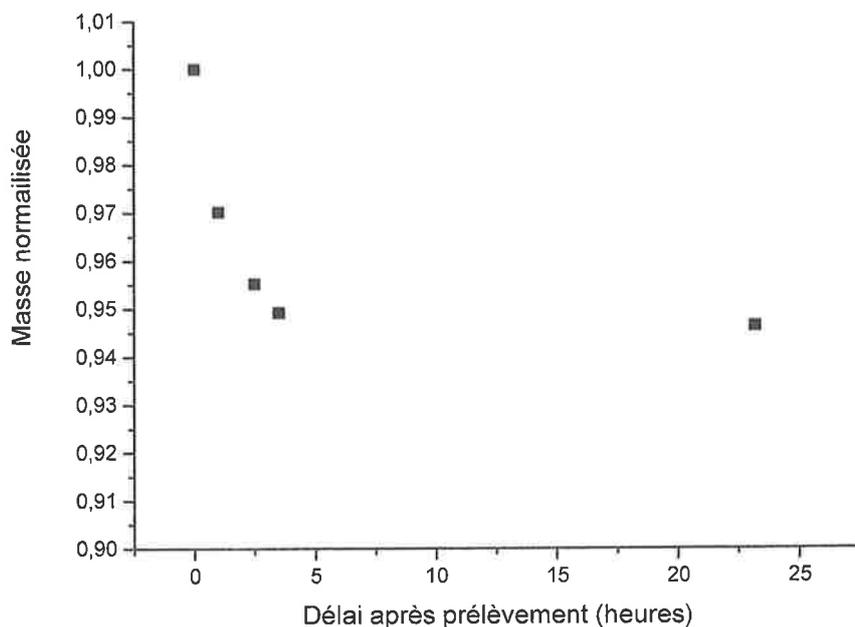


Figure V.6 : perte de masse d'un prélèvement d'ongle en fonction de la durée écoulée après prélèvement (température 20°C et 40% d'humidité).

L'estimation d'une dose à partir du RIS2 semble donc beaucoup plus complexe que pour les matériaux utilisés en dosimétrie, même ceux présentant une instabilité (sucres, verres minéraux et polymères) car dans ces cas, c'est uniquement la température qui détermine leur décroissance, généralement selon la loi d'Arrhenius.

Pour estimer une dose à partir du RIS2, il faut pouvoir prélever les ongles dans des délais courts après l'accident, ce qui implique son identification quasi immédiate et des prises de précaution par rapport à l'humidification des ongles. Dans ces conditions très restrictive, il peut être envisagé d'utiliser le RIS2 pour estimer une dose. Il faudra alors réaliser un étalonnage avec des conditions identiques (délai entre irradiation et mesure, taux d'humidité, température, etc.) à celles de l'accident ou corriger le signal mesuré pour se rapporter aux conditions de l'étalonnage, car celles-ci, comme nous venons de le montrer, ont une forte influence sur la stabilité du signal. Une différence entre les conditions d'étalonnage et celles de l'accident peut amener à des erreurs significatives sur l'estimation des doses. Il serait donc nécessaire de pouvoir estimer quelle est la décroissance du signal de l'ongle *in vivo* ou du moins dans des conditions de stockage permettant de simuler un taux d'humidité et une température similaires aux conditions *in vivo*. Avec ces données il est a priori possible de corriger l'amplitude du RIS2 de la décroissance du signal.

Cependant, si l'on considère des constantes de décroissance plus élevées *in vivo* que pour les données correspondant à 7% d'humidité (Fig. V.5), la décroissance complète du signal intervient dans des délais inférieurs à 20 heures.

## *Chapitre V Les signaux induits par irradiation dans les ongles*

Cette approche pourra être mise en œuvre uniquement si l'irradiation est identifiée et connue dans des délais courts avec un prélèvement des ongles réalisé autant que possible dès la connaissance de l'accident. Le fait qu'un simple lavage de main annihile complètement le RIS2 impose des conditions de délais encore plus sévères. Ceci implique en pratique que l'accident soit quasiment immédiatement connu et que les ongles soient prélevés sans attendre et stockés dans des conditions adéquates. On comprend que ces conditions ne permettent pas d'envisager une application pour le tri de population, et que l'utilisation du RIS2, si aucune autre composante ne permettait d'estimer une dose sur les ongles, se limite à des situations d'accident se produisant dans des installations nucléaires avec des équipes d'assistance réactives et ayant connaissance des procédures. Si l'on regarde les accidents de ces vingt dernières années, une telle procédure aurait pu s'appliquer à un ou deux cas d'accident (Sarov (1996) et Tokai-Mura (1997)). Dans ces deux cas, il s'agit d'accidents de criticité qui ont été immédiatement identifiés du fait de la production d'un « flash » de criticité. Dans le cas de l'accident de Sarov, les doses aux mains étaient extrêmement élevées (manipulation d'un assemblage critique) (AIEA, 2001). La composante de la dose due aux neutrons a été estimée au niveau des mains par l'activation du soufre contenu dans les ongles et celle due aux photons aurait pu être estimée par RPE.

Au final, compte tenu du champ d'application limité pour l'utilisation du RIS2, et du fait que ce signal peut être facilement éliminé par humidification, nous ne reportons pas l'ensemble des données que nous avons acquises sur le RIS2. En effet, le RIS2, induit par les post-irradiations nécessaires pour l'estimation des doses et qui peut être alors considéré comme un signal parasite, peut être éliminé par humidification. Un premier protocole concernant son utilisation avait été néanmoins publié au début de la thèse sur la base des connaissances acquises à cette époque (Trompier et al., 2007).

***La décroissance du RIS2 est liée au taux d'humidité de l'ongle. Ce signal est donc difficile d'utilisation pour une estimation de dose. Une humidification de l'ongle permet d'éliminer le RIS2.***

### **B.4.3 Influence de la température sur la stabilité du RIS2**

Même si ce signal est relativement intense, du fait l'influence de l'humidité, le RIS2 présente peu d'intérêt en dosimétrie. Cependant, dans l'ensemble des travaux publiés sur la dosimétrie avec les ongles, seul le RIS2 a été jusqu'à ce jour considéré (Symons et al., 1995 ; Trompier et al., 2007, Reyes et al., 2008 ; Reyes et al., 2009 ; Wilcox et al., 2010 ; Black & Swarts, 2010 ; Romanyukha et al., 2010 ; He et al., 2011). Pour tenter de comprendre et d'interpréter les données publiées, nous avons également étudié l'effet de la température sur des ongles déshydratés.

La Figure V.7 montre la décroissance du RIS2 en fonction de la température de stockage pour des ongles fraîchement prélevés. De la même manière que pour les autres composantes induites dans les ongles, la constante de décroissance augmente avec la température. On peut

noter que pour les températures les plus basses, le signal est stabilisé de la même manière que pour des ongles déshydratés. La conservation des ongles à basse température permet donc d'arrêter la décroissance du RIS2, ce qui peut présenter un intérêt si les conditions d'un accident permettaient d'envisager une estimation des doses à partir du RIS2. C'est-à-dire si les ongles ne sont pas humidifiés et s'il est possible de les prélever dans un délai court après irradiation. De telles conditions sont extrêmement rares et très éloignées des conditions d'un accident de grande ampleur. A contrario, si l'objectif est d'éliminer cette composante, une élévation de la température peut permettre d'augmenter la cinétique de décroissance. Etant donné que ce signal est instable et facilement éliminé, et que son champ d'application est de ce fait très limité, nous n'avons pas jugé utile de reporter une courbe de traitement thermique isochrone.

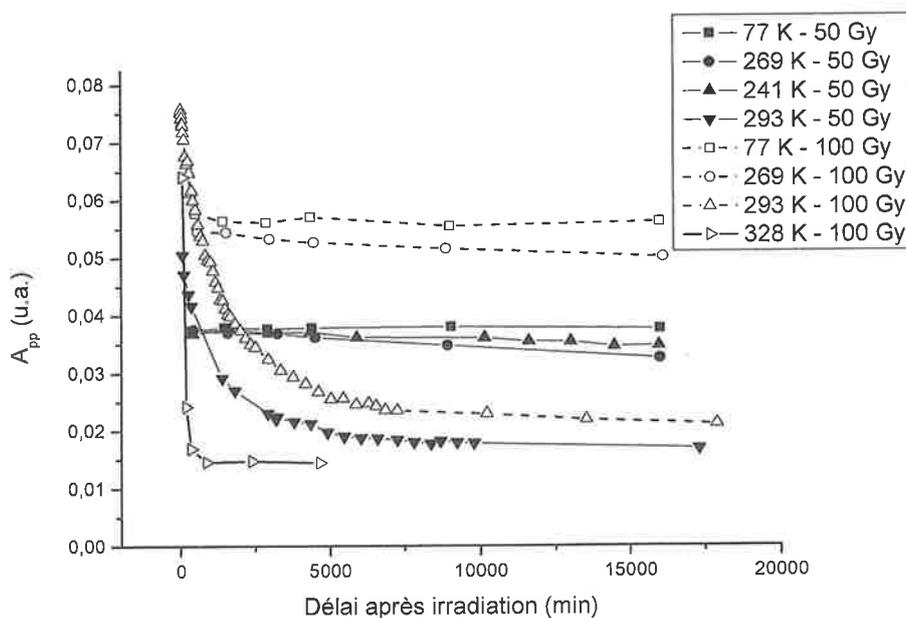


Figure V.7 : décroissance du RIS2 en fonction de la température de stockage des ongles (Isotherme). Mesure réalisées en bande X à température ambiante à une puissance micro-onde de 2 mW.

**La décroissance du RIS2 est également liée à la température de stockage de l'ongle. Une élévation de la température de stockage permet d'augmenter la cinétique de décroissance.**

#### B.4.4 Amplitude du RIS2 en fonction de la dose

Dans Reyes et al. (2009), nous avons mis en évidence que la réponse en dose était différente selon que l'on ait considéré des ongles fraîchement prélevés ou des ongles déshydratés (Fig. V.8). Les ongles déshydratés présentent une sensibilité<sup>2</sup> plus élevée à la dose d'environ 40% en moyenne. Dans les deux cas, la réponse à la dose peut être parfaitement ajustée par une fonction linéaire ( $R^2 = 0,999$  pour les deux courbes).

<sup>2</sup> La sensibilité est définie comme le rapport amplitude du signal sur la dose. Cette quantité n'est pas toujours corrélée au rendement radiolytique.

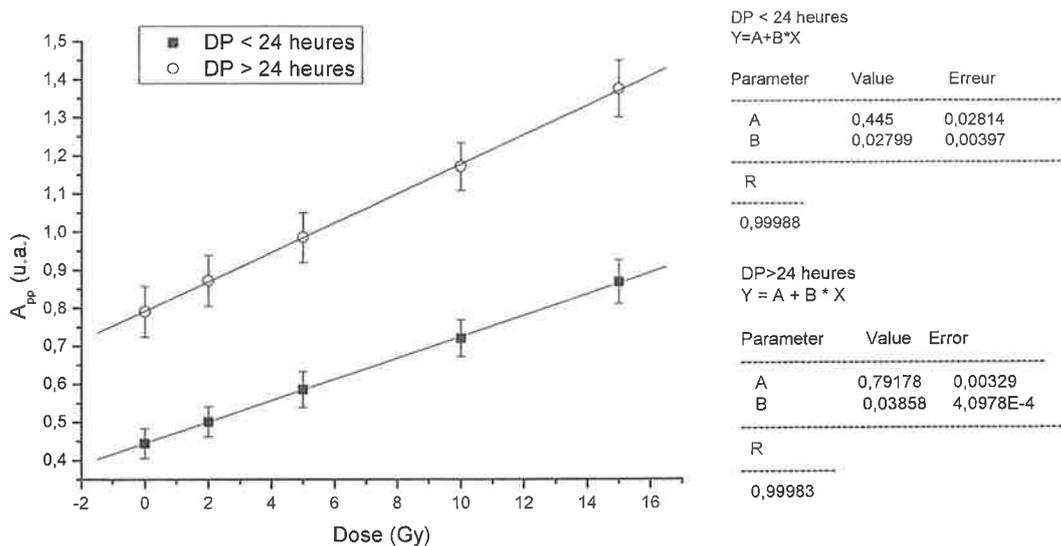


Figure V.8 : variation de l'amplitude du RIS2 en fonction de la dose pour des ongles irradiés pour différents délais après prélèvements (DP), dans des délais inférieurs ou supérieurs à 24 heures (Courbes réalisées à partir des données publiées dans Reyes et al., 2009).

Dans Reyes et al. (2009), nous avons noté une corrélation entre, d'une part, le temps écoulé entre le prélèvement et l'irradiation et, d'autre part la sensibilité, mais sans pour autant interpréter cette dépendance. La sensibilité à la dose augmente en fonction du délai après prélèvement. Ces données ont été acquises en prenant soin de contrôler autant que possible les paramètres pouvant influencer sur l'amplitude du RIS2 (température, délai entre irradiation et mesure, humidité, etc.).

Le seul paramètre variant entre les deux types d'échantillon est donc le temps après prélèvement, ce qui implique une variation avec le taux d'humidité des ongles. Nous avons mis en évidence précédemment qu'une faible variation du taux d'humidité pouvait affecter de manière significative la constante de décroissance du RIS2 et a priori de manière identique quelle que soit la dose. Une différence de 40% au niveau de l'amplitude du RIS2 est parfaitement compatible avec les taux d'humidité associés aux deux types d'ongles. C'est, par exemple, la différence qui pourrait être observée 10 heures après irradiation à température ambiante pour des ongles présentant un taux initial d'humidité de 5,5 et 3%.

La variabilité observée sur la réponse en dose des deux types d'ongles étudiés peut être considérée comme faible par rapport à d'autres matériaux biologiques étudiés par RPE. L'écart-type sur la sensibilité moyenne est respectivement de 6% pour les ongles fraîchement prélevés et de 2% pour les ongles prélevés plus anciennement, à comparer avec 13 % pour l'émail dentaire (Wieser et al., 1996). A priori, il semble difficile de déterminer si la variabilité apparente est liée à une variation du rendement radiolytique, correspondant au nombre d'espèces créées par 100 eV d'énergie déposée, ou à une variabilité du taux d'humidité. Cependant, la variabilité du taux d'humidité est supposée plus importante pour les

## *Chapitre V Les signaux induits par irradiation dans les ongles*

ongles fraîchement prélevés et à variation égale l'effet est plus important que pour les ongles plus anciens et donc plus secs. Ceci est cohérent avec le fait que la variabilité est plus importante pour les ongles fraîchement prélevés que pour les ongles plus secs.

On se rend compte, avec ces dernières observations, qu'il serait extraordinairement compliqué d'estimer une dose à partir du RIS2. La question de l'étalonnage devient complexe et très sensible aux conditions extérieures et à l'humidité de l'ongle. Ceci peut induire, pour peu qu'une méthodologie soit développée, des erreurs significatives sur l'estimation de la dose pour de petites variations sur l'estimation de l'humidité de l'ongle.

Concernant la saturation du RIS2 en fonction de la dose, nous avons noté un comportement linéaire de la réponse d'ongles déshydratés jusqu'à au moins 300 Gy (Trompier et al., 2009). Ces données ne sont a priori pas en accord avec celles de Black & Swarts (2010) qui observaient une saturation à des doses inférieures à 100 Gy, avec des ongles humidifiés avant irradiation. Nous avons pu noter de telles différences de comportement lorsqu'il s'agissait d'ongles fraîchement prélevés et lorsque le délai entre irradiation et mesure était soit de l'ordre de quelques heures, soit de plusieurs jours voire semaines (Reyes et al., 2008). Lorsque le délai entre l'irradiation et la mesure est significatif ou lorsque les ongles sont humidifiés avant irradiation, la courbe de réponse en dose observée n'est plus dominée par le RIS2 qui a en grande partie décliné, mais est dominé en fait par la composante stable du RIS ( $g=2,004$ ), le RIS5 qui présente une saturation en dose autour de 50 Gy comme nous le verrons dans la partie B.5. En bande X, il n'est pas possible de séparer ces deux contributions. Dans Reyes et al. (2008), nous avons également mis en évidence des comportements très différents de la réponse en fonction de la dose, selon que les ongles étaient ou non humidifiés avant la première irradiation. Nous avons alors tenté d'expliquer les différences de réponse par les effets de déformation mécanique qui se produisent dans les ongles lors de la coupe. Avec les données que nous avons acquises depuis, notamment la compréhension des différentes composantes du RIS vis-à-vis de l'humidité et l'identification d'une nouvelle composante du RIS, le RIS5, il est devenu possible d'expliquer l'ensemble des phénomènes observés avec les ongles irradiés et également les apparentes contradictions entre les différentes données publiées dans la littérature.

***En conclusion, il semble très difficile avec les connaissances acquises d'estimer avec précision une dose reçue sur la base de l'analyse de l'amplitude du RIS2, du fait de l'influence de l'humidité sur l'amplitude de ce signal. Ceci tend à expliquer pourquoi aucune application sur des cas réels n'a jamais été reportée à ce jour, bien que plusieurs équipes aient étudié cette problématique, car, dans toutes ces études, seul le RIS2 a été considéré pour estimer les doses. L'un des points marquants de cette thèse est la mise en évidence d'une composante du RIS stable et non affectée par l'humidité.***

#### B.4.5 Origine du RIS2

Précédemment, nous avons mis en évidence, notamment par l'utilisation de la bande Q, que le RIS2 et le MIS2 présentaient des caractéristiques spectrales légèrement différentes. Le facteur  $g$  du RIS2 est légèrement supérieur à 2,005, alors que celui du MIS2 ou du « BG » est de 2,004. Ce décalage de valeur de  $g$  peut indiquer qu'il s'agit d'un radical différent de ceux à l'origine du MIS2 et du « BG ». Un signal de type singlet avec  $g=2,0053$  présent sur les spectres de cystéine irradié a été attribué au radical sulfonyle ( $RSO_2^\circ$ ) (Sevilla et al., 1988). La Figure V.9 donne une représentation de ce radical. Il est donc tout à fait possible d'envisager ce radical comme étant à l'origine du RIS2.

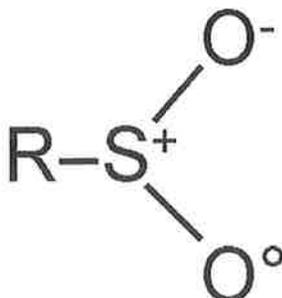


Figure V.9 : représentation schématique du radical associé au RIS2

Ce radical est produit à partir de la réaction des radicaux thiyl ( $RS^\circ$ ) avec l'oxygène selon la réaction donnée dans l'Equation V.1.



La réaction du radical thiyl avec l'oxygène donne un radical thiol peroxy. Ce radical a été identifié par des mesures réalisées à basse température (Sevilla et al., 1988). Sous l'action d'une source lumineuse, le radical thiol peroxy se dégrade en radical sulfonyle.

Si le radical sulfonyle permet d'expliquer les caractéristiques du RIS2, notamment la valeur de  $g$ , il reste à expliquer pourquoi sa formation est prépondérante par rapport au RIS1 et RIS4, ces derniers étant également formés à partir des radicaux thiyls. Il faut aussi souligner que ce radical n'a pas été observé dans le MIS, alors que d'autres espèces sont formés à partir du radical thiyl, notamment en présence d'oxygène, tel le MIS4 ( $RSO^\circ$ ).

Deux différences entre les conditions de réaction dans le cas du stress mécanique et de l'irradiation peuvent être notées. D'une part, dans le cas de l'irradiation, la production de radicaux thiyls à partir du radical anion ( $R-S-S-R^\circ$ ) entraîne la présence de l'ion thiolate ( $RS^-$ ) (§B.1). D'autre part, dans le cas du stress mécanique les espèces radicalaires primaires ( $RS^\circ$ ) sont beaucoup plus concentrées que dans des radicaux thiyls induits par l'irradiation. S'il s'agit bien pour le RIS2 du radical sulfonyle, alors il conviendra d'essayer de comprendre en quoi ces différences de conditions peuvent induire des mécanismes réactionnels très

différents : soit à la formation du radical sulfonyl, soit à la formation du radical sulfinyl et perthiyl. Il faut également noter que la saturation apparente du RIS2 (Fig. V.1) correspond à l'apparition du RIS1 et du RIS3. Comme ces trois signaux sont formés à partir des mêmes espèces, ce n'est pas une baisse de concentration des radicaux thiyls qui est à l'origine de la saturation du RIS2. La dose augmentant, les propriétés du milieu sont modifiées (pH, ozone, etc.). Cette observation est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle les propriétés du milieu peuvent modifier les mécanismes réactionnels à partir des radicaux thiyls.

### B.5 Etude et description du RIS 5 : composante stable du RIS

L'identification de ce signal constitue le principal résultat de ce travail de thèse, parce qu'il est ainsi possible d'envisager une application à la dosimétrie beaucoup plus robuste qu'avec le RIS2. De la même manière que nous avons étudié l'évolution du « BG » en fonction du nombre de coupes, nous avons également étudié la variation du signal résiduel après humidification en fonction de la dose délivrée. Si pour le signal résiduel nous n'avons pas mis en évidence un lien entre le « BG » et le stress mécanique, il n'en est pas de même quant à l'irradiation. La Figure V.10 montre l'évolution du signal résiduel en fonction de la dose délivrée. Après chaque irradiation, l'échantillon est humidifié pendant 10 minutes puis séché pendant 12 heures dans un dessiccateur sous vide. On note que l'amplitude du signal résiduel augmente avec la dose délivrée. Cette nouvelle composante du RIS qui se superpose au « BG » et qui n'a pas d'équivalent dans le MIS est nommée RIS5. **Ce signal n'avait jamais été mis en évidence auparavant**, probablement du fait de sa faible intensité et de sa similarité avec le « BG ».

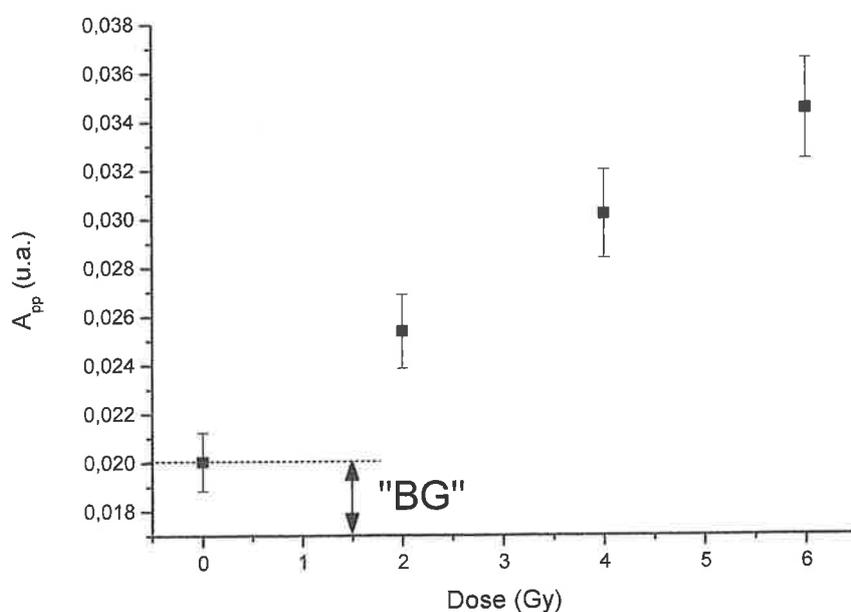


Figure V.10 : Variation de l'amplitude du signal résiduel mesuré en fonction de la dose délivrée. Les ongles sont humidifiés et séchés après chaque irradiation. Mesures réalisées en bande Q à température ambiante. Courbe réalisée avec le nouveau protocole de mesure (chapitre VI).

## *Chapitre V Les signaux induits par irradiation dans les ongles*

Il est intéressant de noter que sur ces mesures, il est possible de distinguer du « BG », à partir de l'amplitude des signaux mesurés, une dose de 2 Gy et très probablement une dose de l'ordre du Gy. Cependant, en bande Q, il n'est pas possible au niveau spectral de différencier le « BG » du RIS5, ce qui est en soit un problème pour l'évaluation des doses, le « BG » constituant donc l'équivalent d'une pré-dose qu'il faudra soustraire au signal mesuré après irradiation pour pouvoir estimer à partir de l'intensité du RIS5, une dose délivrée. De la variabilité sur l'amplitude du « BG », dépendront la limite de détection et les incertitudes associées pour l'estimation des doses avec le RIS5.

Jusqu'à présent toutes les courbes de réponse en fonction de la dose publiées et les estimations qui étaient faites des limites de détection étaient réalisées sur la base de la mesure du RIS2, qui est nettement plus intense. Pour des mesures en bande X sur des masses supérieures à 25 mg, les limites de détection estimées pour le RIS2 sont de l'ordre de 2 Gy (Reyes et al., 2008). Pour le RIS5, avec des mesures réalisées en bande Q sur des masses relativement faibles (2-7 mg), il semble également possible de mettre en évidence des doses de l'ordre de quelques Gy avec une très bonne reproductibilité. L'écart-type sur ces mesures varie entre 4 et 6%. La maîtrise de l'utilisation de la bande Q pour des applications de dosage a été développée au cours de cette thèse. Il faut noter que ces données ont été obtenues avec un nouveau protocole de mesure basé sur la normalisation des mesures par le facteur de qualité de la cavité. Cette nouvelle procédure mise au point dans la partie finale de la thèse sera détaillée dans le chapitre VI. Cette procédure permet de réduire significativement la dispersion des mesures. D'un point de vue pratique, ces résultats en bande Q sont importants, car dans la situation de tri, il n'est pas certain de pouvoir récupérer pour toutes les victimes potentielles les quantités nécessaires à la mesure en bande X (20-40 mg). Comme la bande Q a comparativement une meilleure sensibilité pour les faibles masses (<10 mg), cette technique semble donc incontournable pour les applications de tri. Cependant, en bande Q, à masse égale, nous avons noté des différences importantes d'un échantillon à l'autre en termes de sensibilité. Le facteur de qualité, qui est directement relié à la sensibilité, est fortement influencé par les différentes formes des ongles et les variations de leur taux d'humidité résiduel. Nous verrons à la fin de ce chapitre, qu'il semble néanmoins possible de maîtriser ces paramètres, ce qui permettrait d'utiliser des courbes d'étalonnages universelles nécessaires pour le tri de population.

### **B.5.1 Etude de la stabilité du RIS5**

Nous avons vu que le signal mesuré à  $g=2,004$  augmente régulièrement avec la dose de rayonnement et que cette composante n'est pas affectée par l'humidité, du moins pour un bain d'une durée de 10 minutes. Pour envisager une application en dosimétrie, il est nécessaire de s'assurer de la stabilité du signal. Dans les scénarios envisagés, le délai entre l'exposition et le prélèvement peut varier de quelques heures à plusieurs semaines ou mois. Nous avons évalué la stabilité du RIS5 avec plusieurs schémas expérimentaux. Nous avons vérifié que des bains

prolongés et multiples dans l'eau n'affectaient pas l'amplitude de ce signal. Nous avons également réalisé sur des ongles déshydratés des études isochrones en fonction de la température.

### B.5.1.1 Effet de la température sur l'amplitude du RIS5

Nous avons mis en évidence que le RIS5 était stable à température ambiante et qu'il n'était pas affecté par des bains répétés dans l'eau distillée. Nous avons également mesuré des ongles irradiés régulièrement sur des périodes de plusieurs mois, sans noter de variation significative de l'intensité du signal. Une fois l'ongle prélevé, à température ambiante, le RIS5 n'évolue plus. Concernant l'évolution du signal *in vivo*, nous n'avons pas de données expérimentales sur la stabilité du RIS5. Cependant, compte tenu que le RIS5 n'est a priori pas sensible à l'humidité, ceci laisse à penser que, suite à une irradiation *in vivo* des ongles, ce signal devrait être mesuré sur des prélèvements même réalisés plusieurs jours après irradiation. Nous verrons dans le chapitre VI, sur la base des résultats obtenus pour un cas réel, qu'en fait ce signal est stable au minimum pendant plusieurs semaines *in vivo* et plusieurs années *ex vivo* après prélèvement. Les mesures réalisées en fonction de la température permettent de confirmer le caractère stable du RIS5. Sur la Figure V.11 est présentée une courbe de chauffage isochrone d'ongles irradiés et préalablement humidifiés pour éliminer le MIS et les autres composantes du RIS. Cette courbe permet de confirmer la stabilité observée du RIS5. Le signal commence à être affecté par le chauffage à partir de 130°C, soit des températures similaires à celles observées pour le « BG ».

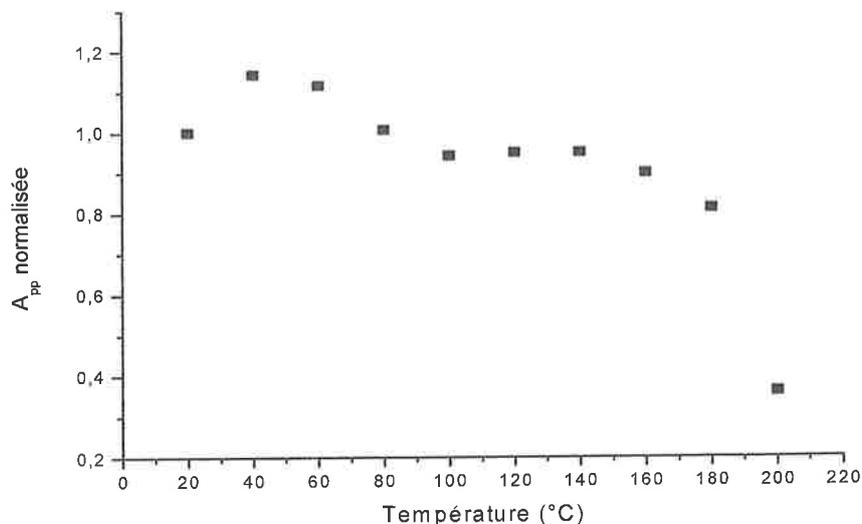


Figure V.11 : courbe de chauffage isochrone ( $\Delta t=10$  min) d'un ongle irradié à 60 Gy, humidifié et séché avant mesure. Mesure réalisée en bande Q à température ambiante et à une puissance micro-onde de 1 mW.

**Le RIS5 présente un comportement vis-à-vis de la température proche de celui du « BG ». Le RIS5 commence à être affecté par la température au delà de 130 °C.**

### B.5.1.2 Etude de l'humidité sur l'amplitude du RIS5

Afin d'étudier l'effet de l'humidité sur l'amplitude du RIS5, nous avons soumis un échantillon d'ongle préalablement irradié à 55 Gy à des bains successifs dans de l'eau distillée. La Figure V.12 présente l'influence sur l'amplitude du signal mesuré de bains répétés dans de l'eau distillée.

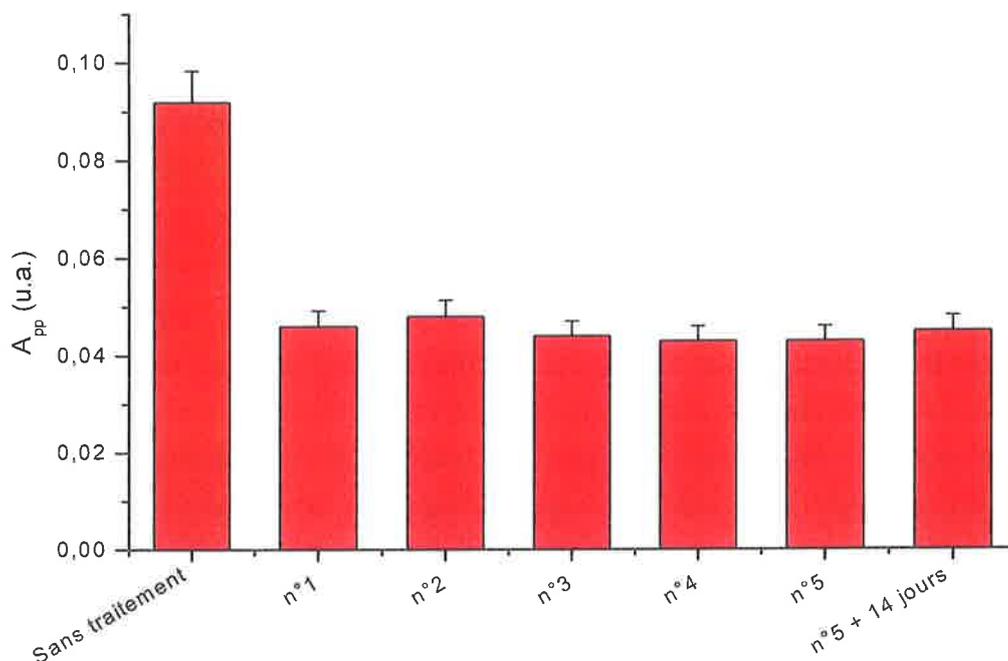


Figure V.12 : effet de bains répétés dans de l'eau distillée sur le signal mesuré à  $g=2$  (« BG » + RIS5. Mesures réalisées à température ambiante en bande Q sur un échantillon irradié à 55 Gy.

On peut noter qu'après chaque humidification de l'ongle, les variations observées de l'amplitude du signal sont comprises dans les incertitudes de mesure. Lorsque l'ongle est conservé à l'air libre pendant plusieurs jours, on note une légère augmentation du signal (6%). Nous avons remarqué que cette augmentation est d'autant plus élevée que la dose est faible. Il faut rappeler que l'amplitude du « BG » augmente dans les mêmes conditions et l'amplitude finale correspond à 2,2 fois l'amplitude initiale. Si l'on prend en compte l'augmentation du « BG » et les proportions du « BG » et du RIS5 dans le signal mesuré à  $g=2,004$ , alors la légère augmentation observée sur la Figure V.12 est a priori uniquement due à l'augmentation du « BG ». L'amplitude du RIS5 ne semble donc pas varier au cours du temps, du moins sur les délais étudiés. Compte tenu de la différence de comportement du « BG » et du RIS5 après humidification, il est en théorie possible d'estimer la contribution de chaque signal dans le signal mesuré à  $g=2,004$  en mesurant ce signal après humidification ( $A_1$ ) et après stabilisation du « BG » ( $A_2$ ) ou l'amplitude du « BG » est multiplié par un facteur 2,2. En effet, nous avons alors un système de deux équations à deux inconnues (Equ. V.2), facilement résolu (Equ. V.3).

$$\begin{cases} A_1 = (A_{BG} + A_{RIS5}) \\ A_2 = (2,2 \times A_{BG} + A_{RIS5}) \end{cases} \quad \text{Équation V.2}$$

$$\text{et} \quad \begin{cases} A_{BG} = \frac{(A_2 - A_1)}{1,2} \\ A_{RIS5} = \frac{(A_2 - 2,2 \times A_1)}{2} \end{cases} \quad \text{Équation V.3}$$

avec  $A_1$  l'amplitude du signal à  $g=2,004$  mesurée 12 heures après humidification et  $A_2$  celle mesurée après stabilisation.

Ainsi pour un ongle irradié à une dose de 12 Gy les amplitudes  $A_1$  et  $A_2$  étaient respectivement de 0,036 u.a. 12 heures après humidification et de 0,056 u.a. 26 jours après humidification. La valeur mesurée de l'amplitude du « BG » était de 0,016 u.a. préalablement à l'irradiation de l'échantillon et 12 heures après humidification. Si l'on applique l'Equation V.3, on trouve à partir des valeurs de  $A_1$  et  $A_2$ , une valeur de  $A_{BG}$  égale à 0,017 u.a.. Si cette méthode devait être utilisée, il conviendra d'en étudier les performances dans le détail et sur un échantillonnage important.

Il est bien évident que, dans des conditions réelles d'expertise, il n'est pas possible d'attendre plusieurs jours pour atteindre la stabilisation du « BG ». Cependant, s'il est nécessaire d'appliquer cette méthode pour estimer la valeur du « BG » et donc du RIS5 et s'il s'agit de doses relativement faibles ( $< 10$  Gy), il n'est pas nécessaire d'attendre la complète stabilisation du « BG », pour peu que l'augmentation du « BG » puisse être décrite par une loi. Un délai de 48 heures peut être suffisant pour une première estimation, qui pourra être confirmée par une deuxième mesure après stabilisation complète. On pourra aussi envisager d'étudier les possibilités de diminuer le temps de stabilisation, par exemple par la mise en œuvre de dessiccateur ou l'usage de four.

*Avec les conditions expérimentales de cette étude, nous n'avons mis en évidence un effet de l'humidité sur l'amplitude du RIS5. L'absence d'effet de l'humidité et sa grande stabilité thermique permettent d'envisager son utilisation pour estimer les doses de rayonnements ionisants.*

### **B.5.1.3 Effet des ultra-sons sur l'amplitude du RIS5**

Nous avons également étudié la stabilité du RIS5, lorsque l'ongle était soumis à des ultrasons. En effet, les ultrasons permettent de réduire significativement le « BG », il s'agissait donc de déterminer si un effet différencié sur le RIS5 pouvait être mis en évidence. Un ongle

préalablement irradié et humidifié pour réduire toutes les composantes instables a été traité pendant 45 minutes dans le même bain à ultrason que celui utilisé pour le « BG ». Une durée de 45 minutes permet de réduire l'amplitude du « BG », d'un facteur 5, soit à un niveau proche de celui du seuil de détectabilité du spectromètre. Une réduction du signal a également été observée sur le RIS5 comme pour le « BG » mais avec une réduction de l'amplitude d'un facteur 10 pour un traitement de 45 minutes.

Compte tenu de l'effet différencié observé, il est possible d'envisager d'utiliser cet effet pour estimer la valeur du « BG » et du RIS5. Cela se résume à un système de deux équations à deux inconnues de la même manière que dans le paragraphe traitant de la stabilité du RIS5 post-humidification. Cependant, pour des raisons pratiques de mesure et d'incertitudes, il sera nécessaire d'optimiser la durée des temps de traitement en fonction des incertitudes de mesure sur les amplitudes du « BG » et du « RIS5 ». L'effet des ultrasons est dépendant de la puissance et de la fréquence des ultrasons utilisés. Dans le cadre de l'optimisation de la différenciation, il pourrait être intéressant de poursuivre cette étude avec d'autres sources d'ultrasons pour éventuellement trouver des conditions induisant un effet différencié plus important.

*De la même manière que le « BG », l'amplitude du RIS5 décroît suite à une exposition aux ultrasons. Dans des conditions expérimentales similaires la perte de signal est deux fois moins importante pour le RIS5 que pour le « BG ».*

#### ***B.5.1.4 Conclusions sur la stabilité du RIS5***

*Le RIS5 n'est pas affecté par l'humidité et montre une stabilité thermique équivalente à celle du « BG ». Contrairement au « BG », le RIS5 n'exhibe pas une augmentation de son amplitude au cours de la déshydratation de l'ongle. L'effet des ultrasons est deux fois plus important que pour le « BG ». Les comportements différents du « BG » et du RIS5 vis-à-vis de la déshydratation et des ultrasons pourraient être mis à profit pour estimer les contributions respectives du « BG » et du RIS5.*

#### **B.5.2 Etude de la réponse en dose du RIS5**

Dans cette partie, il s'agit d'étudier de manière plus détaillée la réponse en fonction de la dose, notamment pour savoir si un effet de saturation existe et, dans ce cas, identifier les paramètres pouvant éventuellement l'affecter. Sur la Figure V.13 est donné un exemple de la réponse de l'amplitude du RIS5 en fonction de la dose entre 0 et 55 Gy.

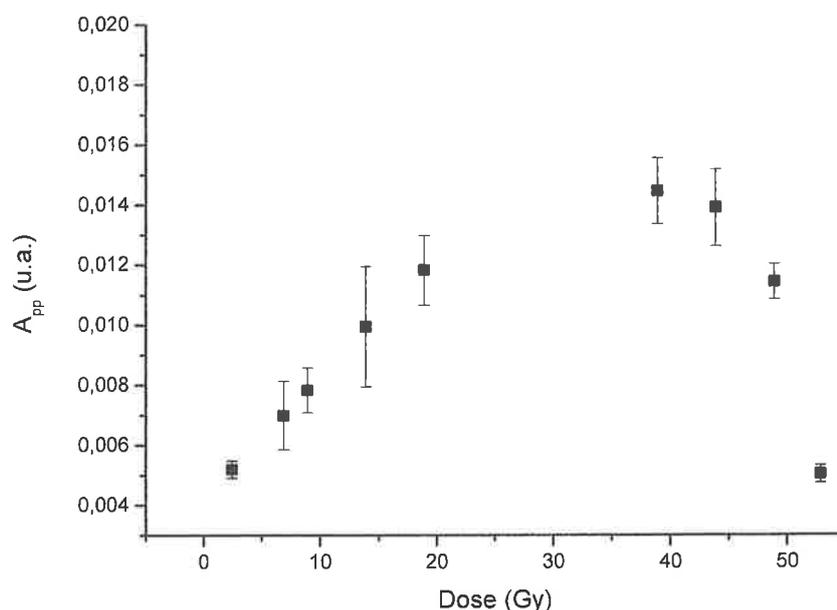


Figure V.13 : variation de l'amplitude du signal mesuré à  $g=2,004$  en fonction de la dose. Mesures réalisées en bande Q à température ambiante à une puissance micro-onde de 1 mW.

On peut noter que si pour les doses les plus faibles, on observe un comportement de la réponse en fonction de la dose qui peut être considéré comme linéaire, pour les doses plus élevées une saturation progressive du signal apparaît, puis à partir d'une certaine valeur de dose une diminution de l'amplitude du signal. Ce comportement vis-à-vis de la dose est peu courant parmi les systèmes de dosimétrie utilisés. Si on observe généralement des effets de saturation liés à l'irradiation, il est assez rare d'observer une diminution du signal après saturation. Un tel comportement peut s'expliquer par la compétition de plusieurs réactions et possiblement par l'existence de plusieurs types de radicaux présentant des comportements en saturation différent.

Il semble donc qu'une ou plusieurs espèces radio-induites réagissent pour former des espèces silencieuses du point de vue RPE. Nous avons vu précédemment qu'après irradiation l'amplitude du RIS5 ne variait pas au cours du temps, ni après une série de bains dans de l'eau distillée. Tout semble donc indiquer que la réaction d'élimination des espèces liées au RIS5 est induite par l'irradiation.

La valeur de saturation en dose est variable d'un donneur à l'autre. Cette valeur ne semble pas être affectée pour un même donneur par le nombre de traitement dans l'eau ou le fractionnement plus ou moins important des doses ou encore par le fait que les échantillons soient initialement plus ou moins stressés mécaniquement.

Dans une première étude sur la variabilité de la valeur de saturation en dose, nous avons estimé une valeur moyenne égale à  $45 \pm 8$  Gy sur un échantillonnage d'ongles provenant de 10 donneurs. Compte tenu que le RIS5 a été mis en évidence en fin de thèse, nous n'avons pas

à ce stade étudié de manière extensive la variabilité de la réponse en dose entre donneurs et pour des échantillons provenant d'un même donneur. Si ce travail reste encore à réaliser avant d'envisager une éventuelle application pour le tri de population par exemple, il bénéficiera des nouveaux protocoles de mesure mis en place qui permettent d'améliorer les incertitudes de mesure.

De plus, comme nous avons mis en évidence que ni le BG, ni le RIS5 n'étaient affectés par le stress mécanique, il semble tout à fait envisageable de préparer les échantillons de manière à rendre les mesures plus reproductibles, c'est-à-dire à les réduire en poudre ou en petits morceaux, notamment pour éviter les effets d'anisotropie. Sous cette forme, les échantillons seront également mesurés avec un meilleur rendement, car l'ensemble de l'échantillon est alors mesuré au centre de la cavité, ce qui permet d'espérer un gain au niveau de la sensibilité.

*La réponse du RIS5 à la dose est non linéaire sur l'ensemble de la gamme de dose étudiée. Le comportement est linéaire en dessous de 10 Gy, une saturation est observée autour de 45 Gy, puis une diminution du signal au-delà. Ce comportement atypique peut s'expliquer par différents mécanismes radicalaires en compétition lors de l'irradiation.*

### **B.5.3 Méthodes d'estimation de la dose**

Avec les résultats obtenus précédemment, nous pouvons envisager deux approches pour estimer les doses, la première basée sur les méthodes classiques d'étalonnage, la deuxième utilisant le phénomène de saturation du signal. Ces deux méthodes sont complémentaires, car adaptées à des gammes de dose différentes.

L'utilisation des courbes d'étalonnage semble être la plus adaptée à l'estimation des doses inférieures à 10 Gy. Dans cette gamme, la sensibilité du RIS5 à la dose est la plus importante et le comportement quasi linéaire. Le tri de population s'effectue selon des critères de dose compris dans cette gamme. Les courbes d'étalonnage parce qu'elles nécessitent un nombre limité de mesures, sont donc plus rapides et donc particulièrement bien adaptées au tri de population, pour peu que les incertitudes soient au final compatibles avec les critères de tri.

Au niveau des mains, les doses peuvent être localement très élevées lors d'accidents radiologiques incluant une préhension de source par exemple. C'est un scénario d'accident malheureusement classique. Pour les doses supérieures à 10 Gy, l'augmentation du signal par unité de dose est beaucoup plus faible, ce qui implique des incertitudes de mesure plus importantes avec les méthodes classiques d'estimation des doses, d'autant plus que la réponse n'est pas linéaire. Ces incertitudes seront d'autant plus importantes que les doses à estimer seront proches de la valeur de saturation. Il semble alors hasardeux d'extrapoler une dose à l'aide d'une courbe d'étalonnage ou même en appliquant la méthode des ajouts dosés. Une nouvelle méthode d'estimation des doses a ainsi été développée. Celle-ci est basée sur le phénomène de saturation du signal radio-induit. Cette méthode est plus longue à mettre en œuvre et ne permet en conséquence d'analyser qu'un nombre plus limité d'échantillons. Mais elle présente l'avantage de permettre d'estimer des doses élevées aux niveaux des mains, ce

qui ne peut être réalisé à ce jour que par l'analyse de biopsies osseuses par RPE. Ces biopsies ne sont généralement réalisées qu'en cas de nécrose de l'os, c'est-à-dire bien après la phase de diagnostic et de traitement. Même si cette technique ne répond pas au sujet initial de la thèse (tri de population), on comprend très bien tout l'enjeu pour la dosimétrie d'accident. L'expérience montre qu'il est difficile d'estimer le niveau d'une exposition des mains sur la seule base des signes cliniques. Le fait de disposer d'un test objectif qui ne nécessite pas de biopsie permettra de mettre en place des traitements adaptés avant même l'apparition des signes cliniques.

Que ce soit pour le tri de population ou les scénarios d'accident classiques, il sera nécessaire de pouvoir mesurer des échantillons de faibles masses de l'ordre de quelques mg. Dans le cas du tri de population, pour un certain nombre de sujets, il ne sera pas possible de récupérer plus que quelques mg (ongles coupés courts, onychophagie). Dans le cas des accidents, il est intéressant de mesurer indépendamment les prélèvements de chaque doigt, ce qui permet ainsi d'estimer une dose au niveau de chaque doigt. En effet, dans le cas des irradiations localisées, la dose est répartie de manière très hétérogène et le fait d'évaluer la distribution de la dose est une information précieuse pour les équipes médicales, surtout si cette information est disponible avant l'apparition des signes cliniques (par exemple la thérapie cellulaire par injection est d'autant plus efficace, qu'elle mise en œuvre rapidement).

Dans les deux cas, il faut donc envisager la mesure de faibles masses. La technique de mesure RPE habituellement utilisée en dosimétrie (bande X en onde continue) atteint la limite de ses capacités, la quantité de signal détecté variant avec la masse d'échantillon. Compte tenu de la faible intensité du RIS5 et des faibles masses considérées, lorsque le signal peut être détecté, ceci implique des temps d'acquisition de l'ordre de plusieurs heures. La durée des acquisitions limite alors considérablement les capacités des deux techniques d'estimation des doses, quelques soit l'application envisagée. C'est pourquoi, nous avons été amenés à considérer l'utilisation de la RPE en bande Q qui permet de mesurer avec une plus grande sensibilité les échantillons de faibles masses. Cette technique RPE n'est pas utilisée en dosimétrie du fait des problèmes de reproductibilité de mesure qu'elle implique. Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu identifier un certain nombre de paramètres qu'il était important de maîtriser pour réaliser des mesures suffisamment reproductibles pour sérieusement envisager des applications en dosimétrie (chapitre VI). Les performances de la RPE bande Q sont détaillées dans le chapitre VI.

### ***B.5.3.1 Méthodes d'estimation de la dose pour les faibles doses***

Avec la RPE bande Q, il est a priori possible d'estimer des doses de l'ordre de quelques Gy (Fig. V.10). Il est important de noter qu'à ce stade nous n'avons pas optimisé l'ensemble des paramètres de mesure, ni la préparation des échantillons, ni les tubes de mesure. Ainsi par exemple, nous avons observé un facteur 2 sur le signal mesuré entre l'utilisation d'un capillaire en quartz et d'un tube de mesure de haute précision en surprazil. Il semble donc tout

à fait possible d'espérer des gains substantiels de sensibilité et donc également en termes de limite de détection. En bande Q, s'il est possible de réaliser des mesures reproductibles pour un même échantillon d'ongle, nous avons cependant noté que les variations de la forme des échantillons d'ongle pouvait induire des variations significatives de l'intensité du signal mesuré. Nous avons ainsi observé que, pour une même biopsie d'ongle, le fait de retourner la biopsie dans le tube de mesure pouvait induire une variation de l'intensité de l'ordre de 40 %. Ceci limite donc l'utilisation de courbes d'étalonnages. Cependant avec des matériaux dont la forme est moins variable, comme l'émail dentaire par exemple, nous avons pu montrer qu'il était possible d'établir des courbes d'étalonnages (Fig. V.14).

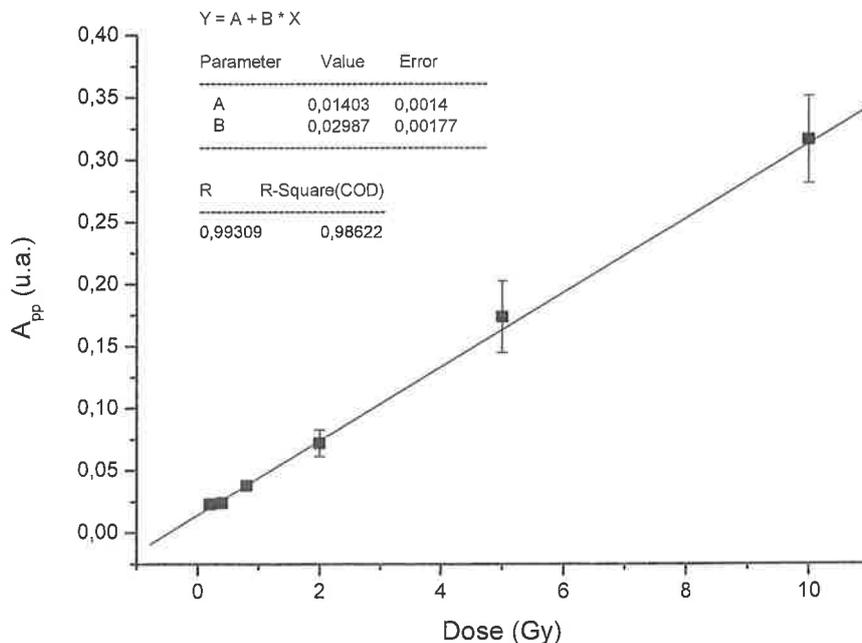


Figure V.14 : courbe d'étalonnage établie en RPE bande Q avec des échantillons d'émail dentaire de masse environ égale à 5 mg. A chaque point de la courbe correspond un échantillon irradié à une dose donnée.

Ainsi, il ne semble donc pas inenvisageable d'utiliser des courbes d'étalonnage universelles pour les ongles avec la RPE bande Q, mais il sera nécessaire de réaliser un travail d'optimisation sur la préparation des échantillons pour permettre cette approche. Compte tenu que le stress mécanique n'affecte ni l'amplitude du « BG », ni la réponse en dose, on peut alors envisager de réduire les échantillons en poudre ou en petits fragments pour limiter les problèmes de géométrie. Avec un échantillon réduit en poudre, il sera plus facile de contrôler la déshydratation et celle-ci devrait être plus rapide.

L'utilisation de courbes d'étalonnage implique également de pouvoir estimer l'amplitude du « BG ». Les incertitudes sur l'estimation de l'amplitude du « BG » sont déterminantes par rapport aux incertitudes sur la dose et aux limites de détection.

A ce stade, il n'est pas possible de mesurer de manière sélective l'amplitude du « BG » pour chaque échantillon. Dans le cas d'accident radiologique avec une irradiation localisée aux

## *Chapitre V Les signaux induits par irradiation dans les ongles*

mains, il est possible d'envisager d'estimer l'amplitude du « BG » à partir de la mesure d'un ongle non irradié. Par exemple, seule une main ou un doigt peuvent être exposés. Dans le cas du tri, il sera difficile de déterminer le degré d'hétérogénéité de la distribution de dose et donc de savoir si des ongles (mains ou pieds) ont pu ne pas être irradiés, ce qui permettrait d'estimer le « BG » par la mesure des ongles épargnés par l'irradiation.

Pour le tri de population, nous n'avons d'autre choix que d'utiliser une valeur moyenne de l'amplitude du « BG » pour estimer la composante radio-induite dans le signal mesuré. Les données publiées dans Reyes et al. (2008) laissent à penser que la variabilité inter-individu de l'amplitude du « BG » estimée en bande X est relativement faible (8%). La limite de détection associée est de l'ordre de 2,1 Gy (chapitre IV, §B.5.4.3).

Cette variabilité peut être en partie due à des problèmes de reproductibilité de mesure, aussi, avec des conditions de préparation et de mesure standardisées et améliorées, il est peut être possible de réduire l'incertitude sur la valeur du « BG ».

Il conviendra d'étudier le « BG » sur un échantillonnage plus important, incluant toutes les catégories de la population (enfants et personnes âgées notamment). Il sera intéressant d'étudier s'il est possible de mettre en évidence des corrélations entre l'amplitude du « BG » et des paramètres tels que l'âge ou le sexe par exemple. L'identification de paramètres susceptibles d'influer sur l'amplitude du « BG » devrait permettre de réduire les incertitudes sur l'amplitude moyenne du « BG » utilisée pour estimer les doses.

Il conviendra également d'étudier dans le détail les méthodes permettant de réduire de manière sélective l'amplitude du « BG », telles que les ultrasons par exemple, ou de l'estimer par exemple à partir de la mesure du « BG » stabilisé.

Pour des perspectives plus lointaines, il serait intéressant de déterminer la nature des radicaux liés au « BG » afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre son intensité et la composition de l'ongle.

*Si le travail d'optimisation des conditions de mesure et de préparation reste encore à accomplir, au final, il semble, à ce stade de l'étude, tout à fait envisageable d'estimer des doses de l'ordre de quelques Gy sur des ongles. Une application pour le tri de population semble réaliste avec les données obtenues d'autant plus que les temps de mesure sont de l'ordre de quelques minutes et que des progrès significatifs ont été réalisés pour maîtriser les différentes sources d'incertitude et d'erreur.*

### ***B.5.3.2 Méthodes d'estimation de la dose pour les fortes doses***

Dans cette gamme de dose avec les méthodes classiques, il ne semble pas possible de mesurer des doses de l'ordre de quelques dizaines de Gy avec des incertitudes compatibles avec les exigences de la dosimétrie d'accident. Cependant, il semble possible de tirer parti du phénomène de saturation. Si ce phénomène intervient à une valeur de dose identique pour les

## Chapitre V Les signaux induits par irradiation dans les ongles

ongles d'un même donneur ou avec une variabilité faible d'un donneur à l'autre, il semble possible d'estimer une dose à partir de cette valeur de saturation.

Pour illustrer la méthodologie, prenons comme hypothèse qu'un ongle provenant d'une victime d'irradiation a reçu, suite à la manipulation d'une source par exemple une dose de l'ordre de 15 Gy, ce qui est une dose relativement courante dans ce type d'accident.

Si des ajouts dosés sont réalisés sur ce prélèvement jusqu'à atteindre le point de saturation, la dose à laquelle la saturation est observée correspond à la dose de saturation qui aurait été normalement observée sur ces ongles non irradiés, soit environ 40 Gy, minorée de la dose due à l'accident, soit 15 Gy. La dose de saturation observée sur les ongles irradiés au cours de l'accident est alors de 25 Gy au lieu de 40 Gy. La différence entre ces deux valeurs de dose de saturation doit permettre de déterminer la dose due à l'accident (Fig. V.15).

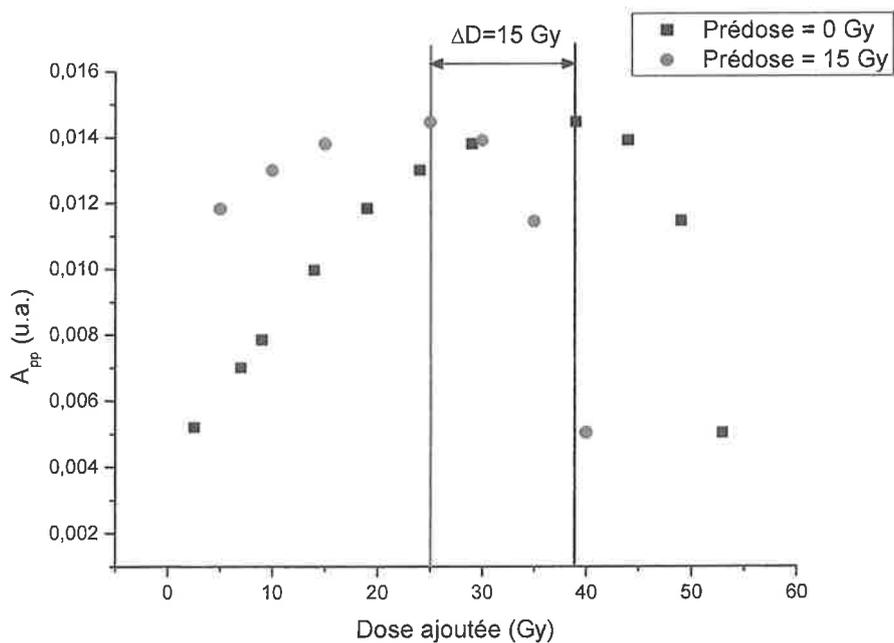


Figure V.15 : principe d'estimation des fortes doses à partir de la valeur de saturation en dose. La prédose correspond à la dose reçue par les ongles avant prélèvement.

Cette méthode devrait permettre d'estimer des doses avec de meilleures incertitudes que les méthodes classiques. Dans le dernier chapitre, nous montrerons un exemple d'application de cette méthode à un cas réel d'accident. Il faut souligner que nous ne connaissons pas de description de cette méthode pour des applications en dosimétrie, cette méthode est a priori une méthode originale d'estimation des doses.

**Pour les plus fortes doses (> 10 Gy) une nouvelle approche développée dans le cadre de cette thèse permet à partir de l'évaluation de la dose de saturation évaluée sur l'ongle, d'estimer la dose délivrée au cours d'un accident.**

### B.5.3.3 Limitations des méthodes d'estimation de la dose

Deux méthodes sont envisagées pour estimer les doses selon la gamme de dose. Pour les faibles doses (<10 Gy), les méthodes classiques d'étalonnage et d'ajouts dosés sont applicables. Pour les plus fortes doses (> 10 Gy) une nouvelle approche développée dans le cadre de cette thèse permet, à partir de l'évaluation de la dose de saturation évaluée sur l'ongle, d'estimer la dose délivrée au cours d'un accident.

Les limitations de ces méthodes sont liées à la valeur de saturation et au temps de pousse des ongles. En effet, il n'est pas possible d'estimer des doses supérieures à la dose de saturation, nous avons donc une limite supérieure de l'ordre de 55 Gy. Par ailleurs, de manière générale, si le signal est a priori stable même *in vivo*, le temps de régénération des ongles conditionne le délai dans lequel il est possible d'utiliser les ongles pour estimer une dose. Sur des personnes saines, ce délai est en moyenne de six mois. Néanmoins, il est fort possible que des doses élevées ralentissent la pousse des ongles.

### B.5.4 Origine du RIS5

Comme pour le « BG » et le MIS2, nous n'avons pas été en mesure d'émettre des hypothèses étayées quant à la nature des espèces associées au RIS5. Le comportement de l'amplitude du RIS5 vis-à-vis de la puissance micro-onde est différent des autres signaux présentant une signature spectrale similaire (cf. « BG »), comme le montre la Figure V.16.

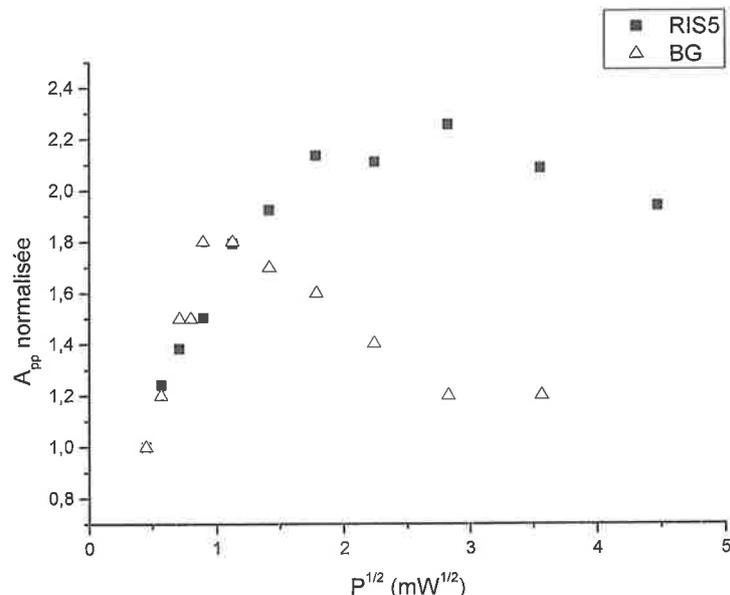


Figure V.16 : variation de l'amplitude du RIS5 en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde comparée à celles du « BG ».

Il semble donc probable, bien que le RIS5 présente une même largeur de raie et un même facteur  $g$  que le « BG » et le MIS2, que les radicaux associés soient différents. Compte tenu de la valeur de  $g=2,004$  du RIS5, on peut envisager qu'il s'agisse de radicaux carbonés. Afin

d'obtenir des éléments permettant de déterminer la nature du RIS5, il serait intéressant de réaliser des mesures à plus haute fréquence RPE (bande W, 95 GHz) et également à l'aide des techniques de RPE pulsée telles que l'ESEEM (2 ou 3 pulses) et la spectroscopie HYSORE. Il est a priori possible d'envisager d'utiliser ce comportement différencié pour minimiser par exemple la contribution du « BG » avec des valeurs de puissance micro-onde de l'ordre de 10 mW en bande X. Cet aspect sera discuté dans le chapitre V. Il est également possible théoriquement de tirer parti de ces comportements différents pour estimer la contribution des deux composantes du signal mesuré (RIS5 et « BG ») selon la méthode d'Ignatiev et al. (1996). Celle-ci ne sera applicable qu'en bande X du fait de la difficulté d'accorder le pont hyperfréquence en bande Q pour les puissances supérieures à 2 mW. Une telle méthode implique également une augmentation des temps de mesure et donc une baisse proportionnelle des capacités de mesure. Il conviendra donc d'évaluer si l'apport éventuel en termes de précision justifie la diminution des capacités de mesure.

### **B.6 Conclusion sur le RIS5**

Nous avons mis en évidence deux nouvelles composantes du RIS : le RIS3 et RIS5. Le principal résultat de cette étude est l'identification d'une composante stable du RIS, le RIS5. Cette composante devrait permettre d'estimer des doses de l'ordre de quelques Gy à quelques dizaines de Gy. Compte tenu du fait que, pour ce signal, la réponse à la dose n'est pas linéaire sur l'ensemble de la gamme de dose, deux approches d'estimation des doses ont été proposées. Pour les faibles doses, l'approche classique par courbe d'étalonnage ou ajouts dosés semble la plus pertinente. Pour les plus fortes doses, compte tenu de l'effet de saturation, une méthode originale a été proposée basée sur cet effet de saturation.

En conclusion, avec les données acquises dans ce travail, il semble tout à fait possible d'utiliser les ongles pour des applications en dosimétrie tant pour les situations d'accident isolé que pour le tri de population. Dans le chapitre VI, les deux approches d'estimation des doses seront détaillées et des premiers cas d'application seront présentés.

## **C. CONCLUSION-PERSPECTIVES**

*Nous avons pu mettre en évidence tant pour le MIS que pour le RIS de nouvelles composantes dans les spectres RPE et préciser la nature de la plupart des composantes. Les principaux résultats de cette étude sont la mise en évidence de l'effet de l'humidité sur la plupart des composantes du MIS et du RIS, la possibilité d'éliminer toutes les composantes instables par humidification et l'identification d'une composante stable du RIS suffisamment intense pour estimer des doses de l'ordre de quelques Gy. Sur la base de ce signal, il semble possible d'envisager la dosimétrie sur les ongles par RPE pour les applications de tri. Les bases de nouveaux protocoles ont été données. Il reste néanmoins à*

*optimiser toutes les étapes des protocoles proposés, notamment en fonction du type de situation, à les valider et à en déterminer les capacités et les performances.*

*Comme une partie des performances repose sur l'estimation de l'amplitude du signal intrinsèque « BG », il conviendra de poursuivre son étude et si possible de préciser sa nature et son mode de formation afin de mieux prendre en compte sa contribution ou éventuellement de l'éliminer de manière sélective.*

## D. REFERENCES

- Akasaka K., Ohnishi S., Suita T., and Nitta I. (1964) ESR study of a single crystal of L-Cystine Dihydrochloride irradiated at low temperature. *J. Chem. Phys.*, 40, 3110-3116.
- Black P. J. & Swarts S. G. (2010) Ex vivo analysis of irradiated fingernails: Chemical yields and properties of radiation-induced and mechanically-induced radicals. *Health Phys.*, 98(2), 301-308.
- Dondi D., Buttafava A., Faucitano A., Fattibene P. (2010) Basic radicals reaction in mechanolysis and photolysis of nails, Présentation orale au congrès EPRBiodose, Mandelieu-la-Napoule, Octobre 2010
- He, X., Gui, J., Matthews, T. P., Williams, B. B., Swarts, S. G., Grinberg, O., Sidabras, J. W., Wilcox, D. E., and Swartz, H. M., (2011) Advances towards using finger/toenail dosimetry to triage a large population after potential exposure to ionizing radiation, *Radiat. Meas.* 46(9), 882-887.
- Ignatiev E. A., Romanyukha A. A., Koshta A., Wieser A. (1996). Selective saturation method for EPR dosimetry with tooth enamel, *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 333-337.
- International Atomic Energy Agency. (2001) The radiological accident in Sarov. IAEA STI/PUB/P1106, IAEA, Vienna.
- Reyes R.A., Romanyukha A., Trompier F., Mitchell C.A., Clairand I., De T. , Benevides L.A. & Swartz H.M. (2008) Electron paramagnetic resonance in human fingernails: The sponge model implication. *Radiat. Env. Biophys.*, 1-12
- Reyes R., Romanyukha A., Olsen C., Trompier F. & Benevides L. (2009) Electron paramagnetic resonance in irradiated fingernails: Variability of dose dependence and possibilities of initial dose assessment. *Radiat. Envir. Biophys.*, 48(3), 295-310.
- Romanyukha A., Reyes R. A., Trompier F. & Benevides L. A. (2010) Fingernail dosimetry: Current status and perspectives. *Health Phys.*, 98(2), 296-300.
- Sevilla M.D., Yan M., and Becker D. (1988) Thiol peroxy formation from the reaction of cysteine thiyl radical with molecular oxygen: an ESR investigation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 155, 405-410.
- Symons M., Chandra H. & Wyatt J. (1995) Electron paramagnetic resonance spectra of irradiated finger-nails: A possible measure of accidental exposure. *Radiat. Prot. Dosim.*, 58, 11-15.
- Trompier F., Kornak L., Calas C., Romanyukha A., Leblanc B., Mitchell C. A., Swartz H. & Clairand I. (2007) Protocol for emergency EPR dosimetry in fingernails. *Radiat. Meas.*, 42, 1085-1088.
- Trompier F., Romanyukha A., Kornak L., Calas C., Leblanc B., Mitchell C., Swartz H. & Clairand I. (2009) Electron paramagnetic resonance radiation dosimetry in fingernails. *Radiat. Meas.*, 44(1), 6-10.

## *Chapitre V Les signaux induits par irradiation dans les ongles*

- Truby F. (1964) Ionic paramagnetic species associated with  $\gamma$ -irradiated Amyl Disulfide. *J. Chem. Phys.*, 40, 2768-2774.
- Wilcox D. E., He X., Gui J., Ruuge A. E., Li H., Williams B. B. & Swartz H. M. (2010) Dosimetry based on EPR spectral analysis of fingernail clippings. *Health Phys.*, 98(2), 309-317.
- Wieser A., El-Faramawy N., and Meckbach R. (2001) Dependencies of the radiation sensitivity of human tooth enamel in EPR dosimetry. *Appl. Radiat. Isot.*, 54, 793-799.

## *Chapitre VI*

# *Développement des protocoles de mesure et applications*

A. Introduction .....	245
B. Elaboration des nouveaux Protocoles .....	246
C. Application à des cas réels d'accidents .....	256
D. Bilan et perspectives pour l'optimisation des protocoles .....	260
E. Conclusion.....	263
F. Références .....	264



## **A. INTRODUCTION**

Dans le chapitre V, nous avons pu établir que le signal radio-induit est en fait un signal complexe avec de nombreuses composantes, certaines composantes n'apparaissant qu'à de très hauts niveaux de dose (RIS1, RIS3 et RIS4). De plus, la plupart des espèces donnant lieu à une signature RPE sont instables à température ambiante et leur cinétique de réaction est également dépendante de l'humidité. Au début du travail de thèse, l'utilisation du RIS2 pour l'estimation des doses avait été envisagée. Mais, du fait de son instabilité à température ambiante, une estimation des doses n'était finalement plus envisagée que dans le cas où le prélèvement des ongles interviendrait dans des délais très courts après irradiation, de l'ordre de quelques heures. Même si l'applicabilité était très limitée, un premier protocole avait néanmoins été publié (Trompier et al., 2007). La mise en évidence d'une composante stable du RIS, le RIS5, et le fait de pouvoir éliminer toutes les composantes du MIS par humidification nous a permis d'envisager de nouveaux protocoles d'estimation des doses et une application plus large tant pour le tri de population que pour les situations d'accident menant localement à des doses élevées. Comme le RIS5 ne présente pas une réponse linéaire à la dose, deux approches très différentes pour estimer les doses ont été proposées dans le chapitre V selon que les doses sont inférieures ou supérieures à une limite environ égale à 10 Gy.

Compte tenu du fait que le RIS5 présente apparemment une très bonne stabilité, le délai d'application du protocole devrait donc être uniquement limité par délai de renouvellement complet de l'ongle. Ce délai est en moyenne de l'ordre de 6 mois, mais il est fort possible qu'une irradiation à des doses relativement élevées (> 20 Gy) induisent un ralentissement du processus de pousse de l'ongle, comme nous avons pu l'observer pour les tissus osseux.

Au cours du travail de thèse, nous nous sommes attachés à développer également une méthodologie de mesure reproductible pour la RPE en bande Q. Cette technique n'est pas utilisée pour réaliser des dosages, du fait de son apparent manque de reproductibilité et de la difficulté de régler l'instrument. Cependant, elle semble particulièrement adaptée à la fois au tri de population et aux expositions localisées aux mains, du fait de sa capacité à mesurer des faibles quantités d'échantillon (2-7 mg) avec une plus grande sensibilité que la bande X. En effet, les quantités d'ongles prélevés peuvent être très faibles (ongles coupés courts, onychophagie), et il n'est pas évident qu'il soit possible de récolter les quantités d'ongle nécessaires à une analyse en bande X (>25 mg) pour la plupart des victimes supposées. De plus, la très petite quantité d'ongles nécessaire pour la RPE en bande Q peut permettre de mesurer de manière indépendante les prélèvements de chaque doigt, donnant ainsi une information sur la répartition de la dose sur les mains. Dans le cas d'irradiation localisée aux mains, de forts gradients de dose sont généralement observés avec des niveaux de dose très

## *Chapitre VI Développement des protocoles de mesure et applications*

différents d'un doigt à l'autre. L'information sur la distribution de dose est précieuse pour les équipes médicales en charge de définir et de mettre en œuvre la stratégie thérapeutique. Par exemple, dans le cas de la thérapie cellulaire par injection, cela permet de répartir au mieux les doses et de traiter avant l'apparition de lésions si l'information dosimétrique est disponible au plus tôt. La RPE en bande Q semble être une technique de choix pour peu que l'on puisse rendre les mesures reproductibles. Pour les deux protocoles envisagés, l'utilisation de la bande Q, en plus de la bande X, a été systématiquement envisagée.

Dans la première partie de ce chapitre, nous détaillerons, autant que possible à ce stade, les deux protocoles envisagés. Dans la deuxième partie seront présentées les premières applications réalisées avec des ongles provenant de victimes d'irradiation. Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre, plusieurs possibilités pour améliorer la sensibilité de la technique RPE, ou pour s'affranchir du « BG » seront discutées comme perspectives de poursuite de ces travaux.

Par souci de clarté dans la présentation des protocoles, les deux protocoles sont décrits en suivant les mêmes étapes (collection, préparation, mesure et estimation des doses). Ces étapes restent valables quelque soit la technique de mesure utilisée (Bande Q et/ou X).

## **B. ELABORATION DES NOUVEAUX PROTOCOLES**

### ***B.1 Principe général basé sur le RIS5***

Les deux protocoles reposent sur la mesure du RIS5 et l'évolution de son intensité avec la dose, mais avec des approches très différentes quant à l'exploitation des données.

#### **B.1.1 Protocole n°1**

Ce protocole est basé sur l'analyse de l'amplitude du RIS5 par les méthodes classiques utilisées en dosimétrie. A partir d'une relation signal-dose, l'amplitude du RIS5 est convertie en dose. La relation signal-dose peut être déterminée soit par la méthode des ajouts dosés appliquée à l'échantillon considéré, soit à partir d'une courbe d'étalonnage préétablie, construite avec d'autres échantillons. L'utilisation de courbes d'étalonnage est conditionnée par la variabilité du comportement des ongles en fonction de la dose et également de l'amplitude du « BG » (chapitre V). Les critères de choix d'une méthode reposent d'une part sur les incertitudes estimées sur la dose reçue et d'autre part sur les délais d'expertise requis. La méthode des ajouts dosés, si elle permet de s'affranchir de la variabilité inter-échantillon de la sensibilité à la dose, implique des délais plus importants pour donner une estimation de la dose reçue. Plusieurs irradiations successives sont généralement nécessaires pour construire une courbe d'ajouts dosés. Dans le cas des ongles, compte-tenu du temps de préparation après chaque irradiation de l'ordre de 12 heures, cela signifie au maximum deux points de mesure par jour. Les courbes d'étalonnage permettent de rendre un résultat dans des délais beaucoup plus courts si celles-ci sont préétablies. L'inconvénient de cette méthode est d'augmenter les

incertitudes sur la dose estimée, en y incluant une composante liée à la variabilité de la sensibilité à la dose entre différents donneurs.

### **B.1.2 Protocole n°2**

Ce protocole a été développé pour la mesure des doses supérieures à 10 Gy. Au-delà de 10 Gy, comme l'augmentation du signal par unité de dose est faible, notamment pour des valeurs proches de la dose de saturation et que la relation dose-signal n'est pas linéaire, il est hasardeux de vouloir estimer une dose dans cette gamme à partir d'une courbe d'étalonnage ou d'ajout dosées sur la base des méthodes de régression habituellement utilisées. Les incertitudes sur les doses ainsi estimées sont très élevées. Nous avons donc proposé d'estimer les doses reçues à partir de la saturation du signal. La dose de saturation est définie comme la dose au-delà de laquelle l'amplitude du RIS5 diminue. Cette dose de saturation présente une variabilité faible lorsque les ongles proviennent d'un même donneur, et la variabilité entre différents donneurs reste compatible avec les incertitudes des mesures habituellement données en dosimétrie d'accident. Cette méthode peut être envisagée avec des incertitudes raisonnables pour des doses supérieures à 10-15 Gy. La limite de dose supérieure du domaine d'applicabilité est conditionnée par la valeur de la dose de saturation.

### **B.2 Prélèvement des échantillons**

Compte-tenu des résultats obtenus sur la nature du « BG », il n'y a pas de précautions particulières à prendre pour le prélèvement. En effet, nous avons montré que le « BG » est bien un signal intrinsèque, et que son intensité n'est pas lié à la quantité de stress mécanique. En l'absence de cette information, nous avons commencé à développer des stratégies pour limiter l'influence du stress mécanique, comme par exemple l'humidification des ongles avant prélèvement. Au final, les ongles peuvent être simplement prélevés à l'aide de pinces ou de coupe-ongles, sans qu'un prétraitement des ongles soit nécessaire.

### **B.3 Stockage et transport des échantillons**

Comme il s'agit de travailler sur la composante stable du signal, il n'est pas nécessaire de stocker l'échantillon à basse température. Les échantillons peuvent être stockés et transportés à atmosphère ambiante.

### **B.4 Préparation des échantillons**

Avant mesure, les échantillons sont ré-humidifiés pour s'assurer que toutes les composantes instables (MIS et RIS) sont bien éliminées. Plus l'échantillon est déshydraté et plus la durée de bain devra être importante. Pour des ongles fraîchement prélevés, une durée de bain de l'ordre de 10 minutes est suffisante. Pour des ongles complètement déshydratés, il conviendra d'augmenter la durée des bains à 20 minutes. De même s'il s'agit d'analyser des ongles provenant des orteils, ces derniers étant plus épais, il est également recommandé d'augmenter

les temps de traitement. L'échantillon est ensuite séché pendant 12 heures dans un dessiccateur sous vide pour permettre une mesure optimale, notamment en bande Q, car la présence d'humidité à cette fréquence nuit à la qualité de la mesure.

Dans la pratique actuelle, les échantillons ne subissent aucune coupe additionnelle et sont mesurés tels que prélevés, ceci principalement pour faciliter la manipulation des échantillons. Dans ces conditions, nous avons mis en évidence des effets de l'orientation des échantillons dans le champ magnétique sur l'amplitude du signal mesuré que ce soit en bande X ou en bande Q. Ces effets semblent amplifiés en bande Q.

En contrôlant l'orientation de la surface de l'ongle dans le champ magnétique, il est a priori possible d'améliorer la reproductibilité des mesures. En bande X, avec cette précaution et en normalisant les intensités mesurées par la masse de chaque échantillon pour peu que celles-ci ne soit pas trop différentes, il semble possible d'établir des courbes d'étalonnage universelles. En revanche, en bande Q, cette précaution n'est pas suffisante. Pour un même échantillon, si la forme de l'échantillon n'est pas modifiée, il est certes possible d'établir une courbe de réponse en fonction de la dose, mais qui ne sera pas valable pour un autre échantillon. De petites variations de masse ou de géométrie d'un échantillon à l'autre induisent des différences importantes sur l'amplitude mesurée qu'il semble a priori difficile de corriger. Pour limiter ces effets en bande Q, il peut être envisagé de broyer les échantillons en fragments de petite taille ou en poudre. Cette approche n'a été envisagée qu'à partir du moment où nous avons prouvé que le stress mécanique n'avait d'influence ni sur l'amplitude du « BG », ni sur la réponse en dose du RIS5. Dans le cadre du travail de thèse, nous n'avons pas pu réaliser tout ce travail d'optimisation de la préparation des échantillons pour mettre en œuvre une approche à base de courbes d'étalonnage pour la bande Q et donc envisager une possible application pour le tri de population. Il conviendra donc de réaliser ce travail d'optimisation pour établir l'utilité de la RPE bande Q pour les applications de tri de population.

### ***B.5 Choix de la technique de mesure (Bande X ou Q)***

Cette partie vise à donner des recommandations pratiques concernant l'emploi des différentes techniques de mesure RPE disponibles (Bande X ou Q). Il faut souligner que seule la bande X fait l'objet, à ce jour, d'applications en dosimétrie RPE. En dehors des applications de dosimétrie, c'est également la RPE bande X qui est la technique la plus couramment utilisée. Ceci a pour conséquence que, s'il est nécessaire d'envisager la mise en place de réseaux de mesures pour être à même de traiter des grandes quantités d'échantillons, il faudra valider les protocoles en bande X, même si la bande Q présente a priori de plus grands avantages. En effet, en cas d'accidents à grande échelle, il est parfaitement envisageable d'utiliser l'instrumentation RPE en bande X disponible sur le territoire national ou celle disponible dans

les réseaux européens (Eurados<sup>1</sup>) ou internationaux (REMPAN<sup>2</sup>) pour multiplier les capacités de mesure.

Pour obtenir un rapport signal sur bruit correct en bande X avec des temps de mesure compatibles avec l'application de tri de population ( $t < 15$  min), il est nécessaire de mesurer des échantillons dont la masse est au minimum de l'ordre de 25 mg, du moins pour les plus faibles doses ( $< 10$  Gy), ce qui implique de mesurer ensemble les prélèvements réalisés sur tous les doigts d'une main (un prélèvement d'ongle pèse de 2 à 8 mg).

L'un des premiers critères qui conditionnent le choix de la technique de mesure est la quantité de matière récoltée. Si les quantités sont faibles, il conviendra de privilégier la mesure en bande Q. Cette fréquence offre également la possibilité de mesurer de manière séparée les biopsies de chaque doigt.

A ce jour, d'après les données dont nous disposons (Reyes et al., 2009), il semble possible d'utiliser le protocole n°1 en bande X. Pour la bande Q, il est encore nécessaire d'optimiser un certain nombre de paramètres afin d'établir une courbe universelle et de définir une valeur moyenne de l'amplitude du « BG ». Cependant, nous avons pu récemment établir cette méthodologie pour l'email dentaire (chapitre V) et l'appliquer lors des deux derniers cas d'accident radiologiques dans lesquels l'IRSN a été impliqué (Accident de Bulgarie en juin 2011 et du Pérou en février 2012). Il semble donc tout à fait envisageable à court terme de mettre en place le protocole n°1 pour le tri de population aussi bien en bande Q qu'en bande X. Le protocole n°2 a déjà été utilisé avec la bande Q lors des accidents de Tunisie (2008 ; étude conduite postérieurement à l'expertise initiale en début 2011), du Gabon (décembre 2010 ; étude conduite postérieurement à l'expertise initiale en début 2011) et du Pérou (février 2012). Il peut être appliqué de manière indifférenciée en bande X ou en bande Q.

### **B.6 Protocoles de mesure des ongles irradiés**

#### **B.6.1 Positionnement de l'échantillon**

En bande X, nous avons mis en évidence une forte dépendance entre l'intensité du signal du « BG » et l'orientation de l'ongle dans le champ magnétique sur (chapitre IV). Le signal est nettement plus intense lorsque la surface de l'ongle est orientée perpendiculairement au champ magnétique.

Comme l'amplitude mesurée est toujours comparée à une autre amplitude mesurée sur un autre échantillon ou sur le même mais à des moments différents, il est important d'estimer l'erreur qui peut être induite lors du repositionnement de l'échantillon dans la cavité. Ainsi, les doses sont généralement estimées sur une amplitude moyenne évaluée à partir d'une série

---

<sup>1</sup> European Radiation Dosimetry Group

<sup>2</sup> Radiation Emergency Medical Preparedness and Assistance Network

## *Chapitre VI Développement des protocoles de mesure et applications*

de mesure. Entre chaque mesure, l'échantillon est repositionné dans la cavité, ceci pour prendre en compte la variabilité liée au positionnement et estimer l'incertitude associée.

Deux méthodes différentes peuvent être envisagées pour le positionnement de l'échantillon. La première est la méthode habituellement utilisée en dosimétrie, lorsque l'échantillon est constitué de fragments. Elle consiste soit à mesurer l'échantillon pour plusieurs orientations fixées (utilisation du goniomètre), soit à mélanger les fragments entre deux mesures et moyenniser les amplitudes ainsi mesurées. L'estimation de la dose se fait sur la moyenne de l'intensité des signaux ainsi mesurés.

La deuxième méthode est utilisée lorsqu'un échantillon présente une géométrie bien définie et si la méthode des ajouts dosés est appliquée. Il est possible de le mesurer dans une géométrie fixée, ce qui a pour avantage de diminuer les incertitudes liés au positionnement ou de diminuer le nombre de mesure nécessaire pour atteindre un écart-type jugé satisfaisant et donc le délai d'expertise. Dans ces conditions, le terme lié à l'anisotropie est minimisé. Il est important de garder à l'esprit que le délai des expertises RPE doit être court lors des expertises « classiques », car les données fournies par cette technique sont de plus en plus souvent utilisées pour poser un diagnostic et décider ou confirmer la stratégie thérapeutique.

Dans toutes les applications de dosage, la reproductibilité du positionnement a toujours été considérée comme un facteur déterminant dans le dimensionnement des incertitudes. Ainsi, en routine, en plus de l'orientation de l'échantillon, la position verticale de l'échantillon dans la cavité est également ajustée avec précision. Si cette approche a fait ses preuves en bande X, elle ne permet pas en bande Q d'obtenir des résultats similaires en termes de reproductibilité.

En bande Q, nous avons développé une nouvelle approche pour le positionnement des échantillons. Celle-ci est basée sur la mesure du facteur de qualité de la cavité résonante. Le nouveau spectromètre installé à l'IRSN permet une mesure précise de ce facteur. Si en théorie, l'intensité du signal mesurée est directement liée au facteur de qualité (Equ. VI.1), le facteur de qualité n'a jamais été utilisé pour normaliser des mesures, car son évaluation n'est habituellement pas fiable.

$$I \propto \eta Q P^{1/2} \qquad \text{Équation VI.1}$$

avec I l'intensité du signal,  $\eta$  le facteur de remplissage, Q le facteur de qualité et P la puissance micro-onde.

Avec le nouveau spectromètre, il est possible, de relier le facteur de qualité à l'intensité du signal mesurée, le facteur de qualité et l'intensité du signal variant linéairement (Fig. VI.I).

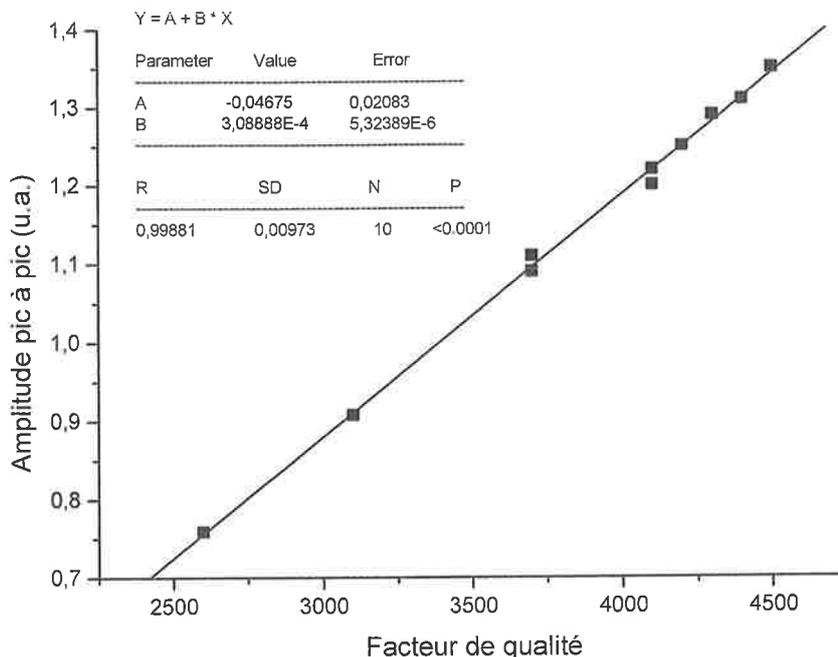


Figure VI.1 : variation de l'intensité du signal mesuré en bande Q en fonction du facteur de qualité de la cavité. Mesures réalisées sur des ongles irradiés

Pour obtenir des mesures reproductibles, il s'agit donc de positionner l'échantillon de manière à obtenir un même facteur de qualité à chaque repositionnement de l'échantillon. Avec cette approche, il n'est pas nécessaire de mesurer avec précision la position du tube dans la cavité. Lorsqu'il n'est pas possible d'ajuster précisément la position de l'échantillon dans la cavité de manière à obtenir un même facteur de qualité ou parce que cette procédure peut s'avérer trop longue, la relation de linéarité entre le facteur de qualité et l'intensité du signal rend tout à fait possible une renormalisation des mesures par le facteur de qualité.

En appliquant cette technique, il est possible de réduire de manière très significative l'écart-type sur les mesures comme le montrent les données présentées dans le Tableau VI.1, obtenues avec un mini-dosimètre alanine. Les dosimètres alanine sont utilisés en métrologie des rayonnements ionisants et les écart-types associés en bande X sont, selon les laboratoires, compris entre 0,3 et 0,8 %. Avec l'application de notre méthode, il est possible d'atteindre des dispersions des mesures en bande Q équivalente à celle obtenue en bande X dans les laboratoires de métrologie. Cette approche est également applicable en bande X, mais le gain est moins spectaculaire. L'une des conséquences pratiques de ces résultats est que pour obtenir un même niveau d'incertitude sur l'amplitude mesurée, un nombre moins important de mesure est requis, ce qui implique un gain de temps, bien entendu crucial dans le cas du tri de population.

Tableau VI.1 : effet de la normalisation de l'amplitude pic à pic du signal ( $A_{pp}$ ) par le facteur de qualité, mesuré sur l'écart-type d'une série de mesures. Mesures réalisées en bande Q sur un mini dosimètre d'alanine irradié à 100 Gy

$A_{pp}$ avec la position de l'échantillon ajustée par mesure de distance	$A_{pp}$ avec la position de l'échantillon ajustée par le facteur de qualité
1,22	1,19
1,25	1,19
1,2	1,17
1,11	1,21
0,98	1,19
0,76	1,20
1,29	1,20
1,31	1,19
1,09	1,19
<b>Moyenne : 1,15</b>	<b>Moyenne : 1,19</b>
<b>Ecart-type : 16,4 %</b>	<b>Ecart-type : 0,8 %</b>

### B.6.2 Optimisation des paramètres de mesure

Les principaux paramètres de mesure à optimiser sont la puissance micro-onde et la modulation d'amplitude. Pour un échantillon donné, les paramètres optimaux sont dépendants du type de cavité. Pour chaque type de cavité, il est habituellement recherché le meilleur rapport signal sur bruit en optimisant la puissance micro-onde et la modulation d'amplitude. Le fait de pouvoir minimiser l'amplitude d'une composante parasite par rapport au signal d'intérêt peut conduire à choisir des paramètres différents de ceux optimisés sur la base du rapport signal sur bruit. Par exemple, une puissance de l'ordre de 10 mW en bande X permet de minimiser l'amplitude du « BG » par rapport à celle du RIS5 (chapitre V, fig. V.16). Cependant, il faut prendre en compte également les limitations des spectromètres. Avec le matériel actuel, il n'est pas possible d'envisager des mesures sur de longues périodes (> à quelques dizaines d'heures) à relativement fortes puissances ou avec des modulations importantes (> 0,5 mT). L'utilisation de ce type de paramétrage sur de longues durées peut endommager l'instrumentation et induire des dérives au niveau de la sensibilité. De ce fait, les mesures réalisées pour le tri de population ne pourront être par exemple à des puissances supérieures à 2 mW en bande X. De plus, en bande Q, il est difficile d'accorder la cavité et le pont hyperfréquence au-delà d'une puissance micro-onde de 2 mW. Le Tableau VI.2 résume les principaux paramètres utilisés actuellement pour la mesure des ongles, qui semblent les mieux adaptés avec les considérations évoquées ci-dessus.

*Tableau VI.2 : principaux paramètres utilisés pour mesurer les différentes composantes du signal selon le protocole utilisé pour une mesure en bande X avec la cavité SHQ*

<i>Cavité</i>	<i>Puissance micro-onde (mW)</i>	<i>Modulation d'amplitude (mT)</i>
<i>bande Q</i>	<i>1</i>	<i>0,3</i>
<i>SHQ (bande X)</i>	<i>2</i>	<i>0,3</i>

## **B.7 Méthodes d'estimation des doses**

### **B.7.1 Méthode d'estimation des doses avec le protocole 1**

Ce protocole est basé sur l'utilisation du RIS5 comme indicateur de l'exposition. L'estimation de la dose est réalisée par les méthodes classiques, à savoir que l'intensité du signal radio-induit est convertie en dose par la détermination d'un coefficient de sensibilité à la dose,  $k$  (unité d'intensité signal/Gy), qui peut être soit déterminé à l'aide d'une courbe d'étalonnage préétablie soit par la méthode des ajouts dosés. Pour les doses inférieures à 10 Gy, cette méthode est bien adaptée, notamment parce que dans cette gamme de dose le RIS5 présente un comportement quasi linéaire avec la dose (chapitre V).

En bande X comme en bande Q, les composantes du RIS5 et du «BG » se superposent, il est donc nécessaire de déterminer préalablement la valeur du « BG », c'est-à-dire l'intensité du signal avant irradiation. Si cette composante n'est pas prise en compte, on introduit une erreur systématique dans l'estimation de la dose. La dose est estimée selon la formule donnée dans l'Equation VI.2.

$$D_{\text{accident}} = (A_{\text{total}}^{\text{mesuré}} - A_{\text{BG}}^{\text{moyen}}) \times k \quad \text{Équation VI.2}$$

Pour la détermination de la valeur de l'amplitude du « BG », comme nous n'avons pas encore valider de méthode permettant la mesure sélective de l'une ou l'autre de ces deux composantes, il est nécessaire d'utiliser une valeur moyenne du « BG » qui aura été estimée sur un échantillonnage d'ongles. Il pourrait être pertinent lors de la détermination de la valeur moyenne du « BG » de tenter de mettre en évidence des corrélations entre l'amplitude du « BG » et des paramètres caractérisant le donneur, tels que l'âge, le sexe, l'origine ethnique, etc. Dans le cas d'une irradiation hétérogène ou localisée, l'amplitude du « BG » peut être estimée à partir de la mesure d'ongles considérés comme non exposés. Par exemple, pour une exposition localisée à une main, les ongles prélevés sur l'autre main non exposée peuvent servir à estimer la valeur du « BG » pour la victime. On peut également envisager d'utiliser les ongles des orteils. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour s'assurer qu'ils ne présentent pas des valeurs de « BG » trop différentes de celles des mains.

## *Chapitre VI Développement des protocoles de mesure et applications*

La limite de détection associée à la dosimétrie sur les ongles pour le tri de population est en grande partie liée aux incertitudes estimées d'une part sur la valeur moyenne de l'amplitude du « BG » et d'autre part sur la sensibilité moyenne à la dose. Nous avons montré dans le chapitre V, qu'en bande X, sur la base des données acquises, la limite de détection pouvait être estimée à 2,1 Gy. Cette valeur correspond à l'objectif de limite de dose fixés (2 Gy) dans le contrat européen Multibiodose, dans lequel l'IRSN est fortement impliqué, pour les techniques de tri de population basées sur des méthodes de dosimétrie physique (RPE et OSL). En améliorant la reproductibilité des traitements des échantillons et en limitant les effets d'anisotropie et de géométrie, nous devrions pouvoir réduire de manière significative cette limite.

### **B.7.2 Méthode d'estimation des doses avec le protocole 2**

Pour les doses plus élevées, compte tenu des effets de saturation et du comportement non linéaire de la réponse en dose, les performances des méthodes classiques d'évaluation de la dose sont dégradées et les incertitudes associées ne sont plus compatibles avec les exigences en dosimétrie d'accident. Une nouvelle méthode d'estimation des doses a donc été proposée (chapitre V), basée sur le phénomène de saturation du signal RIS5. Comme la saturation intervient à la même dose pour les ongles d'un même individu et que cette valeur de saturation en dose ( $D_{sat}$ ) varie relativement peu d'un individu à l'autre, il est possible d'utiliser ce phénomène de saturation pour estimer une dose reçue. Ce protocole est bien adapté aux situations d'accidents habituellement rencontrées. En effet, au cours de ces dernières années, pour la plupart des accidents connus il s'agissait d'irradiations hétérogènes le plus souvent localisées aux mains suite à la manipulation de sources. Il est très difficile d'estimer les doses au niveau des mains et généralement une très grande hétérogénéité est observée. Ni la dosimétrie biologique ni les techniques de reconstitution d'accident ne permettent d'estimer la distribution de dose au niveau des mains, or ces doses peuvent s'avérer très élevées, de l'ordre de quelques dizaines de Gy voire bien davantage (Fig. VI.2).



*Figure VI.2 : effets au niveau des mains d'irradiations localisées avec des fortes doses*

Jusqu'à présent ces doses pouvaient être estimées par l'analyse de biopsies de tissus osseux par spectroscopie RPE. Les biopsies de tissus osseux sont généralement des déchets opératoires et l'obtention de tels échantillons n'est pas donc systématique. L'estimation des doses est ainsi réalisée tardivement par rapport à l'évolution des lésions ou à la mise en place des traitements. On comprend alors tout l'intérêt de la dosimétrie RPE sur les ongles et notamment de ce protocole adapté aux fortes doses. Les mesures sur les ongles, parce que ceux-ci sont facilement prélevés, peuvent être réalisées sans délai et donc fournir une information pertinente dans la phase de diagnostic et de mise en place de la stratégie thérapeutique. De plus, l'utilisation de la RPE en bande Q permet de réaliser des évaluations de dose au niveau de chaque doigt, donnant ainsi des indications quant à l'hétérogénéité de la distribution de la dose. Ces informations sont précieuses pour les équipes médicales parce qu'elles permettent de déterminer aux mieux et au plus tôt les stratégies thérapeutiques.

Ce protocole est donc tout à fait pertinent pour les situations d'accident dans lesquelles l'IRSN a été impliqué à ce jour (Gabon (2010), Venezuela (2010), Rades (2008), Dakar (2006), Chili (2005), Pérou (2012)). Certes, ce protocole ne répond pas aux exigences d'un tri de population de premier niveau, cependant il pourra être utilisé en complément du protocole n°1 lorsque les doses reçues au niveau des ongles sont supérieures à environ 10 Gy. Dans les scénarios de malveillance, il est envisageable que certains de ces scénarios puissent mener à des expositions importantes au niveau des mains, a priori pour un nombre tout de même limité de personnes. D'une manière pratique, il s'agit de réaliser des ajouts de dose sur l'échantillon jusqu'à atteindre la saturation. Après chaque ajout de dose, l'échantillon est humidifié pour éliminer toutes les composantes instables, puis séché avant mesure. L'opération est répétée jusqu'à atteindre la saturation du RIS5. La valeur de saturation est a priori indépendante de l'intensité du MIS, du nombre d'ajouts dosés ou d'humidifications ainsi que du délai entre l'accident et le prélèvement ou la mesure. Soit  $D_{sat1}$ , la valeur de saturation du RIS5 sans exposition préalable et  $D_{sat2}$  la valeur de saturation du RIS5 d'un ongle exposé accidentellement. La dose liée à la surexposition est alors donnée par l'Equation VI.3.

$$D_{accident} = D_{sat1} - D_{sat2} \quad \text{Équation VI.3}$$

La valeur de  $D_{sat1}$  peut être estimée soit sur un ongle de la victime non irradié ou très faiblement exposé (pied lorsque l'irradiation est localisée à la main par exemple), soit sur la base d'une étude du « BG » sur un échantillonnage d'ongle provenant de plusieurs donneurs, ce qui implique une estimation moins précise de la dose. Cette méthode originale permet de s'affranchir des problèmes inhérents aux méthodes classiques d'étalonnage (normalisation par la masse par exemple, signaux parasites induisant un offset ou une erreur systématique). De plus, cette méthode peut s'appliquer à n'importe quel matériau et/ou technique de mesure pour peu que le signal radio-induit présente une saturation franche du signal proche de la gamme de dose investiguée.

## C. APPLICATION A DES CAS REELS D'ACCIDENTS

### C.1 Accident de gammagraphie survenu à Radés (Tunisie, 2008)

Les systèmes de gammagraphie utilisés dans l'industrie pour le contrôle des sources sont équipés de sources radioactives (typiquement de  $^{192}\text{Ir}$  ou du  $^{60}\text{Co}$ ). Ces systèmes sont à l'origine de nombreux accidents de part le monde. Dans ce cas précis, la source d'iridium est restée bloquée dans sa gaine d'éjection. Suite au démontage et nettoyage de cette gaine, un des opérateurs a été amené à manipuler la source pendant plusieurs minutes avant de réaliser son erreur (Trompier & Bassinet, 2009).

La victime présentait des brûlures radiologiques au niveau des deux mains. Au cours de son hospitalisation, des biopsies osseuses ont été réalisées sur la dernière phalange de deux doigts de la main gauche. Les ongles de ces deux doigts sont tombés et ont également été récupérés. L'analyse par RPE des tissus osseux prélevés a été réalisée en 2009 et a permis d'estimer les doses reçues au niveau de l'extrémité de ces deux doigts avec le protocole n°2. Ces doses exprimées en termes de kerma dans l'air sont données dans le Tableau VI.3.

Tableau VI.3 : résultats des estimations de dose réalisées par RPE sur les biopsies osseuses et les ongles

	Doigt n°1	Doigt n°2
Biopsies osseuses	$38,1 \pm 1,7 \text{ Gy}^{(*)}$	$36,1 \pm 1,5 \text{ Gy}^{(*)}$
Ongles	$37 \pm 9 \text{ Gy}$	$[37 - ] \text{ Gy}^{(**)}$

(\*) (Trompier & Bassinet, 2009)

(\*\*) la valeur maximale de cet intervalle ne peut être estimée, la dose reçue étant supérieure à la dose de saturation du signal.

Les ongles n'ont pas été analysés en même temps que les prélèvements osseux, car aucun protocole n'était alors disponible pour l'estimation des doses sur des ongles. Les prélèvements ont été conservés au congélateur ( $-32^{\circ}\text{C}$ ) et n'ont été analysés qu'au cours de l'année 2011 selon le protocole n°2 proposé dans cette thèse. Dans le Tableau VI.3, les doses estimées sur les ongles sont comparées avec celles estimées sur les biopsies osseuses. Les courbes de saturation en dose des deux échantillons sont données sur la Figure VI.3.

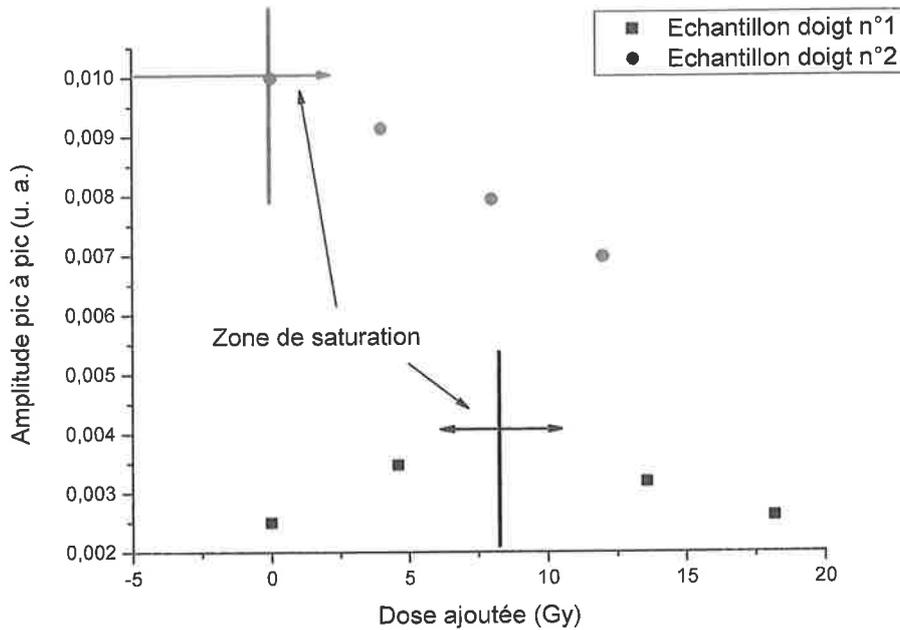


Figure VI.3 : courbes de saturation en dose obtenues sur les deux échantillons d'ongle

On peut noter que pour l'échantillon provenant du doigt n°2, la saturation en dose semble avoir été atteinte avant le premier rajout de dose, ce qui signifie que le dose reçue par cet échantillon est en première approximation supérieure ou égale à  $D_{sat1}$  la dose de saturation propre à ces échantillons. Comme celle-ci ne peut être strictement déterminée, car nous ne disposons pas de prélèvement d'ongle peu ou pas exposé provenant de cette victime, c'est la valeur moyenne estimée sur un échantillonnage d'ongles provenant de plusieurs donneurs ( $n=10$ ) qui est utilisée ( $45 \pm 8$  Gy).

Les points de mesure réalisés ne sont pas assez rapprochés pour estimer avec plus de précision les doses de saturation, notamment pour le doigt n°1. Il sera nécessaire de répéter cette expérience sur les parties des ongles qui n'ont pas été post-irradiées. Mais l'incertitude sur les résultats est principalement due à l'usage d'une valeur moyenne pour  $D_{sat1}$ . Le développement d'une approche mathématique pour estimer la valeur de saturation pourrait également permettre de réduire les incertitudes.

Ces courbes peuvent être analysées comme la résultante de phénomènes de production et de disparition des différents radicaux composant le RIS5. A ce stade, nous ne sommes pas encore en mesure de donner une description complète du RIS5 et n'avons pas identifié les espèces radicalaires responsables de ces composantes, il est donc difficile de proposer un modèle physico-chimique.

Bien que l'incertitude sur cette estimation des doses soit relativement élevée, les valeurs sont du même ordre de grandeur que celles estimées à partir des biopsies osseuses. Si nous avions eu à disposition des ongles peu ou pas exposés provenant de la même victime (ongles de pied), il aurait été possible d'estimer de manière plus précise les doses, en déterminant la valeur de saturation propre aux ongles de la victime. Cette application montre cependant qu'il

est possible d'estimer des doses au niveau des doigts, avec des résultats cohérents avec les résultats obtenus par ailleurs avec des méthodes validées. Ces résultats constituent une première étape dans la validation du protocole proposé en montrant que l'approche développée permet a priori d'estimer des doses réalistes pour une irradiation *in vivo* et dans des conditions réelles d'application.

## C.2 Accident de gammagraphie survenu au Gabon (2010)

Cet accident est survenu dans des circonstances très similaires à celle de l'accident de Radès. Pour le patient le plus exposé, nous avons pu collecter des prélèvements sur l'ensemble des doigts (mains et pieds). Dans ce cas, les deux mains ont été exposées, ainsi que les pieds. Aucun autre type de prélèvements, des tissus osseux par exemple, n'a pu être analysé et la connaissance très imprécise du scénario de préhension des sources ne permet pas non plus d'estimer les doses reçues à l'aide de simulations numériques. Pour certains doigts, jusqu'à trois prélèvements espacés de plusieurs semaines ont pu être réalisés. Des prélèvements de l'ensemble des doigts des mains ont été analysés selon le protocole n°2. La Figure VI.4 présente deux exemples de courbes de saturation en fonction de la dose obtenus sur ces prélèvements.

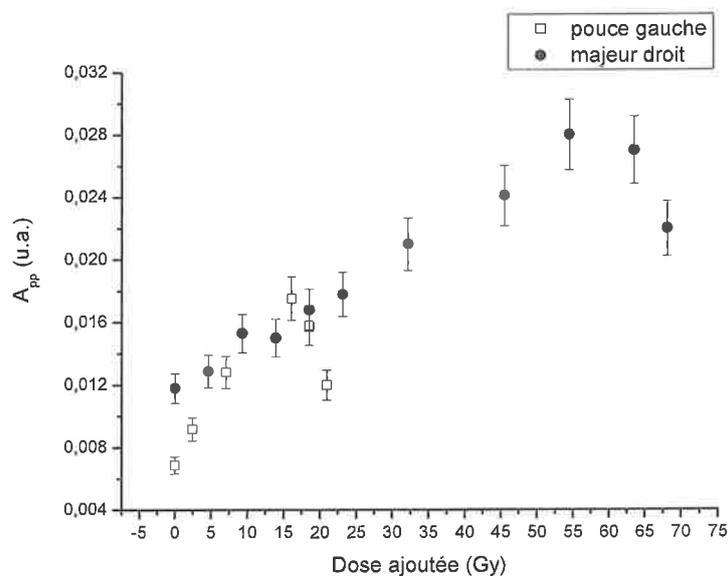


Figure VI.4 : exemples de courbe de saturation de dose obtenue sur deux prélèvements d'ongle de l'accident survenu au Gabon en 2010

Sur le majeur droit, doigt a priori faiblement exposé, la dose de saturation a été évaluée à 54 Gy (Fig. VI.4). Cette valeur est élevée par rapport à la valeur moyenne de  $D_{\text{sat1}}$  évaluée sur un échantillonnage d'ongles de plusieurs donneurs ( $45 \pm 8 \text{ Gy}$ ), mais reste néanmoins compatible avec la distribution de ces valeurs, si l'on considère que cet ongle n'a pas reçu de dose ou à des niveaux très faibles. Aucun signe clinique n'est par ailleurs apparu sur ce doigt.

## Chapitre VI Développement des protocoles de mesure et applications

La courbe de saturation en dose du majeur droit est comparée sur la Figure VI.4 avec celle du pouce gauche qui était l'un des doigts les plus exposés selon les signes cliniques. Sur le pouce gauche, la saturation en dose est observée à environ 16 Gy. La dose de surexposition calculée à partir de l'Equation VI.2, est respectivement de 38 Gy si l'on considère la valeur obtenue sur le majeur droit comme valeur de saturation pour des ongles non exposés et de 29 Gy sur la base de la valeur moyenne de 45 Gy. Pour le pouce gauche, trois prélèvements ont été réalisés à plusieurs semaines d'intervalles. Les trois prélèvements ont été analysés et ont donné des valeurs similaires de dose.

En première approximation, nous avons donc interprété la dose de saturation obtenue sur le majeur droit comme la dose de saturation  $D_{sat1}$  que l'on aurait obtenu sans irradiation préalable. Les doses sur les autres doigts ont été calculées à partir de cette valeur. Dans ce cas précis, si nous utilisons la valeur moyenne (45 Gy), toutes les doses estimées sont diminuées de 9 Gy, différence entre la valeur moyenne et la valeur de  $D_{sat1}$  estimée pour ce patient. Nous avons pu ainsi reconstituer un début de cartographie de la dose reçue sur la base des doses estimées sur les prélèvements analysés (Fig. VI.5). On peut noter que pour au moins deux doigts, les doses sont inférieures à 10 Gy. Il serait intéressant d'analyser des ongles de ces doigts selon le protocole n°1, une fois celui-ci optimisé.

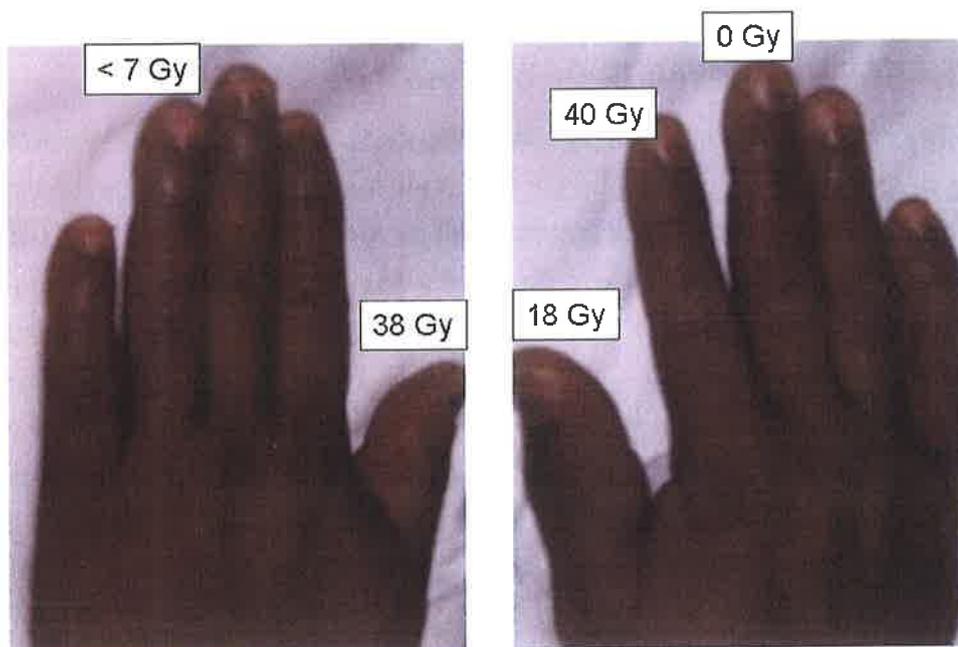


Figure VI.5 : cartographie des doses estimées par RPE sur les ongles avec le protocole n°2

Le niveau de dose estimé semble être légèrement plus élevé que ce que laisse à penser l'évolution des signes cliniques au niveau de la peau des mains. Les signes cliniques indiquent des doses au maximum égales à 30 Gy. Cependant, il faut rappeler que l'apparition et l'évolution des signes cliniques ne sont pas uniquement conditionnées par la dose, mais également par la surface exposée. Si les gradients de dose sont importants et les doses les plus

élevées limitées à de petites surfaces, il n'est pas impossible d'avoir très localement des doses supérieures à 30 Gy avec des signes cliniques similaires. Il existe par ailleurs des différences de sensibilité entre les individus. Il est donc difficile d'estimer la validité des résultats obtenus sur la seule base des signes cliniques. Seule, une mesure de la dose sur un échantillon de tissus osseux (cf. accident de Radès), pourrait permettre de confirmer la pertinence des doses estimées sur les ongles. Cependant, il faut souligner que la distribution des doses est apparemment cohérente avec la distribution des effets cliniques observés sur la peau. Les doses les plus importantes ont été reportées sur les doigts a priori les plus exposés d'après les signes cliniques, pour lesquels une dépigmentation de la peau a notamment été observée et des douleurs reportées. Ces résultats, obtenus très récemment, doivent être encore confirmés et affinés, mais ils tendent à prouver que le protocole mis en place permet d'ors et déjà d'estimer un niveau d'exposition de manière réaliste. Pour valider ce protocole, il pourra être envisagé de passer au modèle animal ou encore de réaliser des études sur des patients traités par radiothérapie par exemple.

## **D. BILAN ET PERSPECTIVES POUR L'OPTIMISATION DES PROTOCOLES**

### ***D.1 Les protocoles développés au cours de ce travail***

Sur la base des résultats obtenus au cours de cette thèse, deux protocoles d'estimation des doses sur les ongles ont été proposés. Le premier protocole répond a priori aux besoins du tri de population, qui est conditionné par une capacité de mesure importante et la possibilité de détecter des doses à partir de 2 Gy. Ce protocole n'a pas encore été optimisé et n'a donc pas encore fait l'objet de validation. Le deuxième protocole, basé sur la saturation en dose, est adapté aux situations d'accident fréquemment rencontrées. Même s'il n'a pas été complètement optimisé, ce deuxième protocole a néanmoins été appliqué à deux cas d'accidents. Les résultats dans un cas sont cohérents avec ceux obtenus sur des biopsies osseuses et dans le deuxième cas si les doses semblent légèrement plus élevées que celles attendues sur la base des signes cliniques, la distribution de dose est par contre cohérente avec ces mêmes effets.

### ***D.2 Perspectives en matière d'optimisation des protocoles***

#### **D.2.1 Paramètres à considérer**

Ces deux approches s'avèrent prometteuses, complémentaires et devraient répondre aux besoins en matière de tri de population et de dosimétrie d'accident.

Dans le cas de situation d'accident radiologique classique, lorsque le protocole n°1 sera mis en place, une première évaluation de la dose pourra être systématiquement réalisée sur

l'ensemble des échantillons. Selon la valeur de dose déterminée, l'application du protocole n°2 pourra être alors décidée. Actuellement, l'ensemble des échantillons est analysé selon le protocole n°2. L'utilisation du protocole n°1 permettra de limiter le nombre d'échantillons à analyser selon le protocole n°2 et ainsi de diminuer les délais des expertises. Des optimisations concernant la préparation des échantillons, les conditions de mesure et l'analyse de données peuvent cependant être encore réalisées. Une fois ces protocoles de mesures optimisés, il conviendra alors d'étudier sur un échantillonnage important :

- pour le protocole 1, la variabilité de la sensibilité en fonction de la dose et la variabilité de l'amplitude du « BG »,
- pour le protocole 2, la variabilité de la dose de saturation.

Les meilleures estimations des valeurs moyennes de ces trois paramètres ainsi que leurs éventuelles corrélations avec des caractéristiques propres à l'ongle ou au donneur devraient permettre d'améliorer les incertitudes sur la dose estimée ainsi que les limites de détection associées. A ce jour, la limite de détection pour le protocole n°1 est de l'ordre de 2,1 Gy, ce qui est compatible avec l'objectif de 2 Gy initialement fixé. Il conviendra également de déterminer plus précisément la valeur de dose à partir de laquelle il est nécessaire d'appliquer le protocole n°2. Cette valeur est estimée à 10 Gy, mais elle dépend de la méthode utilisée pour déterminer la valeur du « BG » et de la saturation en dose.

La réduction de la variabilité sur ces paramètres n'est pas le seul moyen d'améliorer la limite de détection. Deux axes sont encore envisageables, d'une part l'amélioration de la sensibilité de la mesure et d'autre part le développement permettant de mesurer de manière sélective soit le « BG », soit le RIS5.

### **D.2.2 Amélioration de la sensibilité**

Si l'augmentation de la sensibilité de la mesure vise principalement la diminution des limites de détection, cela permettra également de réduire les temps de mesure, facteur extrêmement important pour les applications de tri, puisque cela conditionne directement le nombre d'échantillons qu'il est possible de mesurer dans un temps donné.

Le gain de sensibilité sur un spectromètre RPE en onde continue peut être recherché dans plusieurs composants du spectromètre, principalement au niveau de la source micro-onde, de la diode détectrice, du préamplificateur micro-onde et du résonateur. L'utilisation d'une source micro-onde dotée de préamplificateur bas bruit est une voie possible d'amélioration, mais qui nécessite une intervention délicate sur le pont hyperfréquence. L'un des éléments facilement interchangeables pour lequel le gain en sensibilité est parmi les plus importants reste le résonateur. Un même spectromètre peut accueillir des types variés de résonateur sans nécessiter de modification du spectromètre.

Que ce soit en bande X ou en bande Q, les cavités utilisées en routine, ne sont pas les plus adaptées pour les applications de dosimétrie où l'on recherche le maximum de sensibilité.

## *Chapitre VI Développement des protocoles de mesure et applications*

Pour des échantillons de masse relativement importante, les résonateurs de type « loop-gap » devraient en principe permettre un gain de sensibilité significatif (Froncisz & Hyde, 1982). Avec ce type de résonateur, le facteur de remplissage peut être de 50 à 100 fois supérieur à celui d'une cavité TE<sub>102</sub> par exemple. L'intensité du signal étant directement proportionnelle au facteur de remplissage (Eq. VI.1), il peut ainsi en résulter un gain significatif, d'autant plus qu'il est également possible de mesurer avec ces résonateurs des échantillons de masse plus importante.

Néanmoins, ces résonateurs ont également des facteurs de qualité plus faibles que les cavités classiques, de plus, ils sont généralement difficiles à coupler avec le pont hyperfréquence et le spectre d'absorption peut être distordu par la présence de la composante de dispersion liée à des problèmes de phase sur le bras de référence du spectromètre. Ces dispositifs pourtant couramment utilisés pour les mesures *in vivo* sur petit animal en bande L (1,1 GHz), sont peu répandus pour la bande X et encore moins pour la bande Q (Froncisz et al., 1986). Il serait intéressant d'étudier leurs performances. Malheureusement, ils ne sont pas disponibles chez les principaux fabricants de spectromètre RPE et nécessitent un développement spécifique.

Avec les cavités utilisées, la forme et la composition des tubes de mesure peuvent également avoir une influence significative sur l'intensité du signal mesuré. Nous avons ainsi noté qu'un gain d'un facteur 2 était obtenu sur l'intensité du signal RPE mesuré en bande Q sur un ongle, entre l'utilisation d'un capillaire et d'un tube de mesure de haute précision. Il pourrait ainsi être intéressant d'étudier de manière plus détaillée ces effets afin d'optimiser les tubes de mesure (épaisseur de la paroi, composition et forme). De même, l'utilisation d'un insert permet en théorie des gains notables de sensibilité. Nesmelov et al. (2001) ont montré qu'un insert en matériau ferroélectrique positionné autour du tube de mesure permettait en bande X d'obtenir un gain d'un facteur 80 sur des échantillons aqueux avec une cavité de type TMH. Sans modifier le facteur de qualité de la cavité, ce type de dispositif permet d'augmenter le facteur de remplissage  $\eta$ , en redistribuant le champ micro-onde dans la cavité résonante. Selon l'Equation VI. 4, on peut ainsi augmenter l'intensité du signal mesuré en utilisant les cavités résonantes du laboratoire.

La réalisation de mesures RPE à basse température est une autre possibilité pour améliorer la sensibilité. Si le magnétisme du RIS5 suit la loi de Curie, il est alors possible d'envisager un gain de sensibilité en abaissant la température de mesure (intensité  $\propto 1/T$ ). Un gain théorique d'un facteur 75 peut être espéré entre une mesure effectuée à 4 K et une mesure effectuée à la température ambiante. Les systèmes de cryogénie ne sont pas utilisés en routine en dosimétrie, principalement à cause des coûts afférents à l'instrumentation nécessaire et à l'approvisionnement en hélium liquide. Les études à basse température se limitent généralement à l'étude de la structure du spectre RPE. Si l'on peut montrer qu'il est possible de réaliser des mesures reproductibles avec un gain de sensibilité significatif dans ces conditions, il peut être tout à fait envisagé d'utiliser ces équipements dans le cadre de

conditions exceptionnelles (accident, tri de population). Il faut également souligner que les améliorations qui pourraient être apportées à la mesure RPE des ongles, pourraient être utilisées pour la mesure d'autres types de matériaux considérés en dosimétrie des rayonnements ionisants.

### **D.2.3 Mesure sélective du BG et du RIS5**

Nous avons vu dans les chapitres IV et V, que le « BG » et le RIS5 présentaient des comportements différenciés vis-à-vis de la puissance micro-onde lors de la mesure et des ultrasons utilisables lors de la préparation. Il serait intéressant d'étudier la possibilité d'utiliser ces effets différenciés pour mesurer de manière sélective l'une de ces deux composantes.

Pour les ultrasons, il conviendra d'étudier l'influence de la puissance et de la fréquence des ultrasons sur ces deux signaux. Une autre approche, qui pourrait être développée, consiste à tirer parti de l'augmentation du « BG » au cours de la déshydratation, comme nous l'avons montré dans le chapitre V. Si cette augmentation est aussi peu variable d'un échantillon à l'autre que nous le supposons, cette caractéristique pourrait être exploitée. Afin de diminuer les délais liés à la déshydratation des ongles, il sera nécessaire de proposer une méthode permettant une dessiccation reproductible et complète dans les délais les plus courts possibles. De manière générale, si l'identification des radicaux associés au « BG » et au RIS5 n'est pas nécessaire en soit pour estimer des doses, elle pourrait permettre de mieux définir les traitements éventuels réalisés sur les ongles et éventuellement d'aider à en proposer de nouveaux. Les méthodes de RPE impulsives (ESEEM, HYSCORE) pourraient dans ce cas très probablement aider à leur identification.

## **E. CONCLUSION**

Suite à l'étude détaillée des signaux RPE présents dans les ongles, il a été possible d'élaborer deux protocoles de mesure. Dans ces deux protocoles, les mesures peuvent être réalisées en bande X ou en bande Q. L'utilisation de la bande Q est une approche nouvelle pour la dosimétrie par RPE et elle présente des avantages certains pour les deux principales applications envisagées, le tri de population et les irradiations localisées aux mains.

Ces deux protocoles diffèrent par l'approche méthodologique utilisée pour estimer les doses et au final par leur domaine d'application. Le protocole n°1, basé sur l'utilisation d'une courbe d'étalonnage, permet de répondre aux besoins spécifiques du tri de population. Le protocole n°2 intègre une approche nouvelle en dosimétrie qui consiste à estimer les doses à partir d'un phénomène de saturation du signal radio-induit. Ce protocole est adapté aux accidents d'irradiation avec des doses élevées aux niveaux des mains. Il sera important d'optimiser ces deux protocoles avant de procéder à des tests de validation complets, ces tests nécessitant une quantité importante de travail. De plus, de nombreuses possibilités sont envisagées pour améliorer la précision, les limites de détection, la rapidité des mesures et le délai total l'analyse. Le protocole dédié à la dosimétrie d'accident a déjà fait l'objet de trois

premières applications expérimentales à des cas réels d'accident. Les résultats obtenus ne suffisent pas à valider complètement l'approche méthodologique, ils s'avèrent néanmoins à la fois cohérents et prometteurs.

## F. RÉFÉRENCES

- Alekhin I. A., Babenko S. P., Keirim-Markus I. B., Kraiton S. N. & Kushnereva K. K. (1978) One possible way of measuring doses from accidental irradiation. *Atom. Energ.*, 44(4), 396-399.
- Alexander G. A., Swartz H. M., Amundson S. A., Blakely W. F., Buddemeier B., Gallez B., Dainiak N., Goans R. E., Hayes R. B., Lowry P. C., Noska M. A., Okunieff P., Salner A. L., Schauer D. A., Trompier F., Turteltaub K. W., Voisin P., Wiley Jr, A. L. & Wilkins R. (2007) BiodosEPR-2006 meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents. *Radiat. Meas.*, 42, 948-971.
- Froncisz W. and Hyde J.S. (1982) The loop-gap resonator: a new microwave lumped circuit ESR sample structure, *J. Magn. Reson.*, 47, 515-521.
- Froncisz W., Oles T., and Hyde J.S. (1986), Q-band loop gap resonator, *Rev. Sci. Instrum.*, 57, 1095-1099.
- Nesmelov Y.E., Surek J.T., and Thomas D.D. (2001) Enhanced EPR sensitivity from a ferroelectric cavity insert, *J. Magn. Reson.*, 153, 7-14.
- Reyes R., Romanyukha A., Olsen C., Trompier F. & Benevides L. (2009) Electron paramagnetic resonance in irradiated fingernails: Variability of dose dependence and possibilities of initial dose assessment. *Radiat. Envir. Biophys.*, 48(3), 295-310.
- Suzuki H., Tamukai K., Yoshida N., Ohya H., Kato K., Anzai K. & Swartz, H. M. (2010) Development of a compact electron spin resonance system for measuring ESR signals of irradiated fingernails. *Health Phys.*, 98(2), 318-321.
- Trompier F., Kornak L., Calas C., Romanyukha A., Leblanc B., Mitchell C. A., Swartz H. & Clairand I. (2007) Protocol for emergency EPR dosimetry in fingernails. *Radiat. Meas.*, 42, 1085-1088.
- Trompier F. et Bassinet C., (2009) Accident de gammagraphie survenu le 23 mars 2008 à Rades (Tunisie)-Bilan des résultats de dosimétrie par résonance paramagnétique électronique, Rapport IRSN/DRPH/SDE n°2009-11.

## *Conclusion générale*

Ce travail de thèse a été principalement motivé par l'évolution des menaces relatives aux risques radiologiques. Pour certains des scénarios envisagés, l'utilisation malveillante de substances radioactives peut conduire les autorités à suspecter qu'un nombre important d'individus soit possiblement exposé. La gestion de telles situations impose d'être en capacité de distinguer, parmi une large population potentiellement exposée, les individus nécessitant une prise en charge médicale immédiate de ceux pour lesquels elle peut être différée voire considérée comme inutile. Il s'agit d'éviter, autant que possible, la saturation du système de prise en charge des victimes et de le dimensionner au plus près des besoins réels.

Lorsque ce travail de thèse a débuté, la principale approche développée, tant au niveau national qu'au niveau international, pour identifier les personnes ayant été significativement exposées à des rayonnements, visait à mettre en place des réseaux de laboratoires utilisant des techniques bien établies comme la cytogénétique, pour démultiplier les capacités d'analyse des échantillons prélevés sur les individus potentiellement impliqués. Si ces techniques sont effectivement bien établies, elles nécessitent, pour la plupart des laboratoires, l'implication de personnels formés et entraînés, comme par exemple pour le comptage visuel des aberrations chromosomiques en cytogénétique. Une autre stratégie a consisté à automatiser au maximum les étapes nécessitant une intervention humaine. Cependant, les capacités actuelles en dosimétrie biologique restent toujours très en deçà de ce qui serait nécessaire dans le cas de certains scénarios. De plus, dans cette phase de tri, il est recommandé d'utiliser autant que possible des techniques différentes pour augmenter les capacités d'analyse et également pour doubler les évaluations afin d'éviter les faux négatifs ou faux positifs.

C'est dans ce contexte, qui au final a très peu évolué au cours de la thèse, que nous avons envisagé d'étudier l'apport des techniques de dosimétrie physique pour le tri de population. Des études préliminaires ont été réalisées avec un certains nombres de ces techniques (spectroscopie RPE, luminescence stimulée thermiquement et optiquement) sur des matériaux pouvant être facilement prélevables ou directement mesurables sur le plus grand nombre de personnes. Il s'agissait, d'une part, de matériaux biologiques (ongles, cheveux et émail dentaire) et, d'autre part, d'éléments présents dans les téléphones portables (composants électroniques, polymères et verres minéraux). Le travail sur les matériaux technologiques a notamment été poursuivi dans le cadre d'un projet Européen (Multibiodose) dans lequel le laboratoire est très fortement impliqué. Des premières intercomparaisons sont actuellement organisées sur la mesure des composants électroniques par OSL et des verres des écrans tactiles. Mais, un certain nombre de problèmes limitent encore le caractère opérationnel de ces techniques (fading pour les composants électroniques, etc.). Par ailleurs, l'évolution continue des matériaux utilisés dans ces technologies constitue à elle seule une difficulté majeure pour disposer d'une méthodologie dosimétrique stabilisée.

Le fait de pouvoir estimer des doses sur des échantillons biologiques par des méthodes dites de dosimétrie physique présente un intérêt certain en permettant de ne pas dépendre des matériaux, voir des équipements, qui accompagneraient la personne au moment de l'exposition potentielle. Ainsi, la RPE sur l'émail dentaire, opérationnelle pour l'évaluation des doses en cas d'accident radiologique impliquant un nombre réduit de victimes, est toujours en cours de développement, avec comme objectif d'abaisser suffisamment les limites de détection et les incertitudes associées pour pouvoir envisager une utilisation dans le cadre du tri de population. Le développement de la dosimétrie sur les ongles est quand lui particulièrement pertinent dans le cas d'un accident de grande ampleur compte-tenu de la facilité de prélèvement des ongles. Par ailleurs, il apparaît rapidement que l'intérêt de ce type de dosimétrie est double. En effet, en plus de l'enjeu important qu'il représente pour des applications de tri de population, le développement d'une telle technique pourrait permettre de répondre à la nécessité de disposer de données dosimétriques au niveau des mains dans le cas des accidents radiologiques dus à des manipulations de sources. Ces accidents se produisent assez régulièrement et la quasi-totalité des derniers cas d'accidents dans lesquels l'IRSN a été impliqué présentait ce type de configuration.

Ainsi, si ce travail a débuté avec l'objectif de développer la spectroscopie RPE pour l'estimation des doses sur les ongles avec des performances compatibles avec les exigences du tri (délai, limite de détection, incertitude et capacité), il s'est avéré également extrêmement utile dans le domaine des accidents radiologiques « plus classiques ».

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié de manière détaillée les différents signaux présents dans les spectres RPE des ongles. En plus des signaux radio-induits, nous avons identifié trois autres catégories de signaux RPE. Il était nécessaire de posséder une bonne compréhension de ces signaux avant d'étudier dans le détail les différentes composantes du signal radio-induit. En effet, ces signaux préexistant avant irradiation sont susceptibles de se superposer ou de se confondre avec ceux induits par les radiations.

La première catégorie est constituée des signaux intrinsèques qui sont liés à la composition de l'ongle. Ainsi, nous avons identifié et étudié les signaux induits par la présence de fer et de manganèse. Nous avons, en particulier, mis en évidence que le manganèse était présent dans au moins deux environnements chimiques différents et qu'une structure fine pouvait se superposer aux signaux dosimétriques. Pour des échantillons présentant les teneurs en manganèse les plus élevées, nous avons observé une variation de l'intensité des raies du manganèse en fonction de la dose, ce qui est susceptible de présenter un intérêt pour les aspects dosimétriques. En plus des signaux liés au fer et au manganèse, un signal (« BG ») présentant des caractéristiques similaires à l'une des composantes du signal radio-induit (RIS5) a été finalement identifié comme un signal intrinsèque. Une analyse approfondie de la

nature de ce signal et l'étude de sa variabilité inter-individu, nous a permis d'envisager les méthodes classiques d'estimation de dose pour les applications de tri. En effet, la faible variabilité de l'amplitude du « BG » permet d'estimer sa contribution dans le signal mesuré sur des ongles irradiés à partir d'une valeur moyenne estimée sur un échantillonnage d'ongles. Ainsi, il est possible d'en déduire la composante radio-induite et de la convertir en dose par l'utilisation d'une courbe d'étalonnage. ***La définition de la nature du « BG » a constitué la première étape clé vers la définition de protocoles de mesure adaptés au tri de population.***

La deuxième catégorie de signaux est liée à la présence d'agents extérieurs, tels que les vernis cosmétiques. Il s'agit de signaux définis comme parasites. Certains vernis peuvent induire des signaux extrêmement intenses qui empêchent toute mesure des signaux dosimétriques. Ces signaux sont dus à la présence d'oxydes de fer dans les vernis et liés à des phénomènes conjugués de super-paramagnétisme et de résonance ferromagnétique. L'utilisation de dissolvants permet d'éliminer ces signaux sans altérer les composantes stables du spectre RPE des ongles. Ces données laissent à penser que les vernis et l'utilisation de dissolvant ne limitent pas le champ d'application de la RPE sur les ongles. Il conviendra bien sûr, dans la poursuite de ces travaux, de réaliser une étude plus détaillée pour établir de façon certaine l'innocuité de tous les types de vernis cosmétiques et des dissolvants vis-à-vis du signal dosimétrique.

La troisième catégorie de signaux mesurés dans les ongles est liée aux réactions de mécano-chimie induites lors du prélèvement des ongles ou lors de la préparation des échantillons (coupe ou broyage). Depuis les premières études menées sur les ongles et jusqu'à maintenant, les signaux induits par le stress mécanique (MIS) ont été identifiés comme un obstacle majeur au développement de la dosimétrie sur les ongles. Plusieurs types de radicaux génèrent des signaux RPE qui se superposent à ceux d'intérêt dosimétrique. De ce fait, la possibilité de réaliser des mesures *in vivo* des ongles permettant ainsi de ne mesurer que les composantes radio-induites et intrinsèques du signal RPE sont en cours de développement. D'autres approches sont basées sur la simulation et la déconvolution des signaux mesurés. Au final, nous avons pu montrer que toutes des composantes du MIS que nous avons identifiées peuvent être éliminées par une simple humidification des ongles. ***Le rôle de l'humidité sur le comportement des radicaux libres liés au MIS est l'un des résultats les plus importants de ce travail de thèse et a constitué une deuxième étape majeure vers le développement de protocoles de mesure pour le tri de population, après l'identification de la nature du « BG ».***

***Enfin, la troisième étape clé de ce travail de thèse a été l'identification d'une espèce radio-induite stable, le RIS5.*** Ce signal, même s'il est de faible intensité, permet d'estimer des

doses entre 2 Gy et environ 45 Gy, dose à laquelle le signal atteint un niveau de saturation. D'autres espèces radio-induites ont été identifiées, mais du fait de leur instabilité et/ou parce que leur signature RPE n'est observable qu'à très forte dose, ces espèces n'ont pas été considérées pour estimer les doses. La réponse en fonction de la dose du RIS5 est atypique car elle n'est pas linéaire et qu'au-delà d'une valeur moyenne de 45 Gy le signal diminue jusqu'à n'être plus mesurable.

Sur la base de l'étude du RIS5, *deux protocoles ont été proposés pour estimer les doses*. Le premier, applicable pour les doses les plus faibles (< 10 Gy), et donc adapté à une application pour le tri de population est basé sur les méthodes d'étalonnage. Le second, applicable pour les plus fortes doses, est plus pertinent pour l'estimation des doses lors d'irradiations localisées aux mains. Etant donné que le phénomène de saturation du signal ne permet pas d'utiliser de manière satisfaisante les méthodes classiques d'estimation des doses pour les plus fortes doses, ce second protocole a été établi en développant une nouvelle approche, basée sur l'évaluation de la dose de saturation. *Cette approche a été appliquée lors d'expertises sur des ongles prélevés sur plusieurs victimes d'accident (Tunisie (2008), Gabon (2010), Pérou (2012))*. Les résultats très encourageants obtenus constituent une première validation de l'approche. De plus, il faut signaler que ces travaux d'expertise constituent les premières applications dosimétriques connues de la spectroscopie RPE en bande Q.

Ces deux protocoles ne seront pleinement opérationnels pour l'expertise qu'après une phase d'optimisation concernant tout particulièrement le temps nécessaire à la mesure d'une dose sur un ongle avec une incertitude satisfaisante. Une étude visant à améliorer la sensibilité de la mesure, et par la même à diminuer les temps d'acquisition, en effectuant les mesures à basse température, avec des résonateurs adaptés ou en utilisant un insert constitue la suite indispensable de ce travail de thèse. Par ailleurs, si l'intérêt pour les ongles dans l'application de tri de population se confirme, il pourrait alors être envisagé de développer des passeurs d'échantillons automatisés et de construire des spectromètres optimisés pour ce type d'application.

Dans les perspectives, il conviendrait également de considérer et d'étudier la mesure des ongles avec d'autres techniques, comme la thermoluminescence ou la lyoluminescence.

## Annexe I : Effets biologiques des rayonnements ionisants

Dans cette annexe, ne sont décrits que les effets déterministes des rayonnements ionisants. Les effets déterministes sont ceux que l'on observe au delà d'un seuil de dose pour un type de lésions et un type d'organe. Les seuils à partir desquels ils commencent à apparaître sont de l'ordre 0,2 Gy. Ils sont appelés **déterministes** car ils sont systématiques, c'est-à-dire qu'ils se manifestent toujours au-delà des **valeurs seuils** et leur gravité augmente en général avec la dose reçue. En plus de la dose reçue, les effets déterministes des rayonnements dépendent du volume de tissu irradié (cas des irradiations localisées, partielles ou très hétérogènes), de la qualité et du type de rayonnement (à dose égale les dommages sont différents s'il s'agit par exemple de photons ou de neutrons) ainsi que de la durée de l'exposition (influence du débit de dose).

Les effets sur les tissus se manifestent dans les quelques jours à quelques semaines qui suivent : dépeuplement cellulaire, atrophie et dégradation des fonctions tissulaires. Le déficit cellulaire qui en résulte entraîne des lésions tissulaires qui à leur tour altèrent la fonction de l'organe. Par l'interférence avec la mitose, ce sont les tissus qui se régénèrent le plus rapidement qui sont principalement touchés : peau (couche basale de l'épiderme, seuil : ~ 6 Gy), moelle osseuse et organes lymphoïdes (seuil : ~ 2 Gy) , intestin (revêtement épithélial, seuil : ~ 10 Gy), gonades (spermatogonies, seuil : ~ 0,15 Gy, ovocytes, seuil : ~ 1,5–2 Gy), cristallin (épithélium antérieur, seuil : ~ 1–3 Gy), voies respiratoires (seuil : ~ 6–10 Gy). Ces effets surviennent dans les jours ou semaines qui suivent le moment de l'irradiation, de façon d'autant plus précoce que le tissu concerné a un taux de renouvellement plus rapide. Ils peuvent être réversibles, selon la sévérité et la répartition des lésions. La défaillance de ces organes se traduit par l'apparition de signes cliniques dont l'évolution au cours du temps est fonction de la dose et de sa répartition. La défaillance de plusieurs organes de manière simultanée peut entraîner la mort de l'individu.

Les rayonnements ionisants ne produisent pas d'effets pathognomoniques, morphologiques ou histologiques qui peuvent permettre un diagnostic étiologique certain. En d'autres termes, la réaction de l'organe dépend beaucoup plus de l'organe que du stress à l'origine du dysfonctionnement tissulaire. Par exemple, après de fortes doses la peau rougit et la cornée s'opacifie ; des tissus comme la moelle osseuse, l'épithélium intestinal ou les gonades mâles, dont le taux de renouvellement est rapide, ne peuvent plus assurer leurs fonctions en raison des importantes pertes cellulaires. Comme ces pertes concernent en premier lieu les cellules souches et immatures, la mort normale des cellules adultes fonctionnelles n'est plus compensée par l'arrivée de cellules jeunes de remplacement.

Aux très fortes doses (> 20–50 Gy) le système nerveux est touché ; désorientation, incoordination des mouvements volontaires, délire, coma, convulsions, puis mort surviennent

quelques minutes à quelques heures après l'exposition. Une période de récupération partielle des capacités de quelques heures peut être observée.

Pour des doses inférieures, lors d'une irradiation aiguë, on distingue généralement trois phases dans l'évolution de l'état de la victime :

- **Une phase initiale ou prodromique** d'une durée de l'ordre de quelques heures à quelques jours qui apparaît quelques heures après l'exposition. Le délai d'apparition est d'autant plus court que l'irradiation est sévère. Des signes de fatigue sont observés, de même que des céphalées, nausées et/ou, vomissements ainsi que des érythèmes ;
- **Une phase de latence** de quelques jours à deux semaines durant laquelle les symptômes initiaux disparaissent. Cette phase est d'autant plus courte que l'irradiation est sévère ;
- **Une phase aiguë ou d'état**, potentiellement mortelle, qui dure de quelques semaines à plusieurs années. C'est la phase critique au cours de laquelle apparaissent les effets au niveau des systèmes hématologiques, gastro-intestinaux, respiratoires et cutanées. Selon la sévérité de l'exposition et les organes touchés, un nombre important de symptômes peuvent être observés (nausée, vomissements, asthénie, anorexie, alopecie, érythème, ulcération ou nécrose de la peau, immunodépression, hémorragies internes, diarrhée et déshydratation, douleurs thoraciques, insuffisance respiratoire, etc.).

Il existe cinq principales formes du syndrome d'irradiation aiguë qui dépendent des doses reçues aux différents organes concernés, qui peuvent se produire simultanément :

1. **La forme cérébro-vasculaire** critique se manifeste généralement pour des doses supérieures à 50 Gy mais les symptômes peuvent apparaître dès 20 Gy. Au-delà de 50 Gy, elle débute dans les premières heures après l'exposition, et touche le système nerveux. Elle se caractérise par les symptômes suivants lors de la phase prodromale (quelques minutes au plus après l'irradiation) : agitation extrême, apathie, ataxie, désorientation, troubles de l'équilibre, vomissement, diarrhée, perte de connaissance. Pendant la période de latence, parfois inexistante, et durant quelques heures au plus, le patient récupère partiellement ses capacités. La phase symptomatique se manifeste par des convulsions, suivis du coma. A ces doses, le décès intervient généralement sous trois jours et est le plus souvent provoqué par un effondrement du flux sanguin cérébral lié à l'augmentation de la pression dans la boîte crânienne (tableau d'hypertension intracrânienne aiguë) (œdème cérébral, méningite, encéphalite).
2. **La forme gastro-intestinale** se manifeste pour une exposition supérieure à 6 Gy. Après une dose unique supérieure à 6 Gy, une dénudation partielle voire

complète des villosités survient en quelques jours. La rupture radio-induite de la barrière intestinale entraîne le passage des bactéries, qui induisent des infections, aggravées par le déficit des cellules sanguines de défense, causé par l'atteinte en général concomitante de la moelle osseuse. Il s'agit donc d'un syndrome grave, pouvant entraîner la mort par septicémie et déshydratation. Pour des doses supérieures à 10 Gy, la dénudation de la muqueuse de l'intestin grêle exacerbe la fuite des fluides et des électrolytes et la mort peut survenir en quelques jours.

3. **La forme hématopoïétique** se manifeste pour une exposition supérieure à 1–2 Gy. Elle débute deux à trois semaines après l'exposition aux radiations et touche la moelle osseuse. Le syndrome hématopoïétique est lié à la destruction partielle ou totale des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et à celle des lymphocytes périphériques. La déficience hématopoïétique se traduit en quelques semaines par une chute du taux de granulocytes (immunodéficience) et de plaquettes (défaut de coagulation). Cela peut conduire à une infection mortelle ou à des hémorragies internes. Dans le cas d'une irradiation homogène, la dose qui entraîne la mort dans un cas sur deux en deux mois (DL 50/60) se situe entre 2,5 et 5 Gy avec une valeur moyenne de 3,5 Gy.
4. **La forme pulmonaire** se manifeste pour une exposition supérieure à 6–7 Gy principalement sous la forme de pneumonie. La période de latence entre l'irradiation et le développement de la pneumonie est de l'ordre de quelques semaines à quelques mois. La pneumonie radio-induite se traduit par une détresse respiratoire, extériorisée par de la cyanose. Dès les premières manifestations, l'évolution est rapide et inexorable.
5. **La forme cutanée**, se manifeste pour des doses supérieures à 4–7 Gy. Dans la phase prodromale, elle se manifeste principalement, par un érythème (rougeur) passager et des démangeaisons et, lors d'une irradiation intense, la desquamation. Après la période de latence, ces symptômes réapparaissent avec en plus une alopécie. Selon la dose, la seconde vague d'effet peut se traduire par une desquamation sèche (>10 Gy) ou humide (>20 Gy) et pour des doses supérieures à 25 Gy par une nécrose des tissus. Le syndrome cutané peut tout particulièrement se produire en l'absence des autres formes d'irradiation aiguë en cas d'exposition à des rayonnements peu pénétrants comme les rayons bêta ou dans le cas d'irradiation localisée.

Les doses indiquées sont relatives à une exposition aiguë (une exposition dite fractionnée pour une même dose totale n'induit les mêmes effets) avec des rayonnements photoniques. Pour d'autres types de rayonnements, comme par exemple dans le cas des neutrons, les différences en termes d'interaction et de densité d'ionisation, peuvent mener à des effets d'intensité différente pour une même dose délivrée.



## Annexe II : Mesure des temps de relaxation par RPE pulsée

### 1. Méthode de mesure du temps de relaxation transverse $T_2$

Le temps  $T_2$  n'est pas directement mesuré, c'est le temps de mémoire de phase  $T_M$  qui est mesuré selon la méthode proposée par Carr et Purcell (1954). Lorsque  $T_1$  est très supérieure à  $T_2$ , alors  $T_M$  peut être équivalent à  $T_2$ .

Pour simplifier la présentation de cette méthode, considérons deux paquets de spins A et B de fréquences de Larmor  $\omega_A < \omega_B$ . Initialement les aimantations  $M_A$  et  $M_B$  correspondant à ces deux paquets sont orientées selon l'axe Z (Fig. 1, A). Une impulsion radiofréquence intense permet de faire basculer selon un angle  $\pi/2$ , les aimantations dans le plan XY (Fig. 1, B et C).

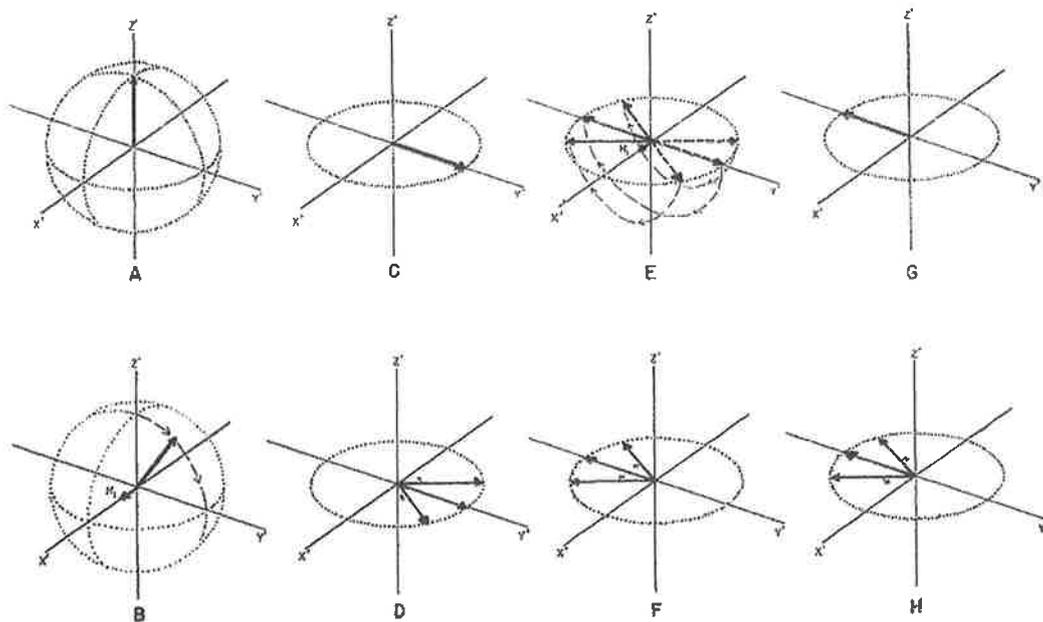


Figure AII.1 : Principe de formation d'un écho (selon Carr et Purcell, 1954)

Les  $M_A$  et  $M_B$  se séparent du fait de leur vitesse de précession différente autour de l'axe Z correspondant à la direction de  $B_0$  (Fig.1, D).  $M_B$  est en avance sur  $M_A$ . Après un délai  $\tau$ , une nouvelle impulsion est appliquée selon l'axe X ou Y permettant une modification de l'orientation de  $M_A$  et  $M_B$  d'un angle  $\pi$  (Fig. 1, E).  $M_A$  est alors en avance sur  $M_B$  et comme  $M_B$  a une vitesse supérieure à  $M_A$ ,  $M_B$  finit par rejoindre  $M_A$  à l'instant  $2\tau$  (Fig. 1, G). A cet instant on détecte un écho dont l'amplitude correspond à  $M_A + M_B$ . Un écho peut être également mesuré aux instants  $4\tau, 6\tau, 8\tau, \dots, 2n\tau$  si l'on applique des impulsions  $\pi$  aux instants  $3\tau, 5\tau, 7\tau, \dots, (2n-1)\tau$ .

Cette séquence correspond à la séquence Carr-Purcell. L'amplitude de l'écho mesuré aux temps  $2n\tau$  décroît selon  $\tau$  comme :

$$e^{\left(-\frac{2n\tau}{T_M}\right)}$$

$T_M$  dépend de  $T_1$  et  $T_2$ , mais lorsque  $T_1 \gg T_2$  on peut considérer que  $T_M \approx T_2$ . L'analyse de la courbe de décroissance de l'amplitude de l'écho en fonction de  $\tau$  permet donc d'estimer  $T_M$  et donc  $T_2$ .

## 2. Méthode de mesure du temps de relaxation longitudinal $T_1$

Le temps de relaxation  $T_1$  a été déterminé par la méthode dite d'inversion récupération. Une impulsion radiofréquence est appliquée pour faire basculer l'aimantation d'un angle  $\pi$ . Une série de séquences d'écho à 2 pulses est ensuite utilisée pour mesurer le retour à l'équilibre de l'aimantation selon le temps  $\tau$  séparant l'impulsion  $\pi$  de la séquence à 2 pulses (Fig. 2).

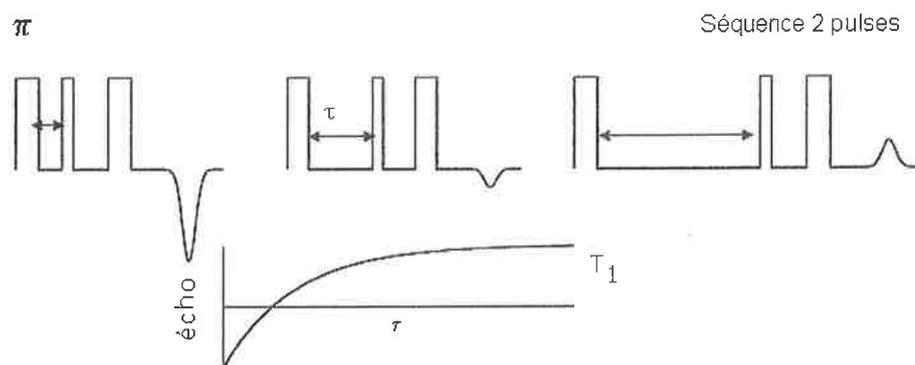


Figure AII.2 : Séquence d'inversion recouvrement

Le signal d'écho augmente de manière exponentielle selon  $\tau$  comme :

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - 2e^{-t/T_1}\right)$$

## Annexe II : Mesure des temps de relaxation par RPE pulsée

### 1. Méthode de mesure du temps de relaxation transverse $T_2$

Le temps  $T_2$  n'est pas directement mesuré, c'est le temps de mémoire de phase  $T_M$  qui est mesuré selon la méthode proposée par Carr et Purcell (1954). Lorsque  $T_1$  est très supérieure à  $T_2$ , alors  $T_M$  peut être équivalent à  $T_2$ .

Pour simplifier la présentation de cette méthode, considérons deux paquets de spins A et B de fréquences de Larmor  $\omega_A < \omega_B$ . Initialement les aimantations  $M_A$  et  $M_B$  correspondant à ces deux paquets sont orientées selon l'axe Z (Fig. 1, A). Une impulsion radiofréquence intense permet de faire basculer selon un angle  $\pi/2$ , les aimantations dans le plan XY (Fig. 1, B et C).

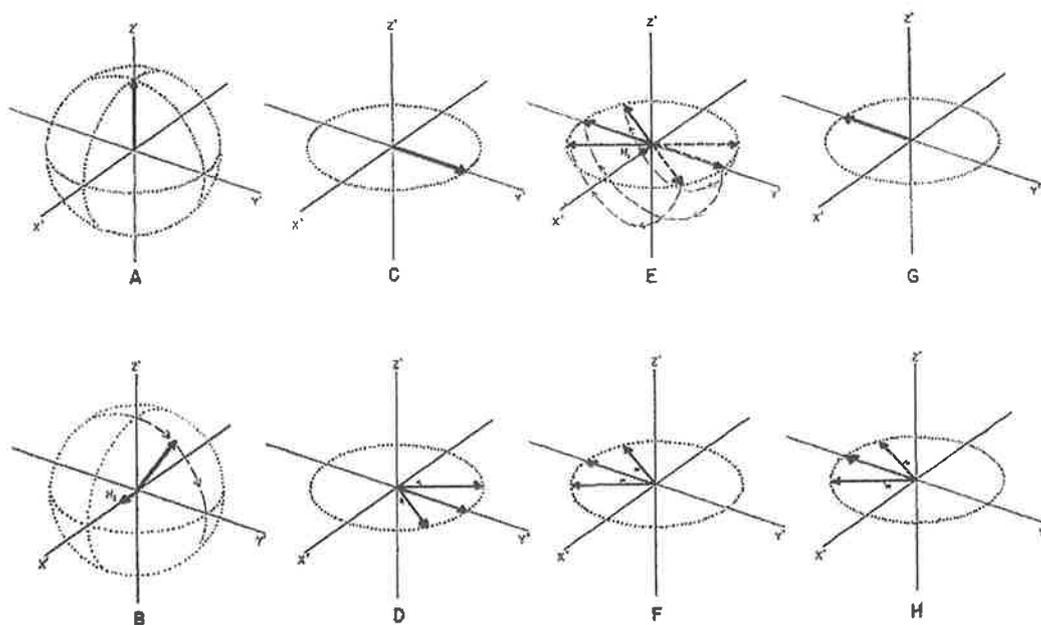


Figure AII.1 : Principe de formation d'un écho (selon Carr et Purcell, 1954)

Les  $M_A$  et  $M_B$  se séparent du fait de leur vitesse de précession différente autour de l'axe Z correspondant à la direction de  $B_0$  (Fig.1, D).  $M_B$  est en avance sur  $M_A$ . Après un délai  $\tau$ , une nouvelle impulsion est appliquée selon l'axe X ou Y permettant une modification de l'orientation de  $M_A$  et  $M_B$  d'un angle  $\pi$  (Fig. 1, E).  $M_A$  est alors en avance sur  $M_B$  et comme  $M_B$  a une vitesse supérieure à  $M_A$ ,  $M_B$  finit par rejoindre  $M_A$  à l'instant  $2\tau$  (Fig. 1, G). A cet instant on détecte un écho dont l'amplitude correspond à  $M_A + M_B$ . Un écho peut être également mesuré aux instants  $4\tau, 6\tau, 8\tau, \dots, 2n\tau$  si l'on applique des impulsions  $\pi$  aux instants  $3\tau, 5\tau, 7\tau, \dots, (2n-1)\tau$ .

Cette séquence correspond à la séquence Carr-Purcell. L'amplitude de l'écho mesuré aux temps  $2n\tau$  décroît selon  $\tau$  comme :

$$e^{\left(-\frac{2n\tau}{T_M}\right)}$$

$T_M$  dépend de  $T_1$  et  $T_2$ , mais lorsque  $T_1 \gg T_2$  on peut considérer que  $T_M \approx T_2$ . L'analyse de la courbe de décroissance de l'amplitude de l'écho en fonction de  $\tau$  permet donc d'estimer  $T_M$  et donc  $T_2$ .

## 2. Méthode de mesure du temps de relaxation longitudinal $T_1$

Le temps de relaxation  $T_1$  a été déterminé par la méthode dite d'inversion récupération. Une impulsion radiofréquence est appliquée pour faire basculer l'aimantation d'un angle  $\pi$ . Une série de séquences d'écho à 2 pulses est ensuite utilisée pour mesurer le retour à l'équilibre de l'aimantation selon le temps  $\tau$  séparant l'impulsion  $\pi$  de la séquence à 2 pulses (Fig. 2).

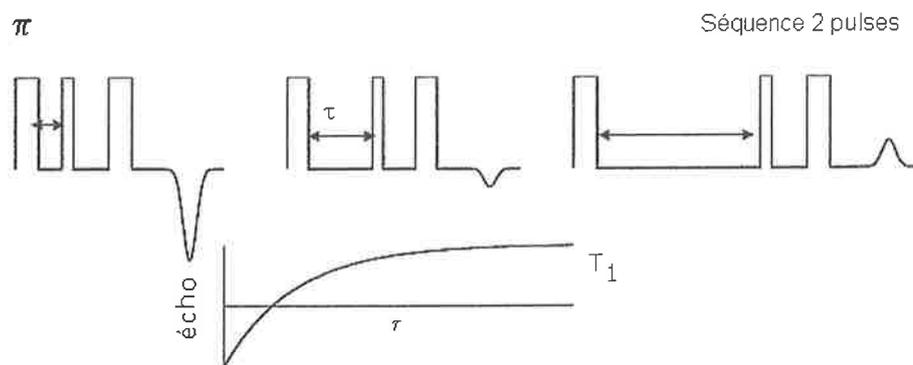


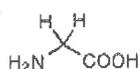
Figure AII.2 : Séquence d'inversion recouvrement

Le signal d'écho augmente de manière exponentielle selon  $\tau$  comme :

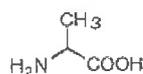
$$M_z(t) = M_0 \left(1 - 2e^{-t/T_1}\right)$$

## Annexe III : Liste et caractéristiques des acides aminés

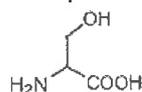
### Petit résidus



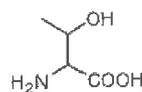
Glycine (Gly. G)  
MW: 57.05



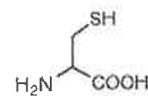
Alanine (Ala. A)  
MW: 71.09



Serine (Ser. S)  
MW: 87.08, pK<sub>a</sub> = 16



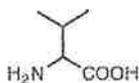
Threonine (Thr. T)  
MW: 101.11, pK<sub>a</sub> = 16



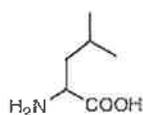
Cysteine (Cys. C)  
MW: 103.15, pK<sub>a</sub> = 8.35

### Nucléophile

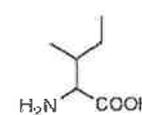
### Hydrophobe



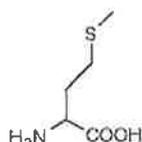
Valine (Val. V)  
MW: 99.14



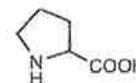
Leucine (Leu. L)  
MW: 113.16



Isoleucine (Ile. I)  
MW: 113.16

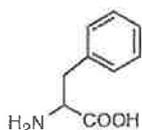


Methionine (Met. M)  
MW: 131.19

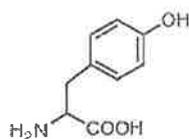


Proline (Pro. P)  
MW: 97.12

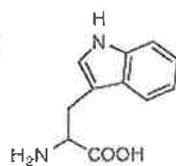
### Aromatique



Phenylalanine (Phe. F)  
MW: 147.18

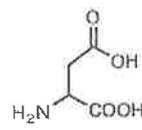


Tyrosine (Tyr. Y)  
MW: 163.18

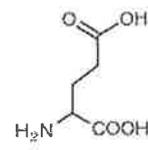


Tryptophan (Trp. W)  
MW: 186.21

### Acide

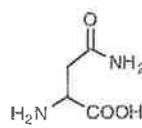


Aspartic Acid (Asp. D)  
MW: 115.09, pK<sub>a</sub> = 3.9

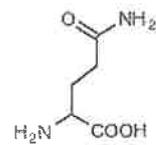


Glutamic Acid (Glu. E)  
MW: 129.12, pK<sub>a</sub> = 4.07

### Amide

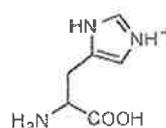


Asparagine (Asn. N)  
MW: 114.11

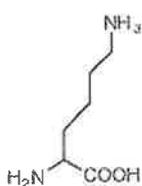


Glutamine (Gln. Q)  
MW: 128.14

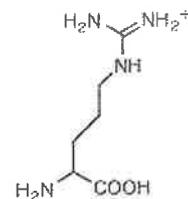
### Basique



Histidine (His. H)  
MW: 137.14, pK<sub>a</sub> = 6.04



Lysine (Lys. K)  
MW: 128.17, pK<sub>a</sub> = 10.79



Arginine (Arg. R)  
MW: 156.19, pK<sub>a</sub> = 12.49



## *Résumé*

Ce travail de thèse a été principalement motivé par l'évolution des menaces relatives aux risques radiologiques. Pour certains des scénarios envisagés, l'utilisation malveillante de substances radioactives peut conduire les autorités à suspecter qu'un nombre important d'individus soit possiblement exposé. La gestion de telles situations impose d'être en capacité de distinguer, parmi une large population potentiellement exposée, les individus nécessitant une prise en charge médicale immédiate de ceux pour lesquels elle peut être différée voire considérée comme inutile. En d'autres mots, il faut pouvoir effectuer un tri entre les individus ayant reçus une dose de radioactivité importante et ceux pour lesquels la dose reçue peut être considérée comme faible. Dans le cadre de cette thèse, il s'agissait de répondre à ce besoin en étudiant la possibilité d'estimer des doses de rayonnements ionisants à partir de la mesure par spectroscopie à résonance paramagnétique électronique (RPE) de radicaux libres induits par l'irradiation des ongles. Cinq types de signaux RPE induits dans les ongles par irradiation ont été identifiés et caractérisés. Seul l'un de ces signaux présente une stabilité suffisante pour permettre l'estimation d'une dose. En plus des signaux radio-induits, des signaux liés à la composition de l'ongle, induits par des réactions de mécano-chimie lors du prélèvement ou encore par l'application de vernis cosmétiques peuvent se superposer aux signaux radio-induits. Une étude détaillée de ces signaux a permis de proposer des solutions pour soit les éliminer sélectivement soit les prendre en compte lors de l'analyse. Au final, deux protocoles d'estimation des doses ont été proposés. Le premier permet la mesure des doses comprises entre 2 et 10 Gy et est donc bien adapté à l'objectif premier de la thèse. Ce premier protocole, qui n'est pas encore complètement optimisé, nécessitera des tests et des validations complémentaires. Un second protocole a également été élaboré pour l'estimation des doses supérieures à 10 Gy, parce qu'il répond à un besoin identifié dans le cas d'accidents régulièrement rencontrés, notamment ceux impliquant des irradiations localisées aux mains à de forts niveaux de dose. Ce protocole a été appliqué sur trois cas récents d'accident radiologiques, ce qui a permis de fournir des informations dosimétriques qui ne pouvaient pas à ce jour être déterminées par d'autres méthodes et qui s'avèrent être déterminantes pour le suivi médical des patients. Les principaux points bloquants dans la mise au point d'une méthode d'estimation des doses basée sur la mesure par RPE des radicaux libres radio-induits dans les ongles ont pu être levés. Un travail de mise au point et d'optimisation est encore nécessaire pour asseoir complètement ce type d'approche, notamment pour le tri de population.

