



Université Pierre et Marie Curie

École doctorale ED 397

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Laboratoire de Dosimétrie des Rayonnements Ionisants (LDRI)

**Développement de la spectroscopie de résonance
paramagnétique électronique pour la dosimétrie d'accident
radiologique sur les ongles des victimes**

Par Nicolas TKATCHENKO

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Pr. Didier GOURIER

Encadrée par Dr. François Trompier

Présentée et soutenue publiquement le 14 septembre 2018

Devant un jury composé de :

CHOUA Sylvie, Maître de conférence, Rapporteur

OLLIER Nadège, Ingénieure CEA, Rapporteur

ALLARD Thierry, Directeur de recherche, Membre du jury

BELLE Valérie, Professeur, Membre du jury

LE DU Yann, Ingénieur de recherche CNRS, Membre du jury

VEZIN Hervé, Directeur de recherche CNRS, Membre du jury

À mes parents.

Remerciements

Ah la thèse... Quelle épreuve ! Ces trois années de thèse ont été à la fois intenses et compliquées, mais au final, j'en garde un excellent souvenir. Comme dirait Sénèque, *« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, c'est parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles. »*. Eh bien, j'ai osé... et c'était quand même bien difficile ! Aussi, si je suis parvenu au bout de cette épreuve, c'est notamment grâce à certaines personnes que je me dois de remercier.

Tout d'abord, je tiens à remercier l'IRSN dans son ensemble pour m'avoir permis de réaliser cette thèse de doctorat pendant 3 ans. On l'oublie souvent mais rares sont les thésards qui bénéficient d'autant de moyens : le matériel de dernière génération, la possibilité d'interagir avec des membres d'autres équipes facilement, les opportunités de présenter nos travaux lors conférences internationales, les journées des thèses et, dans un autre registre (pour se motiver à la rédaction du manuscrit de thèse me concernant !), les estivales de l'IRSN ! Donc un grand merci !

Ensuite, je voudrais remercier **Didier Gourier**, **François Tromprier**, **Yann Le Du**, **Carmen Villagrasa** et **Guillaume Manificat** pour l'immense travail qu'ils ont fourni à mon égard, des corrections du manuscrit aux précieux conseils, en passant par leur écoute et leur réconfort quand les doutes commençaient à s'installer dans mon esprit ! Un très grand merci à toi, François, pour les riches échanges qu'on a pu avoir notamment ces derniers mois.

Merci également à **Sylvie Choua** et **Nadège Ollier** qui ont accepté de corriger mon manuscrit de thèse et du temps qu'elles y ont consacré, et ce en plein été. Un immense merci à **Thierry Allard**, **Valérie Belle**, **Yann Le Du** et **Hervé Vezin** pour leur participation au jury de cette soutenance de thèse.

J'ai eu la chance de travailler un certain temps avec **Mariem El Afrit** et **Yann Le Du** à l'IRCP de Chimie Paris-Tech. Honnêtement, j'ai jamais autant apprécié travailler en équipe ou plutôt en équ' ou en Tea' pour les anglophones ! Heureusement qu'on ne se voyait qu'une seule fois par semaine car avec la quantité de kebabs que j'ingurgitais tous les vendredis midis (entre 2 et 3 selon l'humeur...), je ne rentrerais plus dans mes vêtements aujourd'hui ! Plus sérieusement, quel plaisir de vous avoir rencontrés.

Évidemment, je remercie mon mentor qui m'a appris à survivre dans le « Thesis Game » (**Anthony Bonfrate**), Kako le tanneur d'Assigny (**Jacques Debroas**), Laurent le kitesurfeur (**Laurent Van Ryckeghem**), Marion la psychologue (**Marion Baumann**) **Juju** la danseuse (#Connneemmmaraaaaa) (**Julie Colnot**), Nico Thug le meilleur ouvrier de France de cookies à +4000 kcal (**Nicolas Tang**), Toto Bliiiiin avec qui j'étais connecté cérébralement sauf pour les polynômes de Tchebychev (**Thomas Blin**), Tiff' qui a survécu comme moi à la thèse et qui a franchement contribué à mon bien-être mental ces trois longues années (**Tiffany Beaumont**) et **Nadège Le Bihan** qui m'a redonné la banane quand ça n'allait pas !

Merci également aux stagiaires qui ont clairement apporté de la bonne humeur au labo, Robin le gangster (**Robin Sauvinet**), Madi que j'ai encadrée pendant 6 mois de stage (j'ai jamais autant pris l'escalier par ta faute) (**Madison Ribeiro**), GuiGui le 1^{er} homme que j'ai rencontré qui fait des trails de 88 km en courant (**Guillaume Garnier**), Océane qui n'est dorénavant plus une bouteille (**Océane Grand**), Yasscos le parrain de tous les stagiaires (**Yassine Rizzi**), Bianf le paladin spé feu lvl 55 (**Fabian Taesch**), Fazia et ses supers gâteaux (**Fazia Aberkane**), LauLau et ses pauses clopes (à l'heure actuelle, j'ai arrêté de fumer !!) (**Laurene Masclet**), **Sylvain Vayre**, **Quentin Ussunet**, **Stefania Peracchi**, **Sara Principi** et **Corrado Cardano**.

Je remercie tous les thésards de l'IRSN avec qui j'ai passé des supers moments, que ce soit en afterwork, lors des repas le midi ou des rares pauses café, aux journées des thèses et sans oublier lors du fameux weekend à Cadarache : **Tiffany Beaumont**, **Nadia Benabdallah**, **Mariam Ben Kacem**, **Annaïg Bertho**, **Anthony Bonfrate**, **Alice Bontemps**, **Manon Britel**, **Julie Colnot**, **Fabrice Entine**, **Amélie Freneau**, **Sabine Hoffmann**, **Jacques Jabbour**, **Cyprien Jaillet**, **Manon Jacquemin**, **Ekoe Kangni Foli**, **Alexia Lapiere**, **Jeremy Lavigne**, **Laura Lintis**, **Sylvain Meylan**, **Frederic Soysouvanh**, **Lucie Stetten**, **Benjamin Tampon**, **Nicolas Tang**, **Benoit Usunier** et tous les membres de l'ADIN !

Je remercie également la grande famille recomposée du SDOS (FAR) : **Céline Bassinet**, **Marion Baumann**, **Éric Blanchardon**, **Raphaël Bô**, **David Broggio**, **Marta Bueno Vizcarra**, **Cécile Challeton de Vathaire**, **Marie Anne Chevallier** (et sa famille pour leurs dons réguliers d'échantillons d'ongles, merci beaucoup!), **Isabelle Clairand**, **Estelle Davesne**, **Jacques Debroas**, **Aurélie Desbrée**, **Didier Franck**, **Christelle Huet**, **Nadège Le Bihan**, **Sylvie Lejal**, **Veronique Lejeune**, **Guillaume Manificat**, **Francoise Quillet**, **Yoann Ristic**, **François Trompier**, **Laurent Van Ryckeghem**, **Carmen Villagrasa** ! Mention spéciale à **Coralie Calmelet Gimenez** sans qui je ne serais jamais devenu Sauveteur Secouriste du Travail (SST).

Merci aussi à tous les membres de LRSI pour les dépannages d'eau distillée, d'acétone et de gants de protection quand j'en avais besoin. Franchement, un grand merci à **Céline Bouvier – Capély**, **Géraldine Landon**, **Alexandre Legrand**, **Annabelle Manoury**, **Guillaume Phan** et **David Suhard**.

Au cours de ces trois années de recherche, j'ai travaillé en collaboration avec l'IRCP de Chimie ParisTech donc merci aux personnes que j'ai rencontrées là-bas et qui étaient vraiment sympas : **Nadia Touati**, **Julien San LegArt** et **Patrick Achehoug**.

Je conclurai avec des remerciements plus personnels. J'ai eu la chance d'être accompagné et encouragé par ma famille et mes amis lors des moments un peu plus difficiles. Donc naturellement je remercie énormément mes parents qui en ont vu de toutes les couleurs et qui, malgré tout, m'ont toujours soutenu. J'ai une chance inouïe de vous avoir, je vous aime ! Ma famille au sens large (frères, cousin(e)s, tantes, oncles, grand parents) m'a également soutenu donc un chaleureux merci ! Enfin merci également aux deux p'tites crapules **Laura Fabbiano & Nérissou**, **Chloé Rient & Antoine Ellice** (les BlackSheepeurs), **Patoch** et **Sebastien & Marylin Dutriat** avec qui on passe toujours d'excellents moments !

Table des matières

Sigles, abréviations et constantes

I Introduction générale

II Contexte et objectifs du travail de thèse

1 Les accidents impliquant les rayonnements ionisants.....	6
1.1 Un peu d'histoire.....	6
1.2 Les accidents radiologiques.....	8
1.3 Les différents types d'exposition.....	9
2 La dosimétrie rétrospective d'accidents.....	12
2.1 L'observation clinique.....	13
2.2 La dosimétrie biologique.....	14
2.3 La reconstitution d'accident.....	15
2.4 La dosimétrie physique.....	17
3 La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) : un outil de choix.....	18
3.1 Les différents domaines d'application de la spectroscopie RPE.....	19
3.2 L'apport de la spectroscopie RPE en dosimétrie.....	21
3.3 L'évolution de la dosimétrie RPE.....	23
4 L'application de la spectroscopie RPE sur les ongles.....	27
4.1 L'étude des ongles en spectroscopie RPE.....	27
4.2 Les difficultés liées à l'analyse des spectres RPE des ongles.....	32
5 Les principaux objectifs du travail de thèse.....	36

III État de l'art en spectroscopie RPE des ongles

1 Introduction.....	41
2 Le magnétisme et les entités paramagnétiques.....	42
2.1 Les bases du magnétisme.....	42
2.2 Les radicaux libres.....	43
3 La spectroscopie de résonance paramagnétique (RPE).....	46
3.1 Les bases théoriques de la spectroscopie RPE.....	46
3.2 Les principaux éléments d'un spectromètre RPE.....	56
3.3 Les paramètres d'acquisition.....	59
3.4 La dosimétrie par spectroscopie RPE.....	62
4 La caractérisation des ongles.....	63
4.1 Une description histologique et biochimique des ongles.....	63
4.2 L'étude des ongles en spectroscopie RPE.....	66
5 Les dispositifs d'irradiation à l'IRSN.....	79
6 Le choix des outils de traitement des spectres RPE.....	80
6.1 Les logiciels de simulation spectrale.....	80
6.2 L'outil de traitement numérique <i>Chebfun</i>	82

IV Étude et caractérisation du signal endogène et des signaux radio-induits

1 Introduction.....	95
2 Le signal endogène <i>BKS</i>.....	97
2.1 Variabilité spectrale du signal endogène <i>BKS</i>	100
2.2 Caractérisation du signal endogène.....	106
2.3 Variabilité en intensité du signal endogène.....	131
2.4 Synthèse sur le signal endogène.....	139

3 Les signaux radio-induits.....	142
3.1 Le signal radio-induit <i>RIS 2</i>	143
3.2 Variabilité du signal radio-induit <i>RIS 2</i>	158
3.3 Le signal radio-induit <i>RIS 5</i>	164
3.4 Discussion sur le protocole de dosimétrie RPE des ongles développé par l'IRSN en 2014.....	171
3.5 Conclusion sur les signaux radio-induits.....	175
4 Synthèse des résultats et perspectives pour la dosimétrie RPE des ongles.....	177

V Développement d'un nouveau protocole pour le traitement numérique des spectres RPE

1 Introduction.....	185
2 Étude du bruit généré par le spectromètre RPE.....	188
2.1 Caractérisation théorique du bruit.....	188
2.2 Caractérisation expérimentale du bruit.....	193
3 Méthodes de réduction du bruit.....	202
3.1 Filtre passe-bas automatisé.....	204
3.2 Lissage polynomial.....	207
3.3 Réduction du degré polynomial.....	209
3.4 Comparaison des méthodes de débruitage.....	212
4 Processus d'extraction des variables d'intérêt.....	218
4.1 Étapes du traitement numérique.....	218
4.2 Évaluation de la pertinence du protocole numérique.....	220
4.3 Application sur un exemple concret d'étude dosimétrique.....	225
5 Conclusions et perspectives.....	229

VI Conclusion générale

Références bibliographiques.....	239
---	------------

Annexes.....	260
1.1 Les effets des radiations sur les matériaux.....	260
1.2 Le traitement des victimes irradiées.....	263
1.3 L'interaction hyperfine.....	264
1.4 L'imagerie 2D par spectroscopie RPE.....	267
1.5 Les protocoles de dosimétrie RPE sur les ongles.....	269
1.6 Algues marines étudiées en spectroscopie RPE.....	274
1.7 Simulations spectrales des radicaux libres susceptibles d'être générés dans la kératine.....	277
1.8 Irradiations Alphée.....	280
1.9 Méthode de comparaison des densités de probabilité.....	280
1.10 Codes développés au cours de la thèse.....	282
1.11 Facteur de Student k	284
1.12 Paramètres d'acquisition des spectres RPE pour l'élaboration des courbes de réponse en dose UV.....	286
 Liste des tableaux et des figures.....	 287

1 Sigles, abréviations et constantes

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

IAEA : International Atomic Energy Agency

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

Gy : Gray, unité de dose absorbée ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$)

RPE : Résonance Paramagnétique Électronique

BKS : Background Signal ou Signal intrinsèque

MIS : Mechanical Induced Signals ou Signaux Mécaniquement Induits

RIS : Radio-Induced Signals ou Signaux radio-induits

DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

β : magnéton de Bohr, $\beta = \frac{e \hbar}{2 \pi m_e} = 9,274\,009 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$

β_N : magnéton nucléaire, $\beta_N = \frac{e \hbar}{2 \pi m_p} = 5,050\,783 \cdot 10^{-27} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$

m_p : masse du proton, $m_p = 1,67 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

m_e : masse de l'électron, $m_e = 9,1 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$

h : constante de Planck, $h = 6,626\,070 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

k : constante de Boltzmann, $k = 1,380\,649 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$

1. Introduction générale

Introduction générale

Depuis le début du 20^e siècle, plusieurs centaines d'accidents radiologiques se sont produits conduisant à plusieurs milliers d'individus surexposés. Dans la majorité des cas, il s'agissait d'irradiations externes et localisées (accidents de radiothérapie, chirurgie interventionnelle, sources orphelines...). La prise en charge des victimes d'irradiation nécessite la connaissance des doses reçues, notamment au niveau des organes les plus à risque. Différentes techniques d'estimation des doses sont généralement mises en œuvre : techniques de reconstitution numériques ou expérimentales, dosimétrie biologique sur des prélèvements de sang (aberrations chromosomiques), dosimétrie physique telle que l'activation neutronique sur des prélèvements biologiques comme le sang ou les cheveux, luminescence stimulée thermiquement sur des affaires personnelles et spectroscopie RPE principalement sur des tissus osseux. Ces techniques complémentaires permettent de caractériser la plupart des situations et des scénarios d'accidents radiologiques. L'institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) est régulièrement impliqué dans la gestion des victimes d'irradiation, pour l'estimation des doses et également pour l'aspect thérapeutique. À ce titre, il est sollicité en tant que support technique à la fois pour les autorités françaises et internationales (Autorité de Sécurité Nucléaire, Agence Internationale de l'Énergie Atomique) mais également pour les établissements de soins qui prennent en charges ces patients. L'IRSN a développé, au fil des années et sur la base de l'expérience acquise, son plateau technique en dosimétrie d'accident pour répondre autant que possible aux différentes situations. Ainsi, la dosimétrie RPE est venue enrichir ce plateau technique au début des années 2000. Cette technique a été adaptée aux besoins et spécificités des accidents radiologiques. Par exemple, l'utilisation de la dosimétrie RPE en bande Q permet de minimiser la masse des prélèvements d'émail dentaire, ou d'os. Elle permet également l'utilisation de nouveaux matériaux tels que les verres des écrans tactiles des smartphones ou l'investigation des ongles comme matériaux dosimétriques.

L'étude des ongles répond à l'absence de technique permettant d'estimer les doses lors d'irradiations localisées au niveau des mains qui est une typologie d'accident récurrente. Les techniques de simulations numériques, notamment en cas de préhension en raison de la grande complexité de la géométrie d'irradiation, sont difficilement utilisables. Il est possible d'estimer les doses reçues sur les tissus osseux récupérés après amputation, mais il s'agit

autant que possible de fournir les estimations de doses au plus tôt et ce, avant l'apparition des signes cliniques. À ce titre, l'efficacité des stratégies thérapeutiques est d'autant plus élevée que les traitements sont appliqués au plus tôt.

Si l'utilisation des ongles en dosimétrie RPE présente de nombreux avantages, l'analyse des spectres RPE n'en demeure pas moins extrêmement complexe et de nombreux paramètres influent sur la production et la stabilité des radicaux mesurés. À ce jour, il n'existe qu'un seul protocole de dosimétrie RPE développé par l'IRSN en 2014 et qui a permis d'estimer les doses reçues par plusieurs victimes d'accidents radiologiques. Toutefois, ce protocole ne permet pas l'estimation des doses plus faibles notamment inférieures à 10 Gy. Or, les lésions radio-induites apparaissent pour des doses de l'ordre du gray et on comprend qu'un tel protocole constitue un besoin critique. Ainsi, un des objectifs principaux de cette thèse de doctorat consiste à caractériser les signaux RPE des ongles, qu'ils soient endogènes ou radio-induits, afin d'optimiser les procédures de dosimétrie par spectroscopie RPE voire d'en proposer de nouvelles.

D'un point de vue plus opérationnel, les spectres RPE sont très bruitées et les durées de mesure relativement longues. De plus, les analyses spectrales sont généralement opérateurs-dépendantes ce qui est très problématique quand on souhaite obtenir des résultats standardisés et reproductibles. Aussi, dans un souci de standardisation, d'abord au sein d'un même laboratoire puis, idéalement, à l'échelle internationale, il est fondamental d'une part, de réduire la contribution du bruit sur les signaux RPE radio-induits et d'autre part, de permettre une extraction des variables d'intérêt de manière fiable, rapide et surtout, indépendante de l'opérateur. Afin de rendre cette approche suffisamment robuste, un certain nombre d'investigations sont encore nécessaires, notamment pour pallier les exigences en termes de capacité de mesure et du délai des expertises.

II. Contexte et objectifs du travail de thèse

Chapitre II

Contexte et objectifs du travail de thèse.....5

1 Les accidents impliquant les rayonnements ionisants.....	7
1.1 Un peu d'histoire.....	7
1.2 Les accidents radiologiques.....	9
1.3 Les différents types d'exposition.....	10
2 La dosimétrie rétrospective d'accidents.....	13
2.1 L'observation clinique.....	14
2.2 La dosimétrie biologique.....	15
2.3 La reconstitution d'accident.....	16
2.4 La dosimétrie physique.....	18
3 La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) : un outil de choix.....	19
3.1 Les différents domaines d'application de la spectroscopie RPE.....	20
3.2 L'apport de la spectroscopie RPE en dosimétrie.....	22
3.3 L'évolution de la dosimétrie RPE.....	24
4 L'application de la spectroscopie RPE sur les ongles.....	28
4.1 L'étude des ongles en spectroscopie RPE.....	28
4.2 Les difficultés liées à l'analyse des spectres RPE des ongles.....	33
5 Les principaux objectifs du travail de thèse.....	37

1 Les accidents impliquant les rayonnements ionisants

1.1 Un peu d'histoire

Les rayons X ont été découverts par le physicien allemand Wilhelm Röntgen en 1895 puis ont connu un véritable succès tant pour le diagnostic médical que pour la thérapie des tumeurs cancéreuses (figure 1). Cet essor rapide et son usage massif se sont inévitablement accompagnés des premiers signes cliniques d'effets secondaires liés à une surexposition à l'égard des rayonnements ionisants, à savoir des radiodermites et des érythèmes, sortes de brûlures cutanées [Koenig et al., 2001]. En ce sens, c'est en 1896 qu'apparaît le premier cas de radionécrose suite à une séance de radiologie à Chicago [Berlin, 2001].



Figure 1 : Premier cliché radiographique de la main Bertha Röntgen en 1895.

Image : wilhelmconradoentgen.de/en/about-roentgen (janvier 2018).

Les rayonnements peuvent être classés en deux catégories selon leur nature et la manière dont ils réagissent avec la matière. On oppose ainsi les rayonnements ionisants (comme les rayons X) aux non ionisants (comme la lumière visible). En ce qui concernent les rayonnements ionisants, on distingue là encore deux groupes :

- Les particules chargées telles que les électrons, les positrons, les particules alpha (noyaux d'hélium), les protons et les ions lourds qui sont directement ionisantes ;
- Les particules non chargées telles que les neutrons et les photons (rayons γ et X) qui sont indirectement ionisantes. Les rayons γ sont émis lors de la désintégration de noyaux radioactifs alors que les rayons X sont générés soit par des transitions électroniques, soit lors du ralentissement des électrons dans la matière (rayonnement de freinage dit Bremsstrahlung).

La plupart des accidents radiologiques font intervenir des rayonnements indirectement ionisants, principalement des rayons gamma ou X [Coeytaux et al., 2015]. Seules les interactions de ceux-ci avec la matière seront donc précisées ici.

Lorsqu'un faisceau de rayons X ou γ pénètre dans un milieu matériel, on constate une diminution progressive de son intensité tout au long de son parcours. Ce phénomène d'atténuation du faisceau a pour origine l'interaction des photons avec la matière et plus particulièrement avec les électrons qui la constituent. L'énergie du photon incident peut-être soit partiellement, soit totalement absorbée par un des électrons du cortège qui acquiert en conséquence de l'énergie lui permettant de se mouvoir. L'énergie cinétique acquise par l'électron se dissipe ensuite dans le milieu matériel en provoquant des ionisations selon des mécanismes de collision ou de freinage avec les particules élémentaires de l'environnement. Ce transfert d'énergie des électrons mis en mouvement vers le milieu matériel est responsable des conséquences radio-induites constatées dans les matériaux irradiés.

Les photons peuvent donc interagir directement avec les électrons, et plus rarement avec les noyaux. Les effets des radiations sur la matière biologique sont les résultats finaux d'une succession de réactions physico-chimiques déclenchées par ces ionisations initiales et qui conduisent à des dommages considérables aux molécules indispensables à la vie.

1.2 Les accidents radiologiques

Les catastrophes nucléaires rencontrées jusqu'à aujourd'hui, aussi bien d'ordre militaire avec, par exemple, la bombe atomique (Hiroshima et Nagasaki les 6 et 9 août 1945), mais aussi d'ordre civil avec Tchernobyl (1986) et Fukushima (2011), ont fortement modifié l'opinion publique au niveau de la perception des risques associés aux rayonnements ionisants [Steinhauser et al., 2014]. Elle a toutefois évolué au fil des années en partie grâce aux études des conséquences sur le plan de la santé et de l'environnement mais également sur le plan socio-économique. Par la suite, la maîtrise des risques et notamment la radioprotection est devenue un sujet majeur pour la sécurité des états et de leur population, notamment en cas d'accidents nucléaires majeurs (figure 2). De plus, la multiplication des utilisations des rayonnements ionisants, aussi bien dans le domaine militaire qu'industriel et médical, a contribué à la nécessité de développer une expertise complexe pour maîtriser et anticiper les risques potentiels d'accidents.

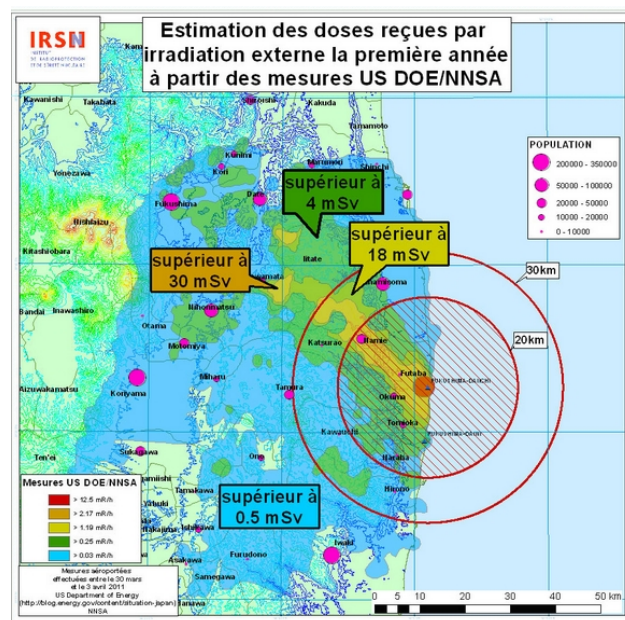


Figure 2 Carte des débits de dose émis par les dépôts radioactifs dans l'environnement de la centrale de Fukushima-Daiichi et des estimations de doses susceptibles d'être reçues par irradiation au bout de la première année. Image : IRSN.

D'après les chiffres de l'UNSCEAR, depuis 1944, 417 accidents radiologiques se sont produits impliquant 133 550 personnes dont 3 003 surexposées et conduisant à 127 décès [UNSCEAR, 2017]. Attention tout de même quant à l'interprétation de ces chiffres. En effet, ils ne reflètent pas complètement la réalité puisque de nombreux accidents radiologiques ne sont pas déclarés tels quels étant donné la difficulté à les diagnostiquer aussi bien au niveau national qu'international.

1.3 Les différents types d'exposition

Un accident radiologique peut-être difficile à identifier et il arrive même parfois que les victimes ne s'en rendent compte que plusieurs jours voire plusieurs semaines après. Il existe cependant quelques causes récurrentes qui peuvent mener à ce type d'accidents résumées ci-dessous et dans le schéma 3 :

- Sources radioactives orphelines mal sécurisées et/ou non identifiées [Clairand et al., 2006, IAEA, 1988] ;
- Perte accidentelle d'une source radioactive [IAEA, 2009] ;
- Dysfonctionnement d'installations industrielles d'irradiation [Huet et al., 2008, IAEA, 1996] ;
- Libération volontaire ou accidentelle de sources radioactives [Harrison et al., 2007, IAEA 1988] ;
- Accidents de criticité [IAEA, 2001]. Ce type d'accident est relatif aux réactions de fissions nucléaires en chaîne non maîtrisées et involontaires ;
- Mauvaise utilisation de dispositifs médicaux (radiologie, radiothérapie) [Trompier et al., 2007, Rehani et al., 2006, Vlietstra, 2004, Koenig et al., 2001].

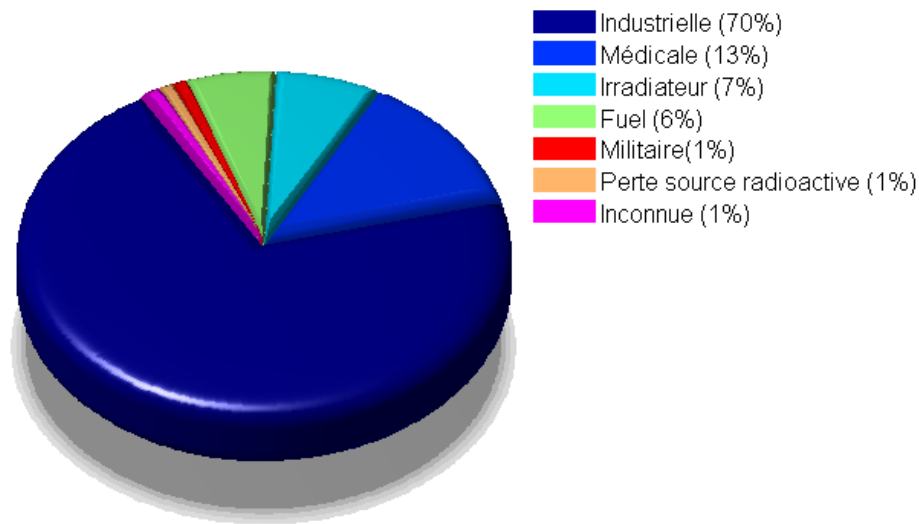


Figure 3 Origine des accidents radiologiques selon l'UNSCEAR.

Une fois la nature de l'accident radiologique identifiée, il est indispensable de mener une investigation concernant le type d'exposition face aux rayonnements ionisants. S'agit-il d'une exposition interne ou bien d'une exposition externe ? Ces deux types d'exposition sont en effet bien différents :

- **L'exposition interne** (concerne 15 % des cas) : elle fait suite à une inhalation ou une ingestion de matière radioactive. Dans ce cas, les rayonnements ionisants sont émis depuis l'intérieur du corps de la victime et l'irradie en continu tant que le radionucléide n'est pas éliminé biologiquement ou n'a pas complètement décru. C'est le cas, par exemple, de l'empoisonnement présumé de Litvinenko au polonium 210 en Grande-Bretagne en 2006 [Rigollet et al., 2008] ;
- **L'exposition externe** (concerne 85 % des cas reportés d'accidents) : ici, la source d'irradiation est localisée à l'extérieur de la victime, dans son environnement proche. Le lecteur intéressé pourra trouver quelques exemples dans le rapport de l'IRSN datant de 2007 « Les accidents dus aux rayonnements ionisants » [Rapport IRSN-2007/79-FR, 2007].

Les irradiations externes sont, dans la majorité des cas (65 %), des irradiations localisées, c'est-à-dire que la dose reçue par la victime est concentrée spatialement sur une partie de son corps [Lefaix et al., 1998]. Dans les 35 % des cas restants, les irradiations sont dites « corps entier » et peuvent conduire au décès de la personne si les doses sont suffisamment élevées (la dose létale¹ 50 est comprise entre 4 et 5 Gy), alors que pour des irradiations très localisées, les doses peuvent atteindre plus de 1 000 Gy sans pour autant engager le pronostic vital de la victime [IAEA, 2009]. Dans le cas des irradiations localisées aux mains, les victimes peuvent recevoir de fortes doses, parfois atteignant plusieurs dizaines de grays (Figure 4).



Figure 4 Conséquences radio-induites au niveau des mains pour de fortes doses.

Image : emergency.cdc.gov (janvier 2018).

Il faut garder à l'esprit que le concept de dose est une donnée à manier avec précaution. En effet, une dose est une quantité d'énergie absorbée par unité de masse. Ainsi, une dose « corps entier » est moins indicative pour l'équipe médicale que la dose totale absorbée par un organe précis (qui, rappelons-le, possède une radiosensibilité qui lui est propre) ou bien qu'une dose en un point donné notamment dans le cas d'irradiation hétérogène ou localisée. La distribution de la dose chez la victime constitue donc une donnée cruciale pour sa prise en charge médicale.

¹ La dose létale 50 (DL 50) correspond à la dose de rayonnements ionisants absorbée par l'organisme entier pour laquelle la probabilité de mourir dans les 60 jours suivant l'irradiation et sans traitement médical est de 50 %.

2 La dosimétrie rétrospective d'accidents

Afin de traiter efficacement une victime irradiée, il faut déterminer aussi rapidement et précisément que possible la dose qu'elle a reçue. Il est donc nécessaire d'acquérir les informations relatives à l'accident pour évaluer de manière précise les dommages radio-induits potentiels. Il faut mentionner que les effets ne sont pas toujours immédiats et que les signes cliniques peuvent apparaître tardivement ou même disparaître pour réapparaître plus tard. Ainsi, pour les brûlures radiologiques cutanées par exemple, les premiers signes apparaissent généralement 48 heures après exposition puis disparaissent et réapparaissent après une phase dite silencieuse ou de latence de quelques jours au minimum et qui est d'autant plus courte que la dose est élevée. Le niveau de dose n'est pas le seul paramètre à avoir un impact sur la sévérité des effets : le fractionnement de celle-ci, son débit et la nature du rayonnement ont également une forte influence. Ainsi, la stratégie thérapeutique repose sur ces points essentiels :

- Quelle dose la victime a-t-elle reçue ?
- Quelle est la distribution de celle-ci au sein de l'organisme ?
- Quel est le type d'exposition ?
- Quelle est la nature des rayonnements ionisants ?
- Quand a-t-elle eu lieu ?

Il n'y a pas une technique de dosimétrie rétrospective ultime permettant de répondre à ces questions, mais bien un ensemble complémentaire et de nature très différente [Ainsbury et al., 2011]. Leur mise en œuvre dépend du type d'accident, du rayonnement, du délai après irradiation, de l'accès possible ou non au lieu de l'accident et aux victimes, de la possibilité d'avoir des prélèvements biologiques ou les matériaux irradiés ainsi que de la connaissance précise des circonstances de l'accident.

2.1 L'observation clinique

La dosimétrie clinique repose sur l'examen de la victime irradiée. Il est nécessaire d'obtenir le plus d'informations possibles concernant les circonstances de l'accident et de repérer les signes cliniques de la victime. Le diagnostic de la sévérité de l'irradiation s'appuie sur l'observation de la nature, la précocité et l'intensité des symptômes visibles ainsi que leur évolution dans le temps. Les symptômes d'irradiation aiguë se manifestent généralement selon plusieurs phases.

La première phase, dite prodromique, dure de quelques heures à quelques jours et se manifeste par des diarrhées, des vomissements, une anorexie passagère, et des érythèmes. S'ensuit une période de latence de quelques jours d'autant plus courte que la dose reçue est élevée. Enfin, la phase aiguë apparaît et se manifeste par un vaste spectre de symptômes qui peuvent mener au décès de la victime. Les symptômes les plus fréquents sont liés à des troubles hématopoïétiques (production de cellules sanguines), gastro-intestinaux, neurologiques, cutanés, respiratoires et cérébraux. La méthode METREPOL [Fliedner et al., 2001] permet, en classifiant et en pondérant les différents indicateurs des atteintes aux systèmes précédemment cités, d'évaluer le degré de gravité de l'irradiation (faible, modérée, sévère, fatale).

Dorénavant, il est conseillé d'intervenir médicalement au plus tôt, sans attendre le développement des signes cliniques (Consensus sur la stratégie thérapeutique des irradiations accidentelles les 6 et 7 mai 2003 aux Vaulx-de-Cernay). En effet, il est préférable d'éviter l'apparition des effets radio-induits et de traiter préventivement la victime que d'essayer de traiter les symptômes tardivement. Le rôle de la dosimétrie d'accident dans la prise en charge médicale a ainsi été modifié. Maintenant, la dosimétrie d'accident est utilisée au plus tôt pour prédire les effets et les traiter sans tarder (parfois avant même leur apparition) augmentant ainsi les chances de succès des thérapies. Ces techniques de dosimétrie d'accident sont basées sur des techniques d'analyses biologiques ou physiques de prélèvements réalisés sur la victime ou dans son environnement au moment de l'accident.

2.2 La dosimétrie biologique

En ce qui concerne la dosimétrie biologique, les techniques de cytogénétique sont les plus performantes et, en conséquence, les plus répandues à l'échelle internationale. La technique de référence est basée sur le dénombrement des aberrations chromosomiques, notamment les chromosomes dicentriques dans les lymphocytes. L'origine de ce phénomène est l'échange de matériel entre deux chromosomes à la suite d'une exposition aux rayonnements ionisants (figure 5). Cette technique a fait l'objet d'une standardisation par l'ISO et est actuellement utilisée en routine à l'IRSN et dans de nombreux autres laboratoires internationaux [Roy et al., 2007, Coleman et al., 2003].

Dans le but de répondre aux besoins dosimétriques spécifiques aux différents types de scénarios d'accidents (exposition ancienne, tri de population...), d'autres techniques de dosimétrie biologique sont en cours de développement et d'optimisation telles que les techniques de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), le CBM (Cytokinesis Block Micronucleus) et le PCC (Premature Chromosome Condensation). De nombreux travaux sont également menés avec des techniques de génétique (mutations somatiques et expression des gènes) et d'analyses de protéines (γ -H2AX, CReactive Protein...). Plusieurs revues détaillées comparent ces différentes techniques avec à la fois leurs points forts et leurs points faibles mais également leurs caractéristiques propres [Ainsbury et al., 2011, Fattibene et al., 2009, Alexander et al., 2007].

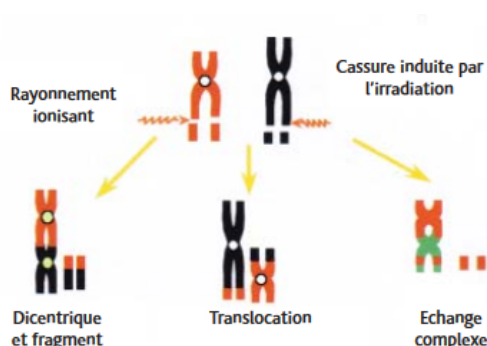


Figure 5 Échange de matériel entre deux chromosomes à la suite d'une exposition aux rayonnements ionisants.

Image : IRSN.

L'ensemble de ces techniques de dosimétrie biologique ne permettent pas de calculer précisément la dose en un point de l'organisme ou reçue par un organe précis mais permettent d'estimer la dose dans le sang circulant qui peut être assimilée à la dose moyenne reçue par l'organisme [Tucker et al., 2008, Sasaki et al., 1968]. D'autres techniques telles que les reconstitutions numériques ou la dosimétrie physique peuvent être utilisées pour pallier ce manque d'information.

2.3 La reconstitution d'accident

Il est également possible d'estimer de manière fiable la distribution de la dose au sein de l'organisme ou dans les organes cibles de la victime irradiée en utilisant des techniques dites de reconstitutions dosimétriques. Le principe est simple : reproduire le plus fidèlement possible l'accident radiologique soit expérimentalement en laboratoire ou in situ, soit par des simulations numériques en utilisant des codes de calculs de transports de particules. En ce qui concerne les techniques expérimentales, il s'agit d'irradier dans des conditions aussi proches que possible de celles de l'accident, des fantômes (soit du corps entier, soit d'une partie spécifique) réalisés dans des matériaux dits « équivalents tissus » (par leur composition chimique), qui sont anatomiquement similaires à la victime et qui sont dotés de dosimètres actifs ou passifs permettant l'estimation des doses reçues aux points stratégiques (figure 6).



Figure 6 Fantôme anthropomorphe équivalent tissu de type Alderson Rando. Ce fantôme est constitué de tranches et peut être rempli de dosimètres thermoluminescents (TLD) ou radio-photoluminescents (RPL) permettant une cartographie de la dose. Image : IRSN.

Il est parfois très compliqué de reproduire expérimentalement les conditions d'un accident radiologique par manque de moyens (sources radioactives, fantômes...). C'est la raison pour laquelle il est souvent plus simple de le reproduire numériquement en mettant en œuvre des codes de calculs qui simulent le transport des particules et les dépôts d'énergie dans la matière (figure 7). Ces codes de calculs sont basés la plupart du temps sur la méthode Monte Carlo [Binder et al., 1986] et des fantômes numériques sont utilisés pour modéliser la victime et ses différents organes. Ces fantômes numériques sont soit élaborés à l'aide d'équations mathématiques qui délimitent le volume des organes (fantômes mathématiques) soit reconstitués à partir d'images d'examen tomographiques ou IRM par segmentation en voxels (fantômes voxelisés) [Sarrut et al., 2014, Kramer et al., 2003]. Si ces techniques de reconstitution d'accident sont puissantes par l'estimation précise des doses reçues aux organes cibles, elles nécessitent une très bonne connaissance des circonstances de l'accident et il est impératif de connaître les moindres détails qui peuvent avoir un impact crucial quant aux doses estimées [Franck et al., 2006].

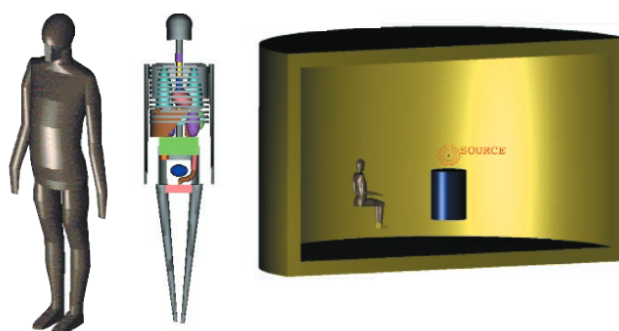


Figure 7 Représentation en 3-dimensions d'un fantôme voxelisé (gauche), d'un fantôme mathématique (centre) et illustration d'une modélisation 3D d'une géométrie d'irradiation (droite). Image : IRSN.

En règle générale, il est assez compliqué de reproduire fidèlement par l'expérience un accident radiologique et l'approche expérimentale reste rarement utilisée au profit des techniques numériques. Néanmoins, dans certains cas, par exemple si l'installation ou les événements successifs sont trop complexes pour être simulés, cette approche expérimentale peut être préférée. En pratique, même si les témoignages sont recueillis rapidement, il est souvent difficile de disposer d'une description complète et précise de l'accident. Les points cruciaux que sont les durées d'exposition et la distance entre la source et la victime ne sont

souvent pas connus ce qui constitue une limite quant à ces techniques de dosimétrie. Toujours est-il, les données d'entrée utilisées pour la reconstitution numérique ne tiennent pas seulement compte des témoignages mais également des paramètres physiques et accessibles de l'exposition (tels que l'activité de la source radioactive et la présence d'écrans de protection), de l'apparition des signes cliniques chez la victime et des résultats de la dosimétrie biologique ou physique. Ces techniques de reconstitution dosimétriques d'accident qu'elles soient expérimentales ou numériques, sont utilisées en routine à l'IRSN en cas d'accident [Huet et al., 2009, Huet et al., 2008, Huet et al., 2007].

2.4 La dosimétrie physique

Plusieurs techniques de dosimétrie rétrospective physique existent et sont opérationnelles pour doser les rayonnements ionisants dans le cas d'accidents radiologiques. Les outils physiques mis en jeu sont divers et variés tels que la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) [Marciniak et al., 2016, Trompier, 2014, Fattibene et al., 2010, Schauer et al., 1994, Desrosiers et al., 1991, Ikeya et al., 1984], la luminescence stimulée thermiquement (TL) [Azorin-Nieto, 1990, Horowitz et al., 1981] ou optiquement (OSL) [Woda & Spöttl., 2009, Yukihiro et al., 2008], ou bien encore l'activation neutronique dans le cas spécifique d'une irradiation par un faisceau de neutrons [Delafield et al., 1988].

Contrairement à la dosimétrie biologique qui renseigne sur la dose moyenne reçue par l'organisme, la dosimétrie physique permet de mesurer de manière absolue une dose en un volume spécifique sur des prélèvements biologiques de la victime par exemple. Ainsi, il est possible d'estimer des doses à partir d'email dentaire ou de tissus osseux via la spectroscopie RPE, d'une prothèse dentaire par le biais de la thermoluminescence ou bien de cheveux ou du sang grâce à la spectroscopie gamma suite à une irradiation avec une composante neutronique. Il est également possible d'utiliser des objets et matériaux directement récupérés dans l'environnement proche de la victime tels que des verres de montres, des médicaments ou des confiseries (spectroscopie RPE), de la céramique (TL) ou encore des pièces de monnaie activées par les neutrons (spectrométrie gamma) [Trompier et al 2009]. Il existe ainsi un très large éventail de matériaux potentiellement utilisables pour effectuer une dosimétrie d'accident, notamment par spectroscopie RPE.

3 La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) : un outil de choix

La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique spectroscopique qui permet d'observer l'absorption d'une micro-onde par des systèmes paramagnétiques lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique intense et de quantifier leur concentration [Sorin et al., 1973, Bertrand, 2010]. Nous allons voir ici succinctement les différents domaines où l'on peut retrouver ce puissant outil ainsi que son précieux apport dans la discipline de la dosimétrie des rayonnements ionisants.

On pourrait dire familièrement que la spectroscopie RPE est la sœur aînée de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). C'est une méthode d'analyse spectrale qui emploie des champs magnétiques de l'ordre du tesla et des ondes électromagnétiques dans la gamme de fréquence entre 1 GHz et 500 GHz (micro-ondes). Cette technique permet d'étudier des matériaux et molécules paramagnétiques (radicaux libres, complexes de métaux de transition, ions...) et d'obtenir de précieuses informations concernant leur structure et leur environnement chimique. Avant de développer les différents domaines d'application de la spectroscopie RPE, rappelons ici quelques éléments d'histoire intéressants qui peuvent être résumés en 3 phases :

1. De 1945 à 1955 : Le physicien Zavoisky publie un rapport dans une revue soviétique sur la première observation réussie d'un spectre d'absorption RPE. Sur la base de cet article, les physiciens du laboratoire Clarendon à Oxford s'intéressent au sujet, mènent des études complémentaires puis posent les jalons théoriques et expérimentaux de cette nouvelle technique de spectroscopie. Commence alors une période de 10 ans qui marque le début de cette discipline innovante ;

2. De 1960 à 1970 : C'est au tour des chimistes de s'intéresser au phénomène RPE ce qui entraîne une explosion des activités de recherche dans ce domaine. Au cours de ces années, les bases de la chimie quantique ont commencé à être développées.
3. De 1980 à aujourd'hui : la spectroscopie RPE n'a cessé de se développer au cours de ces dernières décennies dans des domaines de recherche aussi diverses que variés, allant de la physique à la chimie, en passant par les sciences de la vie et de la terre, la biologie mais aussi de l'environnement, de l'agronomie et de la santé. Ces différentes thématiques de recherches ont conduit à une augmentation croissante de l'utilisation de spectromètres RPE dans le monde de la recherche ainsi que du nombre de publications dans diverses revues scientifiques (figure 8).

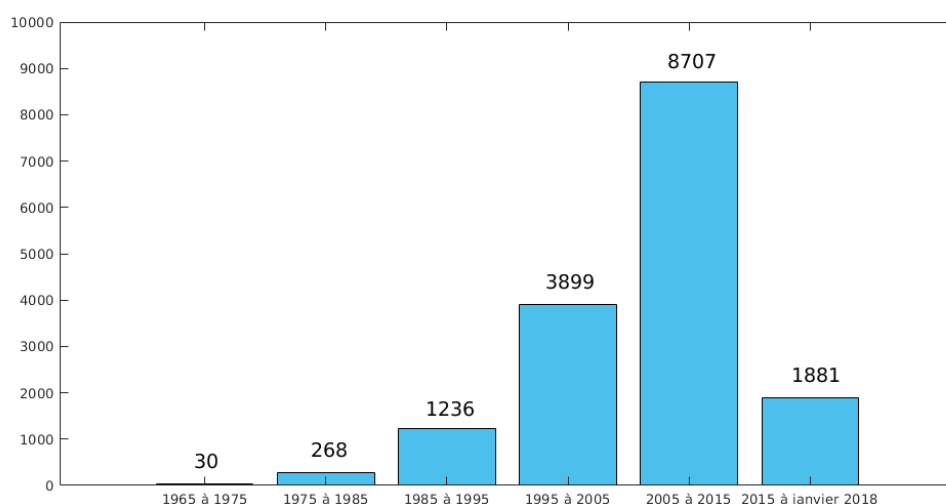


Figure 8 Nombre de publications dans le domaine de la spectroscopie RPE depuis 1965.

Source : <https://www.scopus.com/> (janvier 2018).

3.1 Les différents domaines d'application de la spectroscopie RPE

Selon la nature des entités paramagnétiques étudiées, différentes thématiques de recherche ont pu émerger. Je ne liste ici qu'une infime partie de ces thématiques parmi la multitude existante simplement pour montrer le vif intérêt que portent les scientifiques à l'égard de cette technique. Toutefois, le lecteur intéressé pourra se référer au livre très complet de Patrick Bertrand [Bertrand, 2014] qui fait office de synthèse concernant les applications de la spectroscopie RPE dans le monde de la recherche.

En biologie par exemple, les métaux de transition font l'objet de recherches en spectroscopie RPE et peuvent aboutir à des applications directes en médecine. C'est notamment le cas de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec la caractérisation et le développement d'agents de contrastes de type Gd^{3+} [Danhier et al., 2015] ou dans le cadre d'études visant à améliorer la compréhension des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob) [Hureau et al., 2012] et donc de mieux les appréhender. De même, dans les sciences de la vie et de la terre, le dosage des ions de transitions caractéristiques des impuretés présentes dans les minéraux argileux permet d'obtenir de précieuses informations concernant leurs conditions de formation [Komusinski et al., 1981]. Enfin, des avancées considérables sur les structures et les propriétés rédox de certaines enzymes d'oxydo-réduction ont pu être obtenues par l'étude RPE de leurs complexes d'ions de transitions paramagnétiques [Guo et al., 2007, Bertrand et al., 2013].

À l'instar des métaux et ions de transitions, les radicaux libres sont également largement étudiés en spectroscopie RPE et les thématiques de recherche n'en demeurent pas moins très diversifiées. Dans le domaine des sciences de la vie et de la terre, par exemple, le traçage de la matière organique dans les sols est alors rendue possible et permet leur différenciation [Schnitzer et al., 1972]. Il est également possible d'obtenir des informations structurales de protéines en solution par l'intermédiaire de greffe de radicaux libres bien connus, généralement des radicaux nitroxydes [Griffith & McConnel, 1966, Morin et al., 2006, Belle et al., 2010].

Cependant, dans le cadre de ce sujet de thèse, la thématique de recherche qui nous intéresse est la dosimétrie des rayonnements ionisants par spectroscopie RPE et porte sur la quantification des radicaux libres générés lors de l'irradiation. Là encore, on retrouve une multitude de thématiques de recherche.

3.2 L'apport de la spectroscopie RPE en dosimétrie

La spectroscopie RPE est utilisée en dosimétrie des rayonnements ionisants dans le but d'analyser un effet permanent radio-induit, qu'il soit biologique ou physique, dans un matériau donné. Par exemple, dans le domaine agroalimentaire, certains aliments (légumes, fruits, viandes...) sont irradiés à des fins de stérilisation et la quantification des radicaux libres radio-induits permet l'identification des aliments irradiés qui n'auraient pas été étiquetés comme tels [Nakagawa et al., 2017, Chauhan et al., 2009]. De même, à l'instar de la datation archéologique par le carbone 14, il est également possible d'estimer l'âge de certains minéraux ou de fossiles à l'aide de la spectroscopie RPE [Hennig et al., 1983]. Le principe repose sur la quantification des entités paramagnétiques générées dans les minéraux par la radioactivité naturelle et du débit de dose des éléments radioactifs présents dans son environnement proche lors de son prélèvement. Enfin, la quantification des radicaux libres radio-induits a un intérêt tout particulier dans le domaine de la radioprotection de l'homme. Qu'il s'agisse d'accidents radiologiques lors de mauvais contrôles de routine, ou d'actes de malveillance par l'usage de substances radioactives, il est crucial d'estimer les doses reçues par les victimes et ce, le plus rapidement possible afin qu'elles bénéficient de soins adaptés.

Un point remarquable de cette technique associée aux accidents radiologiques est sa capacité à mesurer localement une dose contrairement aux techniques de cytogénétique par exemple qui permettent d'obtenir une dose moyenne reçue par l'organisme de la victime irradiée. En ce sens, la dosimétrie RPE est basée sur la quantification des effets radio-induits dans les tissus humains tels que l'émail dentaire, les tissus osseux et les phanères [Ciesielski et al., 2016, Romanyukha et al., 2014, Baffa et al., 2014, Ciesielski et al., 2011, Trompier et al., 2007, Ciesielski et al., 2007, Skvortsov et al., 2000, Souchkevitch et al., 1996]. Ces effets radio-induits se retrouvent sous une forme stable de radicaux libres et leur concentration varie en proportion avec la dose absorbée. Cette méthode d'analyse est applicable dans notre domaine d'expertise puisque les radicaux radio-induits sont à la fois stables dans le temps dans les tissus humains et leur nature est spécifique à l'irradiation. De plus, ces entités paramagnétiques ne sont pas affectées par d'autres effets physiques, chimiques ou biologiques tels que des chocs, brûlures, toxines ou infections.

Il est important de rappeler que pour qu'un matériau soit éligible à une dosimétrie par spectroscopie RPE, il doit être radiosensible (création de radicaux spécifiques aux rayonnements ionisants) et le signal radio-induit doit être suffisamment intense et stable sur une période relativement longue pour pouvoir être mesuré et ce, même plusieurs mois après l'accident. De précédentes études ont montré la robustesse de la dosimétrie RPE sur l'étude des doses reçues par la population lors de l'accident de Tchernobyl (RPE basée sur l'émail dentaire) [Souchkevitch et al., 1996], sur des patients traités en radiothérapie (RPE basée sur les tissus osseux et les dents) [Trompier et al., 2007] mais également sur des personnes fortuitement entrées en contact avec une source radioactive (RPE basée sur les dents, les tissus osseux et les ongles) [Trompier et al., 2014]. La précision et la fiabilité de cette méthode justifient le nombre croissant d'articles publiés dans ce domaine comme le montre la figure 9 où l'on constate clairement que des événements majeurs tels que l'accident de Tchernobyl en 1986 ou encore la possibilité accrue d'un terrorisme radiologique ont contribué à ce développement. De nombreux matériaux dosimètres potentiels provenant soit de la victime, soit de son environnement proche, ont d'ores et déjà été étudiés et sont répertoriés dans le tableau 1.

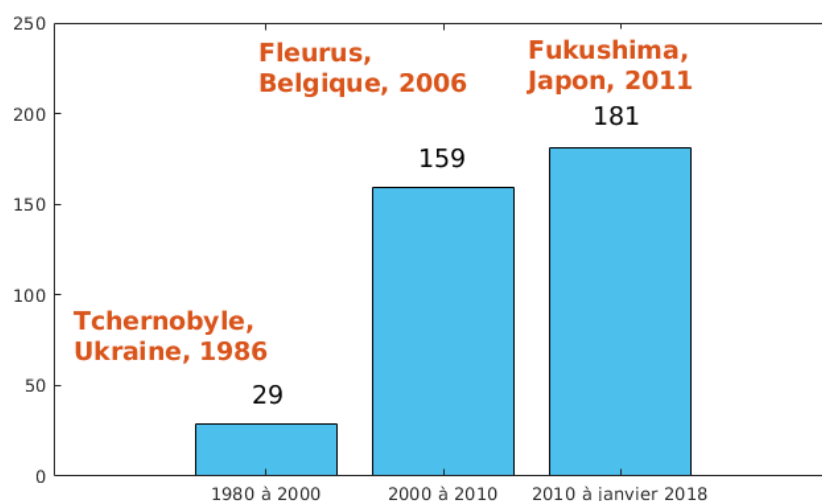


Figure 9 Nombre de publications dans le domaine de la dosimétrie RPE depuis 1980.

Source : <https://www.scopus.com/> (janvier 2018).

Tableau 1: Liste des différents matériaux potentiellement utilisables en dosimétrie RPE qui proviennent soit de l'environnement proche de la victime (matériaux inertes), soit d'elle-même (matériaux biologiques). Le symbole « - » signifie « aucune information dans la littérature ». Sources : Trompier et al., (2009) et Herve et al., (2006).

	Matériau	Domaine de linéarité de dose (Gy)	Radicaux UV-induits	Stabilité du signal radio- induit (20 °C)
Matériaux biologiques	Émail dentaire	10^{-2} à 10^4	Oui	Stable
	Os	$5 \cdot 10^{-1}$ à 30	Non	Stable
	Cheveux	Non linéaire	Oui	Instable
	Ongles	5 à 100	-	Instable
Matériaux inertes	Coton	10 à 10^4	-	Instable
	Laine	Peu radiosensible	Oui	-
	Cuir	10 à 150	-	Instable
	Bois	10 à 150	-	Instable
	Carte de crédit	10 à 150	Oui	Instable
	Sucre	$5 \cdot 10^{-1}$ à 75	Oui	Instable
	Verre	$5 \cdot 10^{-1}$ à 100	Oui	Instable
	Plastique	Dépend de sa nature	Oui	Instable

3.3 L'évolution de la dosimétrie RPE

Les débuts de la dosimétrie RPE datent du milieu du 20^e siècle lorsque les premiers signaux d'acides aminés, de protéines, et de tissus osseux irradiés ont été enregistrés par Gordy et al., (1958). Quelques années plus tard, Bradshaw et al., (1962) ont publié des résultats liés au domaine de la dosimétrie RPE et axés sur l'alanine. Ce matériau a gagné en popularité notamment depuis les travaux publiés au début des années 80 par Regulla et al., (1982) et il figure depuis parmi les dosimètres RPE les plus fiables et les plus radiosensibles. Les dosimètres d'alanine sont commercialisés sous forme de petites pastilles ou de bâtonnets et sont très largement utilisés dans divers domaines tels que l'industrie, la médecine et la recherche (figure 10). En métrologie d'ailleurs, les industriels ont très souvent recours à ce

type de dosimètres réputés pour la relation linéaire entre la quantité de radicaux libres radio-induits et la dose absorbée [Desrosiers, 2014].



Figure 10 Dosimètre alanine utilisé en spectroscopie RPE. Image : IRSN.

En 1965, Swartz a montré, sur la base de ses expériences portant sur des rats irradiés, que les mesures RPE de petits morceaux d'os permettent d'estimer, rétrospectivement, la dose absorbée de rayonnements ionisants [Swartz et al., 1965]. La première observation de signaux RPE dans des dents irradiées a été rapportée par Cole et Silver, (1963). L'utilisation des signaux RPE radio-induits dans les dents à des fins dosimétriques a finalement été proposée par Brady et al., (1968). Actuellement, l'émail dentaire est considéré par la communauté des dosimétristes RPE comme le meilleur matériau dosimètre biologique. Ses principaux avantages sont la possibilité de détecter de très faibles doses (20 - 50 mGy) et la stabilité à très long terme des radicaux CO_2^- radio-induits. En effet, les radicaux formés sont très stables (sur plusieurs dizaines d'années) dans des conditions in-vivo et étant donné que l'émail dentaire est un matériau inerte, la dose mesurée correspond à la dose totale cumulée. Il a ainsi été possible d'estimer des doses pour les survivants d'Hiroshima et de Nagasaki, plusieurs décennies après leur exposition [Ikeya et al., 1993 & 1984] ou pour les populations ayant résidé dans les territoires contaminés suite à l'accident de Tchernobyl [Ivannikov et al., 2004]. Dans des conditions ex-vivo, la demi-vie des radicaux dans l'émail a été estimée à 10^7 années à 25 °C, ce qui constitue un véritable atout notamment pour l'utilisation des techniques RPE dans la datation archéologique [Kerber et al., 2011, Fattibene et al., 2010, Skvortzov et al., 1995, Schwarcz et al., 1994].

Les os étant un tissu vivant en constante évolution, il est difficile d'estimer le taux de perte des radicaux dû à l'activité permanente de renouvellement tissulaire. En condition *ex-vivo*, les radicaux formés dans les tissus osseux sont considérés comme très stables et sont également utilisés en datation. Cependant, les limites de détection pour les os sont bien plus élevées que pour l'émail (de l'ordre de quelques Gy). Toutefois, si l'on regarde la littérature, ce sont bien les tissus osseux qui ont été les plus souvent utilisés pour l'estimation de dose en cas d'irradiation accidentelle. Cependant, il est généralement compliqué de réaliser des prélèvements sur une personne souffrant d'un syndrome d'irradiation aiguë. Ainsi, l'acte de dosimétrie RPE a souvent été réalisée sur prélèvements osseux issus des déchets opératoires notamment après amputation. De ce fait, les doses estimées permettaient soit de confirmer le niveau d'exposition, soit d'évaluer la dose au niveau de la coupe et de prédire l'apparition d'éventuelles complications radio-induites tardives.

La limitation majeure de la dosimétrie RPE sur les matériaux biologiques réside notamment dans le caractère invasif de la collecte des échantillons (qui n'est d'ailleurs pas toujours réalisable). C'est pourquoi l'IRSN a développé des techniques de dosimétrie utilisant la spectroscopie RPE en bande Q (cet aspect sera détaillé dans le chapitre « III État de l'art en spectroscopie RPE des ongles »), ce qui permet de mesurer avec une plus grande sensibilité des échantillons de faibles masses, permettant ainsi de minimiser la taille des prélèvements. Ainsi, des échantillons de seulement quelques milligrammes sont suffisants, ce qui a permis à l'IRSN de réaliser une dizaine d'expertises depuis 2011 sur de l'émail dentaire. Ces expertises auraient été impossibles à mener avec la technique classique utilisant la spectroscopie RPE conventionnelle en bande X. Il a également été possible de déterminer des gradients de dose, en bande Q, sur des prélèvements de phalanges amputées alors qu'en bande X, l'intégralité de la phalange aurait été nécessaire et n'aurait permis d'estimer qu'une dose moyenne.

L'utilisation de spectromètres RPE en bande Q en dosimétrie étant très peu répandue, de nombreux chercheurs ont étudié des méthodes basées sur des mesures d'échantillons biologiques plus accessibles, comme les cheveux ou les ongles par exemple et qui pourraient être utilisés plus facilement en cas d'accident. Ce dernier point explique notamment l'intérêt croissant des chercheurs à l'égard de la potentialité de ces matériaux en tant que potentiels

bio-dosimètres. De plus, en considérant l'utilisation de la bande Q pour la mesure des ongles, il est possible d'obtenir une cartographie de la dose aux extrémités car les masses requises sont bien plus faibles qu'en bande X. Des premières tentatives réussies de dosimétrie RPE rétrospective sur les ongles ont d'ores et déjà été publiées [Trompier et al., 2014, Romanyukha et al., 2014], mais les protocoles utilisés restent très expérimentaux et doivent être améliorés. De plus, les méthodes mises au point sont, pour le moment, limitées aux doses supérieures à 10 Gy. D'autres approches pourraient être développées pour permettre d'estimer de plus faibles doses de l'ordre du gray. Les ongles seront décrits histologiquement et biologiquement dans le chapitre suivant. Il en sera de même pour les signaux RPE qui leur sont associés.

Le caractère non-invasif du prélèvement des échantillons d'ongles présente un avantage indéniable qui explique l'intérêt des chercheurs pour une potentielle application dosimétrique, et qui justifie la poursuite des études dans ce domaine. Le développement d'une méthode optimisée, fiable et robuste de dosimétrie rétrospective sur les ongles constitue un véritable défi que nous tentons de relever.

4 L'application de la spectroscopie RPE sur les ongles

4.1 L'étude des ongles en spectroscopie RPE

Si l'utilisation des ongles en dosimétrie RPE présente de nombreux avantages (facilité de prélèvement, cartographie de la dose aux extrémités), l'analyse des spectres RPE n'en demeure pas moins complexe et de nombreux paramètres influent sur la production et la stabilité des radicaux mesurés. L'objet de cette partie est d'illustrer cette complexité avec une approche volontairement simplifiée pour que le lecteur puisse intégrer la problématique du sujet sans pour autant maîtriser les bases de la spectroscopie RPE. Une caractérisation spectrale plus détaillée de l'ensemble des signaux observables dans les ongles sera présentée dans le chapitre suivant.

Un spectre RPE d'un ongle irradié et fraîchement prélevé chez un individu présente une multitude de signaux superposés les uns aux autres et dont les mécanismes de formation diffèrent (figure 11).

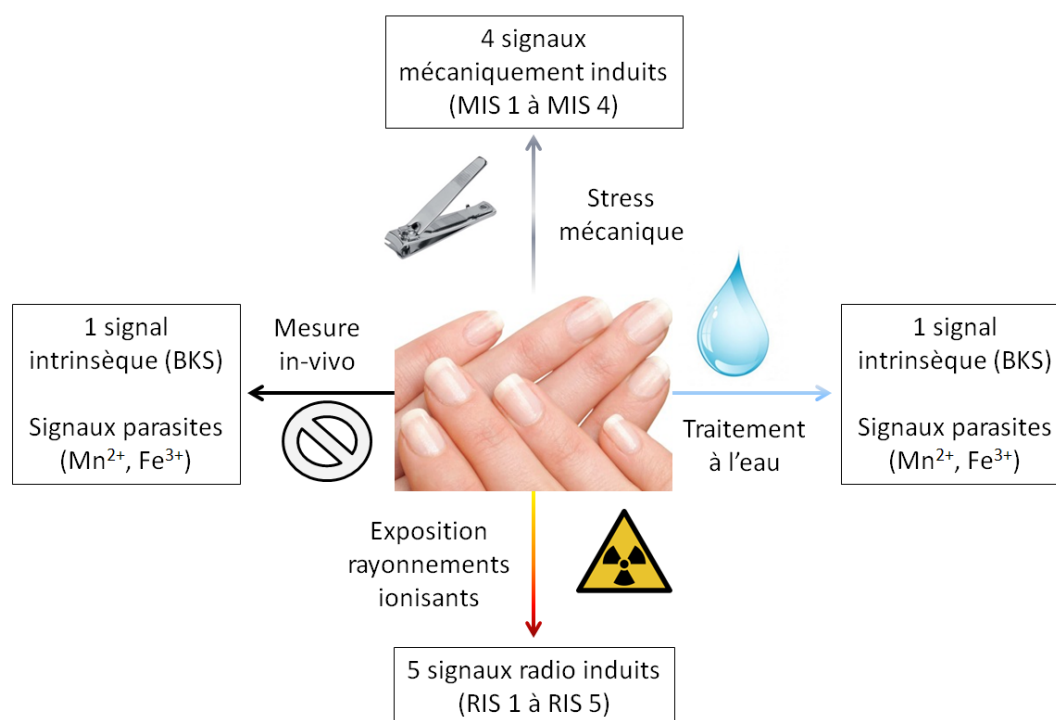


Figure 11 Origine des signaux RPE observables dans les ongles.

Voyons ici une liste non exhaustive de l'ensemble des signaux potentiellement observables :

- **Un signal intrinsèque ou endogène.** Dans la littérature, ce signal est nommé « Background Signal » ou *BKS* [Trompier et al., 2014]. Cependant, la nature radicalaire du signal endogène reste encore indéterminée. Le *BKS* est thermiquement stable et il présente également une spécificité qui lui est propre et qui demeure rare en spectroscopie RPE : son intensité est minimale après humidification dans l'eau distillée puis elle augmente d'un facteur 2 à 3 au cours des jours suivants et ce, de manière reproductible [Zhang et al., 2016, Reyes et al., 2008]. Les disparités concernant la hausse de ce signal seraient liées aux propriétés intrinsèques des ongles telles que la variabilité inter-individu de la composition biochimique, la taille des échantillons, l'humidité intrinsèque... ;
- **Quatre signaux mécaniquement induits.** Dans la littérature, la nomenclature utilisée est *MIS* pour « Mechanical Induced Signals » [Trompier et al., 2014]. L'ensemble de ces signaux sont instables et assujettis à une forte décroissance en intensité au cours du temps [Trompier et al., 2014, Wilcox et al., 2010, Reyes et al., 2008, Sevilla et al., 1987, 1988]. Ces signaux ne constituent pas de problème majeur en dosimétrie RPE puisqu'un simple traitement des échantillons dans de l'eau distillée suffit pour les éliminer ;
- **Cinq signaux radio-induits,** nommés « Radio Induced Signals » ou *RIS* dans la littérature [Trompier et al., 2014]. L'apparition de ces signaux dépend de la dose absorbée par l'échantillon et dans la gamme de dose qui nous intéresse, à savoir entre 0 et 100 Gy, seuls deux signaux sont observables : le *RIS* 2 et 5. L'ensemble de ces signaux sont instables et également assujettis à une forte décroissance en intensité au cours du temps hormis le *RIS* 5 qui est stable est résistant à l'eau. Il est important de préciser qu'à l'instar du signal endogène, l'origine radicalaire du *RIS* 5 est encore indéterminée ;

- **Plusieurs signaux parasites intrinsèques** qui ne sont pas générés par les mécanismes de stress mécanique ou d'irradiation cités précédemment [Trompier, 2012]. Parmi ces signaux, on retrouve principalement du manganèse sous forme Mn^{2+} , du fer Fe^{3+} mais également d'autres éléments sous forme de traces tels que le cuivre et le nickel. Les intensités spectrales relatives à ces éléments diffèrent néanmoins d'un individu à l'autre et ne présentent pas d'intérêt majeur dans le cadre de la dosimétrie RPE des ongles si ce n'est le manganèse qui pourrait jouer le rôle d'étalon interne pour la caractérisation des facteurs g qui seront définis dans le chapitre suivant.

Ainsi, le spectre RPE d'un échantillon d'ongle fraîchement prélevé et irradié présente une multitude de signaux dont la plupart sont instables. En revanche, pour s'affranchir de cette complexité spectrale, un simple pré-traitement des ongles dans de l'eau distillée est suffisant pour isoler les composantes stables, à savoir le signal endogène (*BKS*) et le signal radio-induit stable (*RIS 5*) comme le montre le schéma 12.

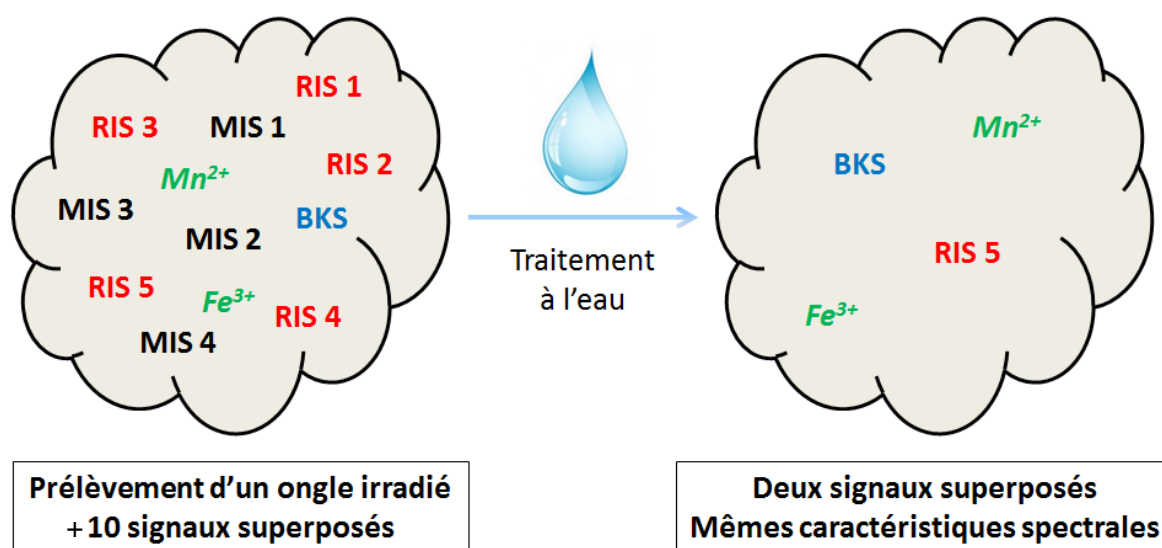


Figure 12 Impact de l'eau distillée sur les signaux RPE observables dans les ongles.

La problématique réside dans le fait qu'une fois les signaux instables éliminés, le spectre RPE résultant est composé de deux signaux RPE superposés ayant des caractéristiques spectrales identiques mais dont la nature des radicaux n'est pas établie et dont les processus de formation diffèrent : le signal endogène (*BKS*) fortement variable en intensité, et un signal radio-induit stable (*RIS 5*) dont l'intensité est très faible par rapport à celle du *BKS*. Par conséquent, un des enjeux de cette thèse réside dans la caractérisation des entités paramagnétiques associées à ces signaux afin de développer des méthodes de discrimination des différentes composantes du spectre pour permettre l'extraction de l'information dosimétrique.

Toujours est-il, de nombreux protocoles en dosimétrie RPE ont tout de même vu le jour au cours de ces 10 dernières années [Sholom et al., 2016, Choi et al., 2014, Trompier et al., 2014, Romanyukha et al., 2014, He et al., 2014, Trompier et al., 2007]. Parmi l'ensemble de ces protocoles, la plupart utilisent la composante instable du signal radio-induit, le *RIS 2*. Seulement, étant donné qu'un simple lavage des mains de la victime suffit pour éliminer ce signal, on comprend que l'application de tels protocoles n'est malheureusement pas réalisable en situation réelle d'accident radiologique.

À ce jour, il n'existe qu'un seul protocole de dosimétrie RPE basé sur la composante radio-induite stable, le *RIS 5*, développé par l'IRSN en 2014 [Trompier et al., 2014] et qui a permis d'estimer les doses reçues par six victimes d'accidents radiologiques (Tunisie en 2008, Gabon en 2010, USA en 2011 et Pérou en 2012) [Trompier et al., 2014]. Ce protocole de dosimétrie RPE permet l'estimation de fortes doses, généralement plusieurs dizaines de grays et ce, en plusieurs jours ce qui constitue une de ses limites. De plus, à ce jour, aucun protocole robuste ne permet d'estimer de plus faibles doses, typiquement entre 0 et 10 Gy.

En résumé, dans l'intervalle de dose qui nous intéresse, à savoir entre 0 et 100 grays, de nombreux signaux RPE se superposent :

- Un signal endogène (*BKS*) dont l'intensité semble liée au taux d'humidité de l'échantillon d'ongle ;
- Quatre signaux mécaniquement induits (*MIS 1* à *MIS 4*) qui ne constituent pas réellement de problème en dosimétrie RPE puisqu'un simple traitement des échantillons dans de l'eau permet de les éliminer ;
- Un signal radio-induit (*RIS 2*) très intense mais instable et dont l'intensité décroît très rapidement dans le temps si l'échantillon est conservé à l'air libre. De plus, un simple lavage des mains de la victime est suffisant pour l'éliminer ;
- Un signal radio-induit (*RIS 5*) de faible intensité mais qui est résistant à l'eau et dont l'information dosimétrique est pérenne dans le temps ;

Ainsi, le problème majeur de la dosimétrie RPE des ongles réside dans le fait que l'ensemble de ces signaux se superposent et que les protocoles génériques de dosimétrie ne sont pas applicables.

Cependant, l'IRSN a développé en 2014 un protocole de dosimétrie RPE original basé sur le signal radio-induit *RIS 5* et qui a permis d'estimer les doses reçues par trois victimes d'accident radiologique [Trompier et al., 2014]. Ce protocole permet l'estimation des fortes doses, plusieurs dizaines de grays, mais est incompatible avec les plus faibles comprises entre 0 et 10 Gy. Toutefois, les délais d'expertise étant relativement longs, il est nécessaire d'optimiser ce protocole et de le valider.

4.2 Les difficultés liées à l'analyse des spectres RPE des ongles

Lorsqu'on fait l'acquisition d'un spectre RPE d'un échantillon d'ongle, on remarque immédiatement le faible rapport signal sur bruit de la mesure (figure 13).

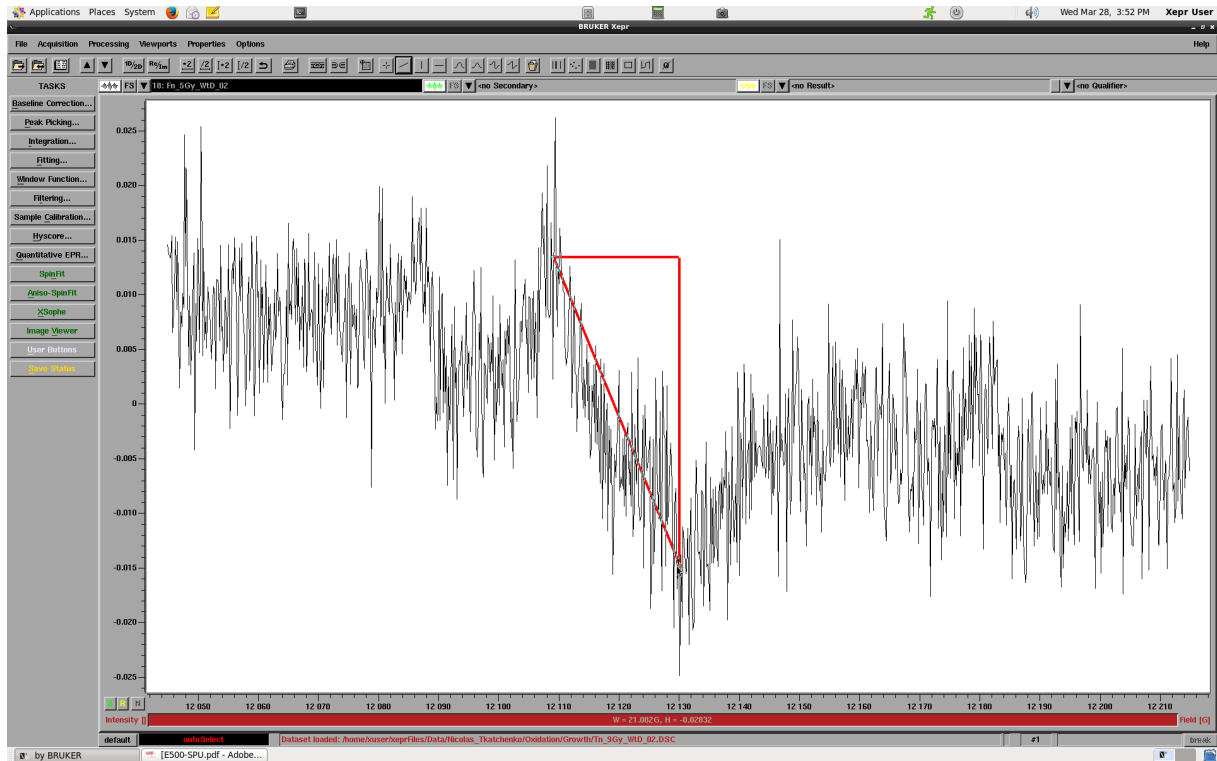


Figure 13 Capture d'écran d'un spectre RPE d'un échantillon d'ongle obtenu à l'aide du logiciel X-EPR du fabricant Bruker.

En réalité, un spectre RPE quel qu'il soit n'est autre qu'une succession de points ou de couples « abscisse / ordonnée ». À chaque abscisse, i.e valeur du champ magnétique, est associée une ordonnée, i.e valeur d'absorption, affectée d'un bruit aléatoire. Ainsi, le véritable spectre que nous devrions observer est présenté dans la figure 14.

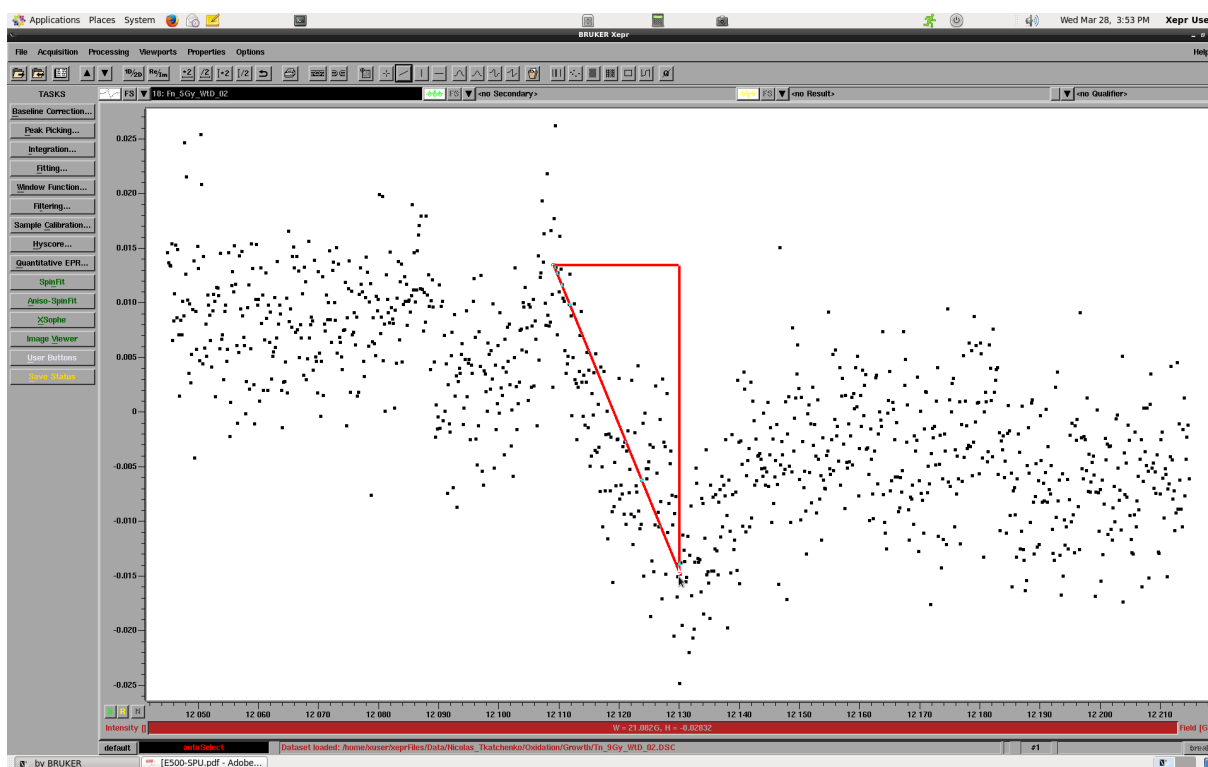


Figure 14 Capture d'écran de la véritable représentation du spectre RPE d'un échantillon d'ongle.

Dès lors, on comprend que toute tentative d'extraction de paramètres (intensité, amplitudes, largeurs de raies, paramètres spectraux...) risque d'être peu reproductible et souvent fastidieuse. Pour mesurer l'intensité d'un signal par exemple (en rouge sur les figures 13 et 14), il y a deux possibilités :

1. La nature du radical est connue. Dans ce cas, il est nécessaire de faire appel à des outils numériques tels que Easyspin [Stoll & Schweiger, 2006] ou WinSim [Duling et al., 1994] par exemple, pour simuler le spectre RPE théorique du système étudié et travailler directement sur ce modèle. Ces outils de simulation spectrale seront discutés dans le chapitre suivant ;
2. La nature du radical n'est pas connue. Dans ce cas, il n'y a d'autres choix que de traiter directement le spectre RPE acquis soit à l'aide du logiciel commercial (développé par le fabricant du spectromètre), soit en exportant les données du spectre RPE et de les manipuler à l'aide de programmes gérant tous types de données numériques (Microsoft Excel, Matlab...).

Dans le cadre d'une collaboration avec l'IRCP de Chimie-ParisTech, nous nous sommes intéressés à l'analyse de telles données discrètes et avons identifié deux problèmes majeurs :

- D'une part, nous avons constaté que la majorité de la communauté RPE travaillait fréquemment (et sans forcément le savoir) sur des spectres RPE pré-traités numériquement par les logiciels « clefs en main » fournis par le fabricant du spectromètre. Rares sont les études qui portent directement sur les données brutes. De plus, ces pré-traitements « par défaut » ne sont généralement pas optimisés ;
- D'autre part, le traitement de données discrètes et bruitées constitue une véritable source de variabilité inter-opérateur dans les extractions de paramètres RPE (intensités, amplitudes, paramètres spectraux...). Le bruit aléatoire qui s'ajoute au signal affecte les mesures et doit nécessairement être pris en compte.

De multiples questions peuvent être ainsi légitimement posées, ce qui a été mon cas dans le cadre de ce travail de thèse. Par exemple, quel point correspond au mieux à mon maximum spectral ? Faut-il que je moyenne la valeur maximale de mon spectre avec les valeurs adjacentes ? Comment traiter les zones où il n'y a pas de points échantillonnés ? Dois-je faire une interpolation linéaire entre ces points, comme présenté dans la figure 13 et qui est par défaut dans les logiciels du fabricant ? Comment le bruit généré par le spectromètre RPE affecte-t-il mes mesures et donc mes résultats ? Et cette liste de questions est loin d'être exhaustive. Toutes ces interrogations ont comme point commun de traiter des données brutes discrètes et bruitées.

On observe en pratique que chaque laboratoire développe ses bonnes pratiques d'analyse qui peuvent être très différentes d'un laboratoire à un autre. En ce sens, on comprend l'approche des fabricants de spectromètres : créer une recette générale pour unifier les bonnes pratiques d'analyse. Seulement, la généralisation de tels pré-traitements numériques a donné l'illusion aux utilisateurs que les spectres qu'ils obtenaient étaient les spectres bruts.

L'approche qui est développée dans cette thèse est la suivante : avoir accès aux données brutes puis proposer une méthode standardisée de débruitage et d'extraction des variables d'intérêt en s'affranchissant de l'aspect discret des données. Il est important de noter que l'utilisateur peut avoir accès à ses données brutes à tout moment. Dans le chapitre « V Développement d'un nouveau protocole pour le traitement numérique des spectres RPE », cette méthode d'analyse originale sera présentée avec notamment des exemples concrets.

Dans un souci de standardisation des résultats RPE d'abord au sein d'un même laboratoire puis, idéalement, à l'échelle internationale, les outils développés dans le cadre de ce travail de thèse vont permettre d'extraire les variables d'intérêt de manière fiable, rapide, robuste et surtout, indépendamment de l'opérateur. Ces outils seront présentés dans le chapitre « III État de l'art en spectroscopie RPE des ongles » et « V Développement d'un nouveau protocole pour le traitement numérique des spectres RPE ».

5 Les principaux objectifs du travail de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la gestion de situations d'urgence liées aux accidents radiologiques faisant suite à une exposition fortuite à des rayonnements ionisants. Ces situations peuvent impliquer à la fois des personnes du public, du personnel médical ou des ouvriers de l'industrie et nécessitent une estimation rapide et fiable de la sévérité de l'exposition afin de mettre en œuvre les stratégies thérapeutiques adaptées.

Afin de réaliser une étude dosimétrique précise et rapide des personnes exposées localement, la dosimétrie par spectroscopie RPE semble être la technique la plus efficace. Afin de rendre cet outil dosimétrique suffisamment robuste, un certain nombre d'investigations sont encore nécessaires, notamment pour pallier les exigences en termes de capacité de mesure et du délai des expertises.

Dans le cadre de la dosimétrie d'accident radiologique conventionnel où l'estimation des doses est souvent réalisée plusieurs semaines après l'irradiation, le recours à la spectroscopie RPE de prélèvements d'ongles est cohérent. En effet, ce matériau a la faculté de conserver une information dosimétrique stable et ce, sur plusieurs mois. Contrairement aux tissus osseux ou à l'émail dentaire, les ongles sont facilement récupérables et disponibles sur la grande majorité des individus exposés. De plus, les ongles permettent de réaliser une cartographie des doses dans le cas d'une irradiation localisée au niveau des mains. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour caractériser les limites de détection en dose compatibles avec les exigences médicales.

L'objectif principal de cette thèse consiste à caractériser les signaux RPE des ongles, à établir leur mécanisme de formation qu'ils soient endogènes ou radio-induits afin de pouvoir proposer ou d'optimiser des protocoles et des procédures opérationnels ainsi que des recommandations concernant les étapes allant du prélèvement jusqu'à l'estimation dosimétrique.

En ce sens, il conviendra de :

- caractériser entièrement le signal endogène et notamment l'influence des paramètres extérieurs (nature radicalaire, température, humidité, exposition UV, ...) ;
- mener une étude détaillée des propriétés dosimétriques, que ce soit l'impact des conditions de l'irradiation, la variabilité inter-donneur et les traitements chimiques qui pourraient apporter une amélioration ;
- proposer une nouvelle procédure d'estimation des doses, notamment les plus faibles, c'est-à-dire entre 0 et 10 Gy, qui n'a actuellement jamais été validée. Les protocoles établis devront présenter le meilleur compromis entre les exigences des situations d'urgences évoquées (délais, nombre d'échantillons), les caractéristiques des échantillons (perte de signal, variabilité inter-échantillons, limite de détection) et la précision requise de l'évaluation dosimétrique.
- développer un outil numérique pour optimiser le traitement des spectres RPE et récupérer les informations de manière fiable, robuste, précise et si possible, indépendantes des opérateurs.

Ce 1^{er} chapitre a consisté en une introduction qui permet de situer le domaine de recherche dans lequel s'inscrit le sujet de thèse à savoir la dosimétrie d'accidents radiologiques par spectroscopie RPE sur les ongles des victimes. L'objectif a été de sensibiliser le lecteur au domaine de la radioprotection et de l'informer sur l'état de l'art concernant l'utilisation des ongles en dosimétrie RPE.

Le chapitre suivant présente les généralités sur le paramagnétisme et la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. Une description des différents dispositifs expérimentaux utilisés pour mener à bien ce travail a également été présentée. Une revue des principales propriétés de l'ongle d'un point de vue histologique et biochimique est également donnée dans ce chapitre.

Le chapitre IV a pour objectif de présenter les résultats d'une étude multi-paramétrique sur les signaux endogènes et radio-induits. L'intérêt d'une telle étude est, in fine, la création ou l'optimisation de protocole de dosimétrie RPE fiable, rapide et robuste.

Le chapitre V présente une étude détaillée du protocole numérique permettant d'extraire les variables d'intérêt d'un spectre RPE et de réduire le bruit dans un souci de diminution des incertitudes de mesures et, en conséquence, des doses estimées.

Contexte et objectifs du travail de thèse

*III. État de l'art en spectroscopie RPE
des ongles*

Chapitre III

État de l'art en spectroscopie RPE des ongles.....41

1 Introduction.....	43
2 Le magnétisme et les entités paramagnétiques.....	44
2.1 Les bases du magnétisme.....	44
2.2 Les radicaux libres.....	45
3 La spectroscopie de résonance paramagnétique (RPE).....	48
3.1 Les bases théoriques de la spectroscopie RPE.....	48
3.2 Les principaux éléments d'un spectromètre RPE.....	58
3.3 Les paramètres d'acquisition.....	61
3.4 La dosimétrie par spectroscopie RPE.....	64
4 La caractérisation des ongles.....	65
4.1 Une description histologique et biochimique des ongles.....	65
4.2 L'étude des ongles en spectroscopie RPE.....	68
5 Les dispositifs d'irradiation à l'IRSN.....	81
6 Le choix des outils de traitement des spectres RPE.....	82
6.1 Les logiciels de simulation spectrale.....	82
6.2 L'outil de traitement numérique <i>Chebfun</i>	84

1 Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons défini le contexte de l'étude menée, à savoir la gestion de victimes d'accident radiologique localisé au niveau des mains. L'apport de la spectroscopie de RPE dans de nombreux champs d'application, dont la dosimétrie des rayonnements ionisants, a également été mis en avant.

Dans ce présent chapitre, les bases du magnétisme et les propriétés des entités paramagnétiques, principalement les radicaux libres, seront abordées en premier lieu.

Nous verrons ensuite les principaux éléments théoriques et instrumentaux permettant de se familiariser avec la technique de spectroscopie RPE conventionnelle.

Une description histologique et biologique des ongles sera également fournie dans le but d'en apprendre davantage sur ce potentiel bio-dosimètre très particulier.

Il a également été rappelé dans le chapitre précédent que le traitement des données RPE était opérateur-dépendant et pouvait constituer ainsi une source indéniable de variabilité dans les résultats dosimétriques inter-laboratoires. Ainsi, dans l'optique de développer un nouvel outil numérique capable de traiter automatiquement les spectres RPE et ce, de manière rapide, fiable et robuste, nous présenterons ici les deux « toolbox » développés sous Matlab que nous avons choisies pour développer notre outil de traitement spectral, à savoir Easyspin et Chebfun, qui comme nous le verrons par la suite, s'avèrent très utiles.

2 Le magnétisme et les entités paramagnétiques

2.1 Les bases du magnétisme

La plupart des matériaux qui nous entourent acquièrent un moment magnétique lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique intense. Selon leurs propriétés magnétiques intrinsèques, ils se comportent différemment avec celui-ci. On distingue ainsi trois principaux types de matériaux : les diamagnétiques, les ferromagnétiques et les paramagnétiques.

2.1.1 Les matériaux diamagnétiques

Dans ce type de matériaux, les électrons sont tous appariés par paires selon le principe d'exclusion de Pauli et par conséquent, le spin électronique résultant du système est nul ($S_{tot}=0$). La susceptibilité magnétique X qui leur est associée est faible, négative (entre -10^{-5} et -10^{-6}) et indépendante de la température. Cette variable, sans dimension, est caractéristique du degré de magnétisation du matériau lorsque celui-ci est soumis à un champ magnétique extérieur. Elle est définie ainsi :

$$X = \frac{m}{B} \quad (1)$$

Où m est l'aimantation magnétique ($A.m^{-1}$) du matériau et B le champ magnétique ($A.m^{-1}$).

Ainsi, lorsqu'un système diamagnétique est soumis à un champ magnétique extérieur, il aura tendance à créer en réponse un faible champ magnétique opposé à celui-ci.

2.1.2 Les matériaux ferromagnétiques

Le ferromagnétisme caractérise les matériaux qui possèdent un moment magnétique non nul même en l'absence de champ magnétique extérieur. Les moments magnétiques des électrons du système sont ordonnés créant ainsi une forte capacité à s'aimanter lorsque le matériau est soumis à un champ magnétique. Qui plus est, cette aimantation persiste même après la disparition du champ extérieur. Ce type de matériaux forment des aimants permanents.

2.1.3 Les matériaux paramagnétiques

Contrairement aux systèmes diamagnétiques dont le spin électronique total est nul et la susceptibilité magnétique négative, il en est l'exact contraire pour les matériaux paramagnétiques. En effet, ceux-là possèdent à la fois un spin électronique global non nul et une susceptibilité magnétique positive. La présence d'électrons non appariés est à l'origine d'un dipôle intrinsèque permanent. Cependant, si le système possède plusieurs électrons non appariés, les dipôles n'interagissent pas entre eux et les spins électroniques s'orientent aléatoirement dans toutes les directions de l'espace à cause de l'agitation thermique. Le spin résultant est par conséquent nul. A contrario, lorsque ce type de système est soumis à un champ magnétique extérieur intense, les moments magnétiques électroniques vont s'orienter soit parallèlement, soit anti-parallèlement par rapport à celui-ci. Le matériau agit comme un aimant attiré par le champ magnétique. Contrairement aux matériaux ferromagnétiques, les systèmes paramagnétiques ne conservent pas leur aimantation en l'absence de champ extérieur.

2.2 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui possèdent au moins un électron non apparié. À ce titre, ils appartiennent à la famille des matériaux paramagnétiques. Ils peuvent être formés de différentes façons telles que les traitements chimiques, le chauffage, l'exposition à la lumière (UV), le stress mécanique (contrainte, broyage) et l'irradiation aux rayonnements ionisants (rayons γ , X, e^- ...). La plupart des radicaux libres sont instables et leur durée de vie est très courte. Ainsi, ils n'existent principalement qu'en tant que molécules intermédiaires dans des réactions chimiques. En effet, lorsque la couche électronique supérieure d'un atome ou d'une molécule est incomplète, l'atome tente soit de gagner, soit de perdre des électrons afin de redevenir stable. Fort heureusement, il existe tout de même des radicaux libres piégés dans certains échantillons qui sont stables et dont la durée de vie est suffisante pour les étudier par spectroscopie RPE. Nous allons voir ici quelques généralités les concernant.

Une liaison covalente est constituée d'une paire d'électrons appariés dont les spins électroniques sont opposés selon le principe d'exclusion de Pauli. Lors de la rupture d'une telle liaison, chaque fragment récupère avec lui un électron dit célibataire (2).



Les fragments moléculaires possédant un électron non apparié sont appelés radicaux libres et sont notés $R^{\bullet}$. Ces molécules sont très réactives du fait de leur instabilité liée à la présence de cet électron célibataire. Ces radicaux peuvent ensuite réagir entre eux ou avec d'autres molécules pouvant conduire à des réactions d'addition (réaction 3 du tableau 2) par exemple.

Les rayonnements ionisants peuvent également réagir directement avec les molécules d'eau du milieu biologique. Ces interactions conduisent au phénomène de la radiolyse de l'eau et à la création de radicaux libres très réactifs de types $H^{\bullet}$ et $HO^{\bullet}$. Ces radicaux vont pouvoir se recombiner entre eux pour former à leur tour de nouvelles molécules (eau H_2O , eau oxygénée H_2O_2 , dihydrogène H_2). La probabilité de recombinaison dépend notamment de la distance qui sépare les radicaux entre eux. Elle sera ainsi plus importante dans des zones de forte densité de radicaux et à l'inverse, plus rare lorsqu'ils sont très espacés. Cependant, les radicaux diffusent au cours du temps et peuvent également interagir avec d'autres molécules du milieu biologique entraînant leur modification chimique. Voici une liste non exhaustive des réactions susceptibles d'avoir lieu sur une molécule organique de type $R-H$ (tableau 2) :

- Hydroxylation par les radicaux $HO^{\bullet}$ (réaction 4) ;
- Déshydrogénation et composés d'addition par les radicaux $H^{\bullet}$ (réaction 5) ;
- Captures des $H^{\bullet}$ par le dioxygène ou les radicaux $HO^{\bullet}$ (réaction 6) ;
- Réactions en chaîne (réaction 7) ;
- Réactions avec des radio-protecteurs tels que les groupements SH ou NH_2 (réaction 8) ;
- Formations de peroxydes (réaction 9).

Notons que les hydroperoxydes et les peroxydes sont des substances toxiques qui s'accumulent au cours de l'irradiation et ajoutent leurs lésions à celles dues aux rayonnements ionisants.

Tableau 2 : Les différents mécanismes radicalaires susceptibles d'avoir lieu lors d'une interaction d'un rayonnement ionisant avec un milieu biologique.

Réaction radicalaire	Mécanisme réactionnel	
Addition	$R^{\bullet} + R''^{\bullet} \rightarrow R-R''$	(3)
Hydroxylation	$R-H + HO^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$ $R^{\bullet} + HO^{\bullet} \rightarrow R-OH$	(4)
Déshydrogénation	$R-H + H^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + H_2$ $R^{\bullet} + R'^{\bullet} \rightarrow R-R'$	(5)
Capture	$H^{\bullet} + O_2 \rightarrow H_2O^{\bullet}$ $H^{\bullet} + HO^{\bullet} \rightarrow H_2O$	(6)
Réactions en chaîne	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ (radical peroxyde) $ROO^{\bullet} + R'H \rightarrow ROOH + R'^{\bullet}$ (hydroperoxyde) $R'^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet} \dots$	(7)
Réactions avec des radio-protecteurs	$RSH + HO^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + H_2O$	(8)
Formations de peroxydes	$ROO^{\bullet} + R' \rightarrow ROOR'$	(9)

3 La spectroscopie de résonance paramagnétique (RPE)

3.1 Les bases théoriques de la spectroscopie RPE

La spectroscopie RPE est une technique qui permet de sonder un matériau paramagnétique et d'obtenir de précieuses informations sur la nature et la quantité de radicaux qu'il possède, ainsi que leur environnement chimique [Bertrand, 2010]. La spectroscopie RPE en onde continue consiste à irradier continuellement un échantillon paramagnétique à l'aide d'un rayonnement micro-onde de faible intensité dans le but d'observer les transitions entre spins électroniques propres au système étudié. Le principe de l'imagerie par spectroscopie RPE est présentée en annexe « 1.4 L'imagerie 2D par spectroscopie RPE ».

3.1.1 L'effet Zeeman

L'image très simpliste d'un électron libre est celle d'une petite sphère chargée négativement et en rotation sur elle-même et possédant un moment cinétique intrinsèque, le spin électronique $\vec{s}$. Toute particule chargée possédant un moment cinétique possède également un moment magnétique intrinsèque défini tel que :

$$\vec{\mu} = -g\beta\vec{s} \quad (10)$$

Où $\vec{s}$ est le spin électronique, g le facteur de Landé (nombre sans dimensions) et β le magnéton de Bohr qui correspond au moment de spin d'une mole d'électrons. La projection du spin électronique $\vec{s}$ sur un axe quelconque d'un référentiel orthonormé (x, y, z) peut prendre l'une des $(2S + 1)$ valeurs M_S telles que :

$$M_S \in [-S; +S] = -S, -S+1, \dots, +S \quad (11)$$

Lorsque l'électron est soumis à un champ magnétique extérieur $\vec{B}$, son énergie E est décrite par la relation suivante :

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (12)$$

À titre d'exemple, prenons le cas simple d'un système de spin électronique $S=1/2$ et défini par un ensemble de N centres paramagnétiques possédant chacun un électron non-apparié. En l'absence de champ magnétique extérieur, les électrons libres se trouvent à un niveau énergétique fondamental noté E_0 . Les spins du système étant orientés aléatoirement

dans toutes les directions de l'espace (figure 15), la somme vectorielle de tous les moments magnétiques électroniques est nulle : $\sum_{i=1}^N \vec{\mu}_i = \vec{0}$. En revanche, lorsqu'on applique un champ magnétique intense, chaque spin électronique peut occuper l'un des $(2S+1)=2$ états énergétiques quantiques m_s définis en 11 soit, dans notre cas simple, $m_s = \pm 1/2$. L'état quantique défini par $m_s = +1/2$ correspond à l'état le moins stable (spins orientés anti-parallèlement au champ magnétique). A contrario, l'état quantique le plus stable est défini par $m_s = -1/2$ (spins orientés parallèlement au champ magnétique).

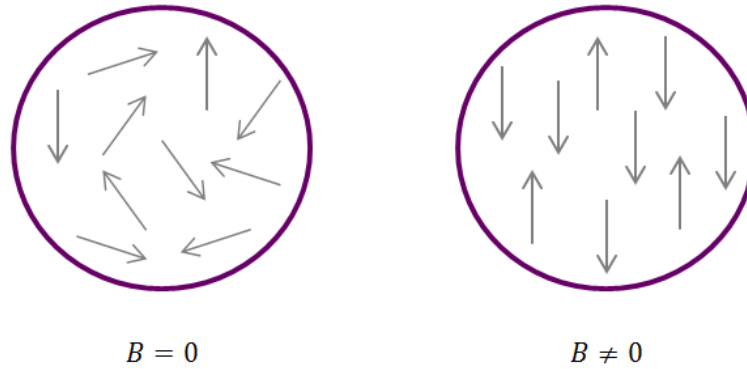


Figure 15 Orientation des spins électroniques avec ou sans champ magnétique extérieur.

Ce phénomène de levée de dégénérescence des niveaux énergétiques fondamentaux en présence d'un champ magnétique intense est appelée « Effet Zeeman » (Figure 16). Ces niveaux énergétiques E sont définis tels que :

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = m_s g \beta B \quad (13)$$

On en déduit la différence d'énergie entre les deux niveaux énergétiques adjacents :

$$\Delta E = \Delta m_s g \beta B \quad (14)$$

Dans le cas général, les transitions énergétiques autorisées doivent satisfaire la condition suivante : $\Delta m_s = \pm 1$. Ainsi, la technique de spectroscopie RPE consiste à induire ces transitions en irradiant en continu, à l'aide d'une micro-onde d'énergie $h\nu$, un échantillon placé dans un champ magnétique intense (de l'ordre du Tesla). Pour qu'il y ait absorption du rayonnement micro-onde par le système étudié, il faut impérativement que l'énergie du

rayonnement micro-onde $h\nu$ soit strictement égale à la différence en énergie ΔE entre deux niveaux adjacents : c'est la condition de résonance. En ce qui concerne le cas simple présenté ici, la condition de résonance est la suivante :

$$\Delta E = \left(\frac{1}{2} - \frac{-1}{2}\right) g\beta B = g\beta B \quad (15)$$

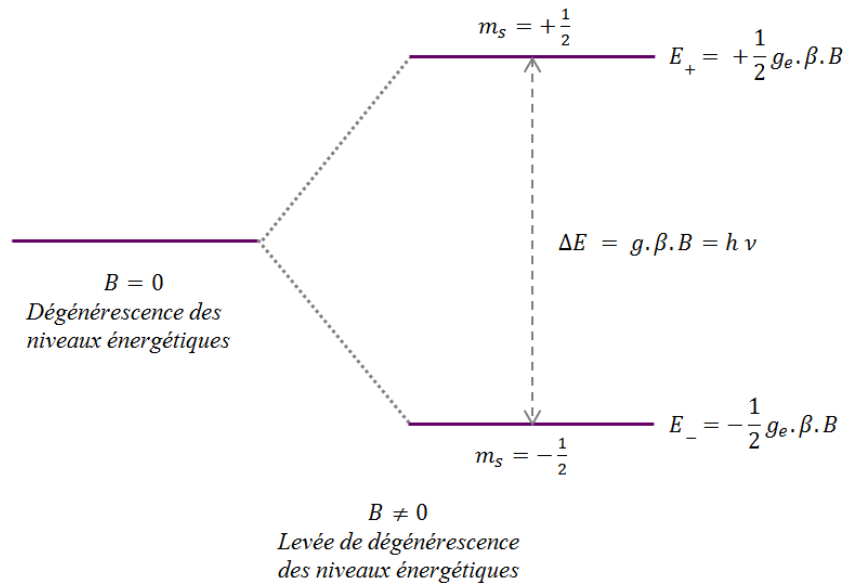


Figure 16 Représentation des niveaux énergétiques des spins électroniques ($S = 1/2$) en présence d'un champ magnétique extérieur.

Dans une expérience de spectroscopie RPE, contrairement à de nombreuses autres techniques de spectroscopies (par exemple l'absorption UV-visible, infrarouge...), ce n'est pas la fréquence de la micro-onde qui varie mais le champ magnétique pour une fréquence ν fixe. Ainsi, la différence d'énergie entre les niveaux énergétiques Zeeman devient proportionnelle au champ magnétique. Dans ces gammes de champs magnétiques et de fréquences micro-ondes, il est techniquement plus simple de procéder ainsi. La résonance apparaît dès lors que l'énergie du rayonnement micro-onde $h\nu$ correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux E_+ et E_- . La valeur du champ magnétique pour laquelle la résonance se produit est :

$$B_{rés} = \frac{h\nu}{g\beta} \quad (16)$$

Il faut faire attention cependant au fait que la valeur du champ magnétique de résonance n'est pas caractéristique du système paramagnétique. Pour s'en convaincre, le

tableau 3 répertorie les champs magnétiques de résonance d'un même système paramagnétique défini par $g=2$ à différentes fréquences de micro-ondes. En revanche, le facteur g constitue une véritable signature de l'entité paramagnétique étudiée.

Tableau 3 : Champs magnétiques de résonance pour un système défini par un facteur $g=2$ en fonction de la fréquence micro-onde utilisée.

Fréquence micro-onde (GHz)		Champ magnétique de résonance (mT)
Bande L	1,1	39,2
Bande S	3,0	107,0
Bande X	9,5	338,9
Bande Q	35	1248,5
Bande W	90	3215,2

3.1.2 Le facteur g

Nous venons de voir que dans une expérience de spectroscopie RPE, le paramètre que nous cherchons à mesurer est le facteur de Landé, communément appelé « facteur g ». Celui-ci est déterminé par deux facteurs. D'une part, il dépend de l'atome central ou de la molécule qui possède l'électron célibataire. D'autre part, il est affecté par son environnement proche (les défauts, les impuretés, ses plus proches voisins...). D'après l'expression 16, le facteur g peut être déterminé à partir de la fréquence du rayonnement micro-onde ν et du champ magnétique $B_{rés}$ de résonance :

$$g = \frac{h\nu}{\beta B_{rés}} \quad (17)$$

Le facteur g d'un électron libre vaut $g_e=2,002319278$. Or, en réalité, un électron est rarement libre car il est confiné dans une orbitale atomique ou moléculaire. Ainsi, le couplage entre son moment cinétique et le spin électronique engendre une déviation du facteur g par rapport à g_e . Le facteur g devient anisotrope et ses valeurs propres dépendent de l'orientation du champ magnétique par rapport au système paramagnétique. Chaque centre paramagnétique possède un unique système d'axes propres appelés axes principaux du système. Les facteurs g mesurés dans ces directions sont nommés les composantes du facteur g et se notent, g_x , g_y et g_z . Nous

allons voir ici les différentes symétries que peuvent prendre ces systèmes paramagnétiques ainsi que leurs conséquences lorsque les systèmes paramagnétiques sont orienté de manière aléatoire dans l'espace (poudre, matériau amorphe, liquide...).

Symétrie élevée (sphérique, cubique, octaédrique, tétraédrique) :

Considérons un centre paramagnétique qui possède une symétrie élevée (système isotrope), ce qui revient à dire que tous les électrons non appariés interagissent de façon identique dans toutes les directions de l'espace avec le champ magnétique (Figure 17). Dans ce cas, le moment orbital électronique $\vec{\mu}$ est égal dans toutes les directions : $\mu_x = \mu_y = \mu_z$ ce qui implique $g_x = g_y = g_z$ d'après la relation 10. Si ce système est exposé à un champ magnétique extérieur, son orientation par rapport à ce champ n'aura pas d'impact puisque son moment magnétique total restera inchangé quelle que soit sa direction. En d'autres termes, on mesurera une unique valeur de facteur g pour une seule valeur de champ magnétique de résonance. Le spectre RPE d'absorption associé ne comportera donc qu'une seule transition (figure 17 a) ce qui se traduit expérimentalement par une raie isotrope (figure 17 b).

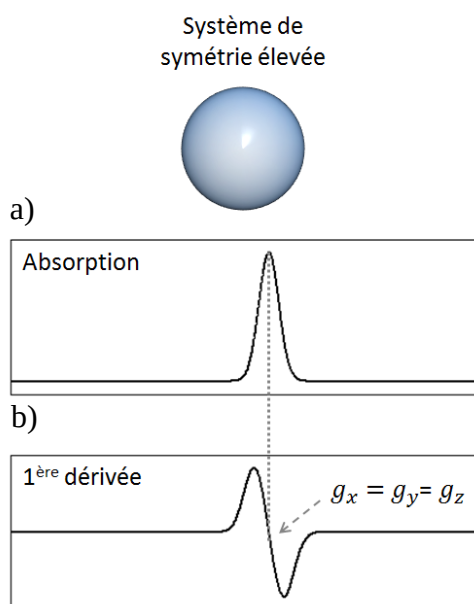


Figure 17 Représentation d'un système de symétrie élevée. Expérimentalement, nous obtenons la 1^{ère} dérivée (b) du spectre d'absorption (a). Cette raie est isotrope et centrée en $g=g_x=g_y=g_z$.

Symétrie axiale

Considérons maintenant une molécule paramagnétique, toujours de spin $S = 1/2$, qui possède une symétrie axiale sur le plan (x, y) de sorte que le moment magnétique total dans la direction z est le plus intense (Figure 18). L'orientation d'un tel système par rapport au champ magnétique extérieur $\vec{B}$ a un réel impact :

- Si on le place dans la direction z parallèlement au champ magnétique $\vec{B} = B \cdot \vec{u}_z$, la différence d'énergie entre les deux niveaux énergétiques pour l'électron sera de $\Delta E = 2\mu_z B_z$. Puisque nous avons supposé que le moment magnétique total dans la direction z était le plus intense, alors le champ magnétique de résonance associé B_z sera plus faible.
- Par contre, si on le place dans le plan (x, y) alors la différence énergétique sera $2\mu_{x,y}$. Puisque $\mu_{x,y}$ est faible dans le cas décrit ici, un champ magnétique plus important sera nécessaire pour satisfaire la condition de résonance.

Le facteur g sera donc différent selon que le champ magnétique $\vec{B}$ est parallèle ou perpendiculaire à l'axe z . Celui mesuré dans la direction z est noté $g_z = g_{\parallel}$ tandis ceux mesurés dans la direction perpendiculaire sont notés $g_{x,y} = g_{\perp}$.

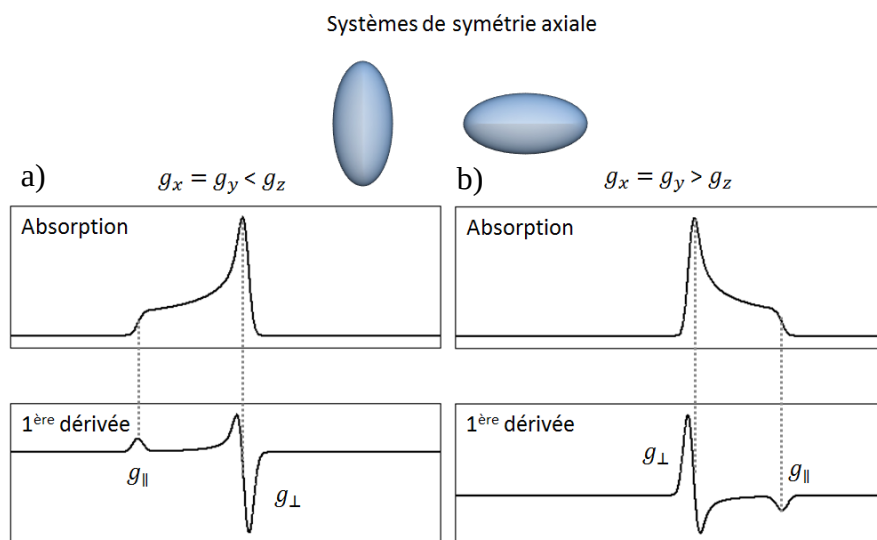


Figure 18 Représentation de deux systèmes de symétrie axiale. a) Le système paramagnétique est placé parallèlement à l'axe z et le facteur g_z est plus important que g_x et g_y : $g_{\perp} < g_{\parallel}$. b) C'est le cas contraire : le système paramagnétique est placé dans le plan (x, y) et le facteur g_z est plus faible que g_x et g_y : $g_{\perp} > g_{\parallel}$.

Basse symétrie

Le troisième cas apparaît lorsque la symétrie est plus basse que la symétrie axiale ce qui implique que l'ensemble des facteurs g sont différents. Cela revient à dire qu'aucune direction n'est semblable à une autre (figure 19).

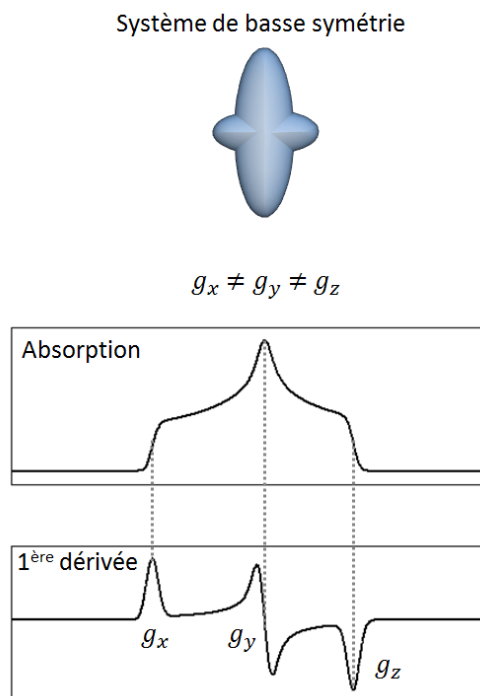


Figure 19 Représentation d'un système de basse symétrie. Dans ce cas, le facteur g mesuré diffère selon l'axe considéré. Ici, le facteur g mesuré dans la direction x est plus grand que celui mesuré dans la direction y et ce dernier est plus important que celui mesuré dans la direction z : $g_x > g_y > g_z$.

3.1.3 L'interaction hyperfine

Les nucléons (protons, neutrons) possèdent également un moment cinétique intrinsèque égal à $1/2$. Le spin nucléaire du noyau, noté I , résulte de la somme des moments cinétiques de tous ses nucléons. Dès lors, deux cas de figures apparaissent : si le nombre de nucléons est pair alors I est nul ou entier ; s'il est impair, l'état fondamental est paramagnétique avec I demi-entier.

Lorsque le noyau est paramagnétique, son moment magnétique s'écrit $\vec{\mu} = g_N \beta_N \vec{I}$ avec g_N qui dépend du nombre de protons et de neutrons (il est donc différent pour chaque isotope), et β_N le magnéton nucléaire. Comme pour le spin électronique, la projection de $\vec{I}$

sur l'axe z , I_z , peut prendre l'une des $(2I + 1)$ valeurs $M_I = -I, \dots, +I$. Dans le cas d'un atome libre, toutes les directions sont équivalentes et le moment magnétique résultant est isotrope. L'interaction hyperfine entre les électrons non-appariés et le noyau de spin I est elle-aussi isotrope. Son énergie s'écrit :

$$E_{\text{hyperfine}} = A \vec{S} \cdot \vec{I} \quad \text{Avec } A \text{ la constante hyperfine.} \quad (18)$$

Le phénomène d'interaction hyperfine détaillé en annexe (« 1.3 L'interaction hyperfine »). Un exemple d'interaction hyperfine avec un noyau d'hydrogène ($I=1/2$) et d'azote ($I=1$) est présentée dans la figure 20 :

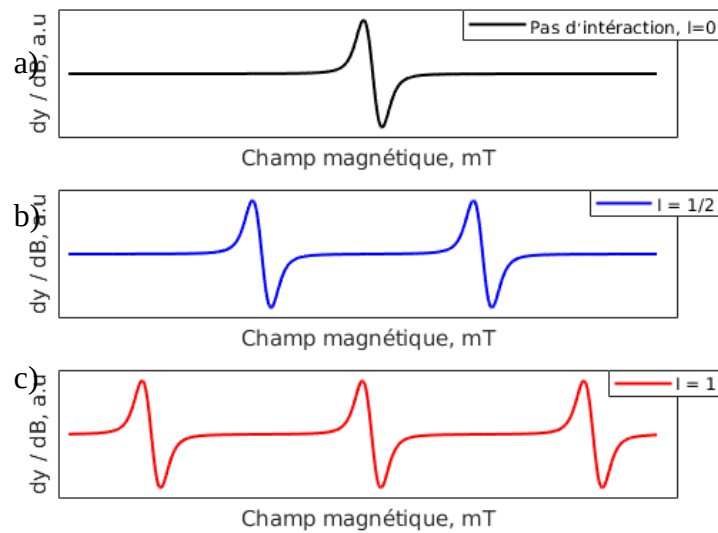


Figure 20 Représentation de spectres RPE avec ou sans interaction hyperfine : a) aucune interaction hyperfine. b) interaction hyperfine avec un noyau d'hydrogène $I=1/2$. c) interaction hyperfine avec un noyau d'azote $I=1$.

3.1.4 Le phénomène de relaxation des spins électroniques

Considérons maintenant le même système simple que nous avons défini précédemment constitué de N centres paramagnétiques de spins $S=1/2$ placés dans un intense champ magnétique. À l'équilibre thermique, la répartition des spins électroniques sur les niveaux énergétiques « Zeeman » suit la loi de Maxwell-Boltzmann :

$$\frac{n_1}{n_2} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (19)$$

n_1 et n_2 correspondent au nombre de spins électroniques peuplant respectivement les niveaux énergétiques E_- et E_+ . On a bien-sûr $N = n_1 + n_2$, k est la constante de Boltzmann ($J.K^{-1}$) et T la température du système (K).

La spectroscopie RPE consiste à induire des transitions des spins électroniques des niveaux énergétiques faibles vers les plus forts. Cependant, pour de fortes puissances micro-ondes, les populations des deux niveaux de spin s'égalisent. Puisque l'absorption de la puissance micro-onde dépend de la différence de population des deux niveaux, une diminution de celle-ci entraîne une diminution du transfert d'énergie. L'intensité du signal que l'on mesure décroît et il n'est plus proportionnel à la quantité de spins du système. On appelle ce phénomène la saturation. L'observation d'un signal RPE nécessite la présence d'un mécanisme qui maintient les populations de spin à l'équilibre thermique.

Afin de comprendre le phénomène de relaxation, il est nécessaire d'introduire la magnétisation $\vec{m}$ d'un échantillon qui correspond à la somme de l'ensemble des moments magnétiques présents dans le volume V considéré :

$$\vec{m} = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu} \quad (20)$$

Dans une expérience de spectroscopie RPE, l'échantillon est soumis à un champ magnétique $\vec{B}$ dont la projection sur l'axe z vaut B_z . En l'absence de toute autre perturbation, les moments magnétiques se distribuent aléatoirement dans leur mouvement de précession autour de B_z et leurs contributions s'annulent. Ainsi, la magnétisation résultante m est soit parallèle soit anti- parallèle par rapport à B_z comme le montre la figure 21.

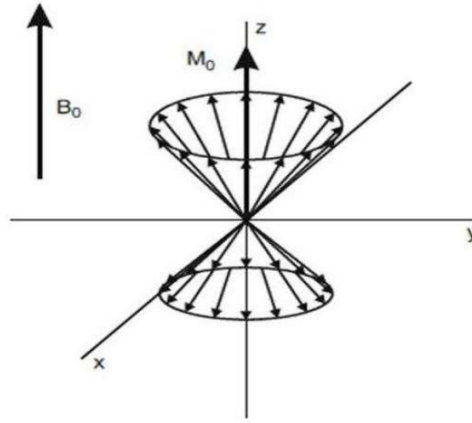


Figure 21 Représentation de la précession des moments magnétiques et de l'aimantation résultante autour de B_0 .

À l'équilibre thermique, les populations des deux niveaux de spin étant différente, la magnétisation $\vec{m}$ vaut :

$$\vec{m} = m_x \vec{u}_x + m_y \vec{u}_y + m_z \vec{u}_z = m_0 \vec{u}_z \quad \text{avec} \quad m_0 = \|\vec{m}\| \quad (21)$$

En revanche, lorsque le système est perturbé, la population de spin tend à s'égaliser, ce qui entraîne une diminution de la composante m_z et une augmentation des composantes m_x et m_y . À l'arrêt de la perturbation, les moments magnétiques se déphasent puis on assiste à un retour de la magnétisation $\vec{m}$ à son état initial (équation 21) : c'est le phénomène de relaxation. Il est tout de même important de faire la distinction entre deux temps de relaxation très spécifiques :

- Le temps de relaxation spin-réseau noté T_1 qui est caractéristique du retour de l'aimantation à son état initial $\vec{m} = m_0 \vec{u}_z$;
- Le temps de relaxation spin-spin noté T_2 qui est caractéristique du déphasage des fréquences de précession des spins électroniques dans le plan (x, y) .

Ces temps de relaxation jouent un rôle important quant aux formes des spectres RPE mesurés et notamment pour la largeur des raies notée ΔB :

$$\Delta B \propto \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (22)$$

3.2 Les principaux éléments d'un spectromètre RPE

Il existe une grande variété de spectromètres RPE. Le choix de la fréquence micro-onde se fait en fonction des besoins de chaque laboratoire et de leurs thématiques de recherche. Au Laboratoire de Dosimétrie des Rayonnements ionisants (LDRI), nous avons la chance de posséder plusieurs spectromètres à la fois en bande X (fréquence du rayonnement micro-onde de 9,5 GHz) et en bande Q (35 GHz). L'intérêt de posséder des fréquences micro-ondes complémentaires est de pouvoir caractériser les entités paramagnétiques et de valider des hypothèses concernant la nature des radicaux libres étudiés en résolvant l'anisotropie du facteur g notamment. Afin de limiter la variation de la sensibilité des spectromètres RPE, les salles de mesures sont climatisées à 18 °C.

Un spectromètre RPE basique est composé de quatre principaux éléments : la source de l'onde électromagnétique, l'électroaimant, le résonateur et le système de détection. En dépit de la complexité des spectromètres RPE rencontrés dans les laboratoires de recherche, ils peuvent toujours être simplifiés avec le schéma de la figure 22 :

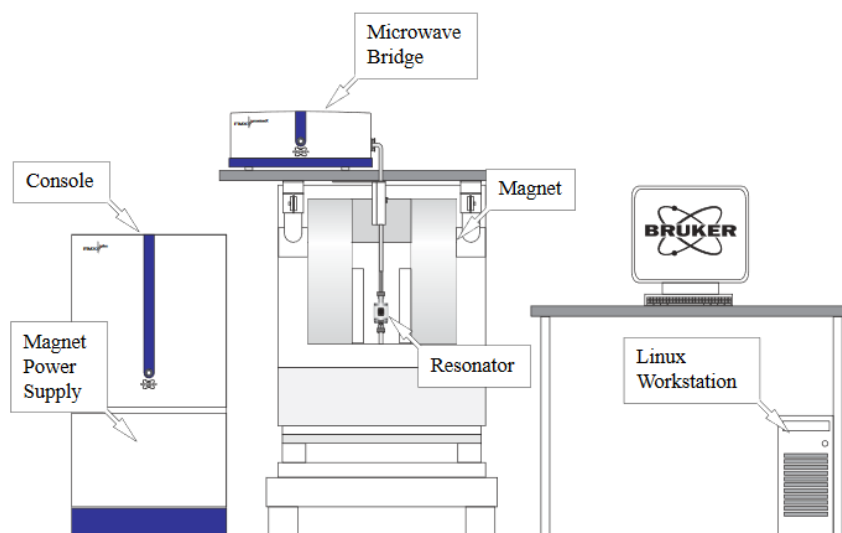


Figure 22 Schéma d'une installation de spectroscopie RPE.

Image : Bruker.

Nous allons passer brièvement en revue les principaux éléments qui constituent un spectromètre RPE comme schématisé dans la figure précédente.

3.2.1 Le pont micro-onde

Le pont micro-onde est constitué du générateur du rayonnement électromagnétique micro-onde, du détecteur, du bras de référence, du circulateur et de l'atténuateur (figure 23). Le rayonnement électromagnétique est généré par un dispositif appelé « diode Gunn » dans les spectromètres récents. Un guide d'onde permet de les acheminer jusqu'à l'échantillon situé dans la cavité résonante. La fréquence micro-onde la plus couramment utilisée est 9,5 GHz (bande X).

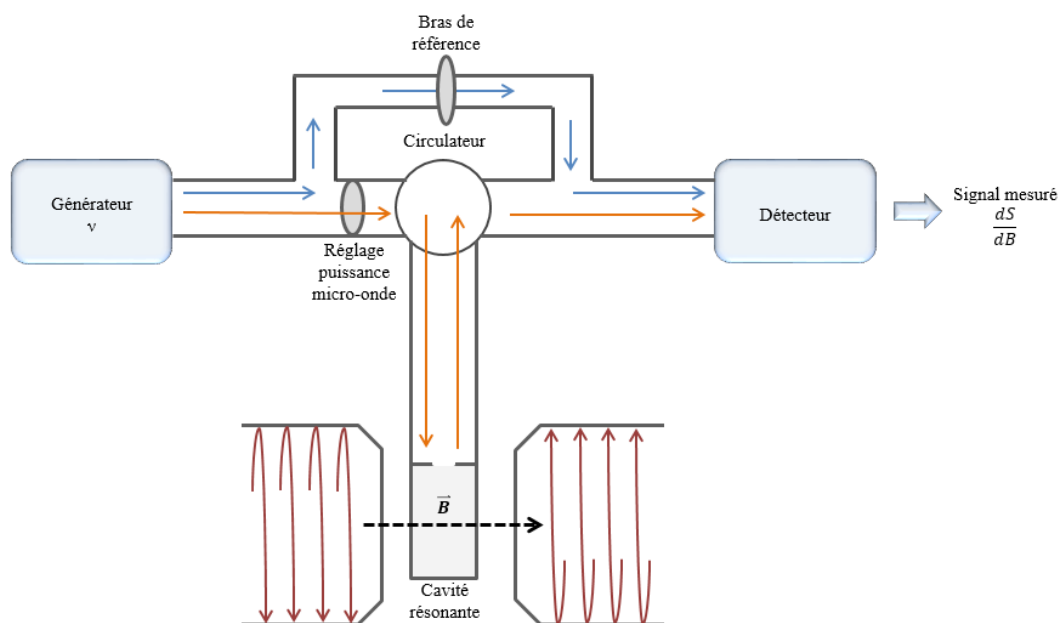


Figure 23 Schéma d'un spectromètre RPE. Image : La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique [Bertrand, 2010].

Les spectromètres RPE peuvent être séparés en deux grandes familles : les faibles fréquences micro-ondes (de la bande L 1 GHz jusqu'à la bande Q 35 GHz) et les hautes fréquences (bande W 95 GHz et au-delà). Plus la fréquence micro-onde est élevée, plus la taille de l'échantillon étudié peut être faible, et également plus l'anisotropie du facteur g pourra être résolue. À titre d'exemple, nous utilisons environ 10 à 15 mg d'échantillons d'ongles lorsqu'on travaille à 9,5 GHz contre seulement 1 mg à 35 GHz.

La puissance du rayonnement micro-onde est réglable par le biais de l'atténuateur. Le circulateur permet d'acheminer le rayonnement du générateur vers la cavité résonante puis

vers le détecteur. Le détecteur est une diode qui convertit la puissance micro-onde reçue en un signal électrique. Pour de faibles puissances micro-ondes ($< 1mW$), le courant de diode est directement proportionnel à la puissance micro-onde. En revanche, pour de plus fortes puissances micro-ondes, le courant de diode devient proportionnel à la racine carrée de la puissance micro-onde. Il est recommandé de travailler constamment dans le régime linéaire de la diode afin d'obtenir une sensibilité optimale.

3.2.2 Le résonateur

Cet élément est l'un des plus importants du spectromètre de RPE puisqu'il contient l'échantillon étudié. Le rayonnement micro-onde générée par la diode Gunn est acheminée jusqu'à la cavité résonante. L'onde est réfléchiée sur les parois hormis lorsque sa fréquence correspond exactement à la fréquence de résonance de la cavité auquel cas les ondes sont stationnaires. Ces ondes stationnaires possèdent à la fois une composante électrique E_I et une composante magnétique B_I qui sont déphasées (la composante électrique est minimale lorsque la composante magnétique est maximale, et vice versa). La cavité est construite de telle façon que la composante électrique est nulle en son centre, et à contrario, maximale pour la composante magnétique. Cette particularité apporte une bien meilleure sensibilité ainsi qu'une meilleure qualité du signal enregistré. La cavité résonante stocke l'énergie de l'onde incidente qui sera potentiellement absorbée par l'échantillon.

L'efficacité, i.e la capacité à stocker l'énergie au sein de la cavité, est mesurée par le facteur de qualité, noté Q . Il s'exprime comme le rapport de la fréquence de résonance $\nu_{rés}$ de la cavité et de la largeur à mi-hauteur $\Delta\nu$ du pic de résonance. La sensibilité du spectromètre augmente lorsque le facteur de qualité Q augmente.

3.2.3 L'électroaimant

Afin de lever la dégénérescence des niveaux énergétiques des spins électroniques, il est nécessaire de confiner l'échantillon dans un champ magnétique intense. C'est ici qu'intervient l'électroaimant. Il produit un champ magnétique intense, statique et stable. Il est possible de gérer la vitesse de balayage à l'aide des paramètres d'acquisition.

3.2.4 Les canaux de détection des signaux

Dans un souci d'amplification et d'élimination des perturbations du signal mesuré, le champ magnétique appliqué est modulé en le faisant osciller d'une faible amplitude par rapport aux largeurs des raies d'absorption. Cette modulation est rendue possible par l'intégration de petites bobines de modulation, appelées bobines d'Helmutz, placées de part et d'autre de la cavité résonante. La fréquence de modulation couramment utilisée dans les spectromètres de RPE est 100kHz. Le signal enregistré par le détecteur est ensuite démodulé par un circuit électronique (détection synchrone). Le principe de démodulation repose sur la sélection des signaux ayant une fréquence de 100 kHz et la même phase que le courant utilisé dans les bobines de modulation. Cette modulation d'amplitude convertit le signal d'absorption en sa dérivée première. Ce traitement des signaux permet d'une part, d'éliminer les signaux parasites insensibles au champ magnétique dans la cavité, et d'autre part, d'augmenter le rapport signal sur bruit.

3.2.5 Les échantillons

Les échantillons utilisés en spectroscopie de RPE peuvent aussi bien être à l'état solide que liquide. En ce qui nous concerne, les échantillons étudiés sont des morceaux d'ongles et il est nécessaire de les tailler afin qu'ils puissent être intégrés dans les tubes supports. Ces tubes sont composés de quartz Suprasil et n'induisent pas de signaux parasites. En bande X, le diamètre de ces tubes est de l'ordre de $0,7\text{ cm}$ contre $0,3\text{ cm}$ en bande Q.

3.3 Les paramètres d'acquisition

Les paramètres d'acquisition présentés ici sont ceux qui influent le plus sur la qualité de spectres RPE obtenus. En fonction de l'étude qui est menée, ces paramètres sont amenés à être changés mais encore faut-il comprendre leur rôle.

3.3.1 La puissance micro-onde

La puissance micro-onde agit directement sur l'intensité des signaux RPE mesurés. En l'absence de phénomène de saturation, l'intensité du signal RPE est directement proportionnelle à l'intensité du champ magnétique oscillant B_1 , donc à la racine carrée de la puissance micro-onde. Il est très courant d'observer le phénomène de saturation du signal en

augmentant la puissance du rayonnement micro-onde. Lorsque le temps de relaxation spins-réseau T_1 électroniques est long, les populations des états de spin s'égalisent et puisque l'absorption dépend de la différence de population entre ces niveaux énergétiques, une diminution de cette différence de population engendre une diminution de l'absorption. En règle générale, pour de faibles puissances micro-ondes, l'amplitude du signal augmente linéairement avec la racine de la puissance. Cependant, lorsque les phénomènes de relaxation ne permettent plus de repeupler les niveaux énergétiques inférieurs, il n'y a plus de relation linéaire et on atteint le phénomène de saturation.

3.3.2 La modulation d'amplitude

Ce paramètre est l'un de ceux qui influent sur le rapport signal sur bruit des spectres RPE et la résolution. En augmentant l'amplitude de modulation (am), on augmente l'intensité du signal et son rapport signal sur bruit. Il est indispensable de bien régler ce paramètre si nous voulons discriminer des signaux très proches l'un de l'autre comme le montre la figure 24. En effet, si l'amplitude de modulation est plus grande que la séparation ΔB de deux raies spectrales, alors le spectre résultant sera déformé et il nous sera impossible de les discerner.

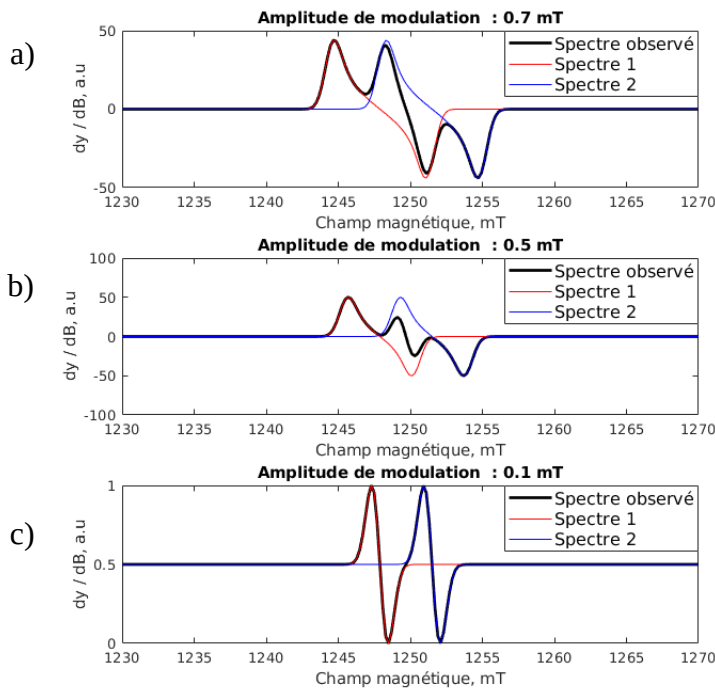


Figure 24 Effet de l'amplitude de la modulation (am) sur la discrimination de signaux proches. Les deux signaux RPE sont séparés de 4 mT. a) $am=0,7$ mT, b) $am=0,5$ mT, c) $am=0,1$ mT.

3.3.3 Le nombre d'acquisitions

Une autre façon d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit sur les spectres RPE enregistrés est l'augmentation du nombre de mesures ou nombre de « scans ». Le signal est directement proportionnel au nombre n d'acquisitions alors que le bruit lui varie en $\sqrt{n}$. Ainsi, le rapport signal sur bruit varie en $\sqrt{n}$ également. Par exemple, multiplier par 10 le rapport signal sur bruit revient à accumuler 100 fois le spectre RPE ce qui peut être problématique en dosimétrie d'accident.

3.3.4 La vitesse de balayage

Il est également possible d'augmenter le rapport signal sur bruit en jouant sur la vitesse de balayage du champ magnétique, i.e le temps de l'acquisition. Là encore, ce rapport augmente avec la racine carrée du temps [Bertrand, 2010] et dans le cas d'expertise en dosimétrie d'accident, le temps peu être crucial.

3.3.5 Les paramètres d'acquisition en spectroscopie RPE utilisés

Les paramètres d'acquisition RPE utilisés sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Paramètres d'acquisition utilisés en spectroscopie RPE dans le cadre de ce travail.

Paramètres de mesure	Bande X	Bande Q
Fréquence micro-onde	9.40 GHz	34.00 GHz
Modèle du résonateur	SHQ	ER5106QT
Masse des échantillons	15 - 30 mg	1,00 – 3,00 mg
Taille des échantillons	1,00 mm large 3,00 mm long	1,00 mm large 3,00 mm long
Diamètre interne du porte échantillon	4,00 mm	2,00 mm
Puissance micro-onde incidente	[4 ; 50] mW	[0,1 ; 10] mW
Balayage du champ magnétique	[346 ; 355] mT	[1200 ; 1218] mT
Fréquence de modulation	100,00 kHz	100,00 kHz
Amplitude de modulation	0,3 - 0,5 mT	0,3 – 0,5 mT
Constante de temps	-	10,24 ms
Nombre de points	2000	1024
Temps d'acquisition	30 s	40 s
Nombre d'acquisitions	8 - 12	8 - 12

3.4 La dosimétrie par spectroscopie RPE

Nous avons vu précédemment que l'interaction entre un rayonnement ionisant et la matière pouvait générer dans certains matériaux des entités paramagnétiques par dissociation des paires d'électrons. Le principe de la dosimétrie par spectroscopie RPE repose sur la relation liant la concentration des entités paramagnétiques radio-induites à la quantité d'énergie absorbée par l'échantillon. Connaissant cette relation, il est alors possible de mesurer la dose absorbée pour un matériau donné. La quantité d'espèces paramagnétiques présente dans un échantillon est directement proportionnelle à l'intensité du signal RPE, i.e l'aire sous la courbe du pic d'absorption. Or, comme nous venons de le voir, c'est la 1^{ère} dérivée du spectre d'absorption qu'on obtient expérimentalement. Ainsi, pour des raisons pratiques, il est plus simple de substituer à l'intensité d'un signal RPE son amplitude pic à pic du signal d'intérêt. Par conséquent, plutôt que de relier l'intensité du spectre RPE avec la dose absorbée, c'est l'amplitude pic à pic du signal radio induit que la grande majorité des laboratoires utilisent (figure 25).

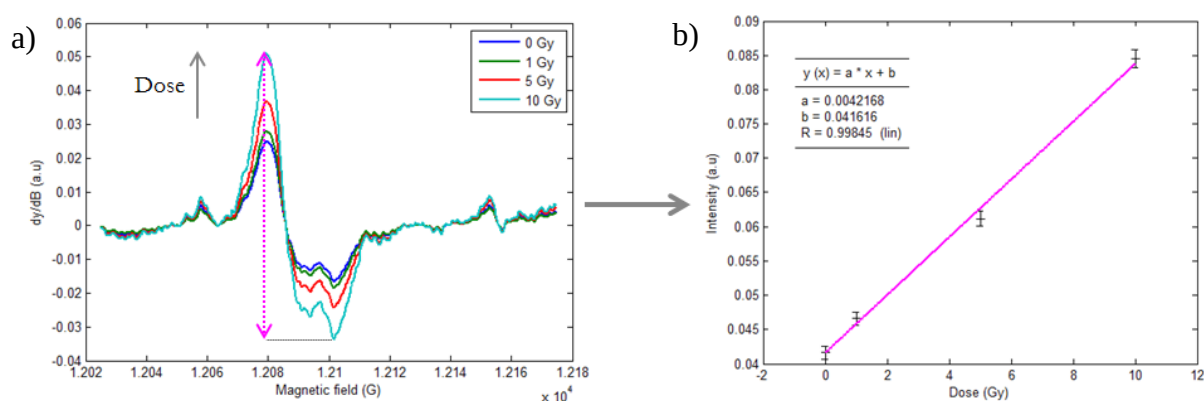


Figure 25 Principe général de la dosimétrie RPE. a) L'intensité du signal RPE radio-induit augmente avec la dose. b) On relie l'amplitude pic à pic du signal RPE radio-induit à la dose absorbée.

4 La caractérisation des ongles

4.1 Une description histologique et biochimique des ongles

Les ongles sont constitués d'une paroi blanchâtre et transparente composée essentiellement d'alpha-kératine et sont situés sur les surfaces extérieures des doigts et des orteils. Leur rôle principal est la protection des doigts qui peuvent entrer en contact avec différents objets du quotidien. C'est leur composition chimique et leur structure qui déterminent leurs propriétés mécaniques.

L'anatomie de l'ongle humain se compose de plusieurs structures : la plaque de l'ongle, les bourrelets proximaux et latéraux, la matrice, le lit de l'ongle et l'hyponychium [Standring et al., 2008] (Figure 26).

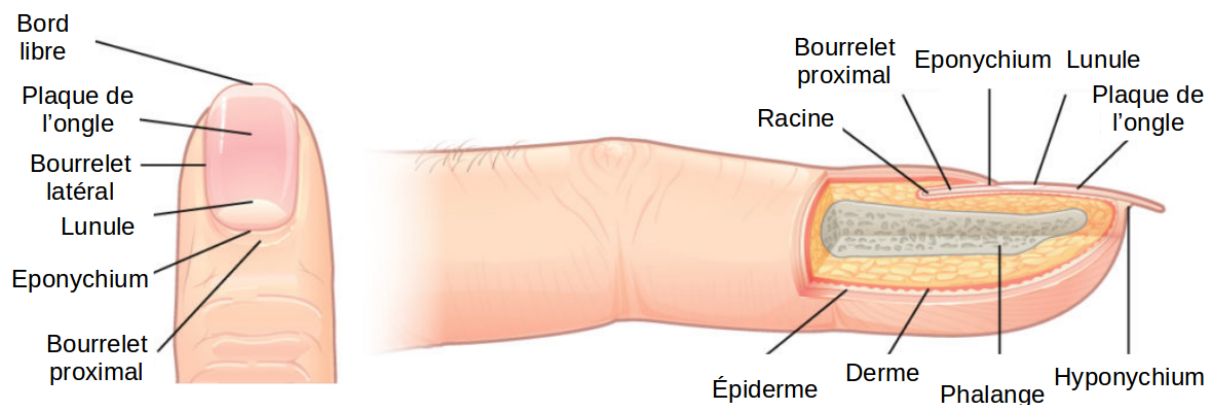


Figure 26 Schéma récapitulatif d'un ongle humain avec ses différentes structures.

La partie principale d'un ongle est constituée d'une plaque, la plaque de l'ongle, approximativement rectangulaire et convexe dans les directions longitudinale et transversale. Cette plaque est constituée de cellules épithéliales cornées et compactées (cornéocytes) et son épaisseur est de 0,25 à 0,6 mm dans le cas des mains et jusqu'à 1,3 mm dans le cas des orteils. Sa structure principale, la matrice, peut être divisée en trois parties : les matrices dorsale,

intermédiaire et ventrale [Standring et al., 2008] avec un rapport d'épaisseur d'environ 3 : 5 : 2 [Particle Sciences, 2009]. De plus, si la matrice est détruite, l'ongle ne repousse plus.

Les ongles ont la particularité d'être à la fois rigides, souples et transparents et sont composés d'environ 25 couches de cellules mortes étroitement reliées les unes aux autres par de nombreux liens intercellulaires [Particle Sciences, 2009]. La partie dorsale est la plus dense et la plus dure : elle contient de la kératine cornée d'une épaisseur de seulement quelques cellules (environ 200 μm). La couche intermédiaire est constituée de fibres de kératine positionnées perpendiculairement à la direction de croissance des ongles [Particle Sciences, 2009] contrairement aux couches ventrale et dorsale où elles sont alignées dans le sens opposé (figure 27). La couche ventrale est la plus mince et elle permet de relier la plaque de l'ongle au lit de l'ongle.

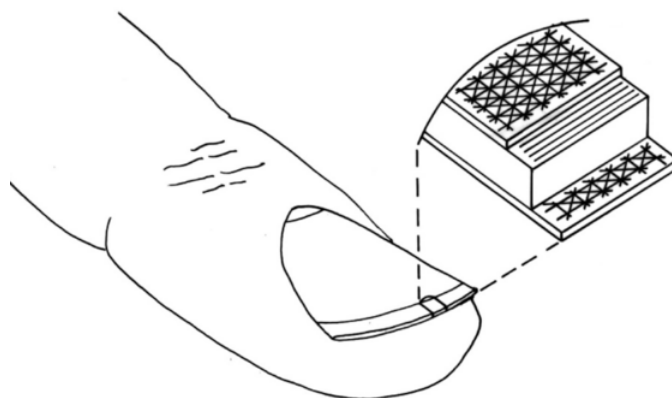


Figure 27 Schéma représentant l'orientation des fibres de kératine dans les différentes couches constitutives de l'ongle (ventrale, intermédiaire et dorsale).

L'alpha-kératine qui constitue majoritairement l'ongle est une protéine composée de trois longues chaînes peptidiques hélicoïdales enroulées en forme de spirale et fortement renforcée par des ponts disulfure (S-S) formés à partir d'acides aminés soufrés adjacents, les cystéines (figure 28). Les ponts disulfures sont les liens les plus forts dans la structure et sont responsables de la rigidité des ongles. La plaque de l'ongle contient environ 10 % de cystéine, qui est responsable du maintien de sa structure compacte hélicoïdale [Barba et al., 2009].

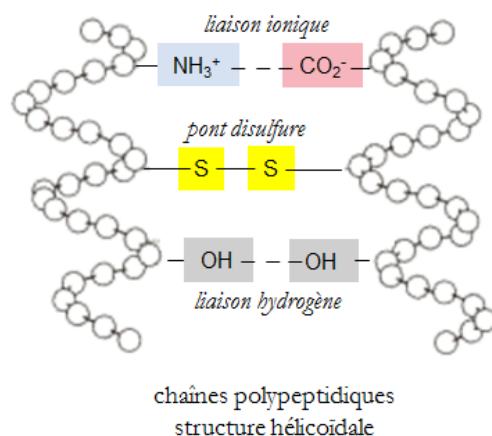


Figure 28 Schéma de l'alpha-kératine. Elle est composée de longues chaînes polypeptidiques enroulées en forme de spirale et renforcée par des liaisons ioniques, hydrogènes et des ponts disulfure.

Des études microscopiques des ongles révèlent de multiples pores dans le matériau ce qui explique que les ongles ressemblent fortement à des éponges (figure 29).

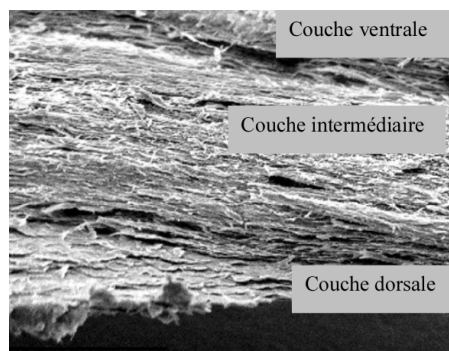


Figure 29 Image obtenue en microscopie électronique d'un échantillon d'ongle coupé.

Image : Farren et al., (2004).

Les autres acides aminés constitutifs de l'ongle sont principalement l'acide glutamique (16 %), la leucine (9 %), l'arginine (9%), l'acide aspartique (8%), la tyrosine (4%) et la phénylalanine (3%) [Greaves et al., 1976]. Notons que certaines maladies telles que les mélanonychies par exemple peuvent entraîner une modification de la couleur de l'ongle par l'intermédiaire de l'activation des mélanocytes et donc de la production de mélanine. Toutefois, cette protéine n'est a priori pas présente dans des ongles sains. Les ongles contiennent également un certain nombre d'ions chargés positivement tels que des ions métalliques Fe^{3+} , Cu^{2+} , des éléments-traces Al^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ [Vellar et al., 1970, Bank et al., 1981, Shadman et al., 2012, Okoro et al., 2015] ou des ions ammoniums R-NH_3^+ .

La plaque de l'ongle est résistante à de nombreux facteurs externes (microbes, température, rayonnements UV...); néanmoins, une partie de ses propriétés physiques est modifiée après le traitement dans l'eau, comme le lavage des mains par exemple [Wei et al., 2010]. L'élasticité et la rigidité de l'ongle sont associées à son degré d'hydratation [Standring, et al., 2008]. Selon des mesures *in vivo* effectuées par Egawa et al., (2006) la teneur moyenne en eau des ongles est de 10 à 20 % selon l'humidité de l'air, la durée de l'exposition à l'eau et le temps de séchage. Les études de Van de Kerkhof et al., (2005) ont montré que le degré d'hydratation influence très fortement les propriétés physiques des ongles *vivo*. Ils ont notamment montré que l'hydratation et la déshydratation répétées des plaques d'ongles provoquent une délamination de celles-ci accentuant leur sécheresse et donc leur fragilité. Cette situation est liée à la capacité réduite de l'ongle de retenir les molécules d'eau à cause de modifications induites dans la structure de la kératine [Barba et al., 2009].

Le taux de croissance des ongles varie selon les doigts, l'âge, la température ambiante, les saisons et d'autres facteurs tels que l'état nutritionnel, les blessures et les diverses maladies. Le taux de croissance moyen est d'environ 3 mm par mois pour les ongles des mains et de 1 mm par mois pour les orteils. Un ongle sain se développe complètement (de la racine jusqu'au bord libre) sur une période d'environ 6 mois pour les mains et d'environ le double pour les pieds [Particle Sciences, 2009]. Les ongles se développent plus vite en été qu'en hiver et plus vite chez les jeunes que chez les personnes âgées. Habituellement, le taux de croissance est associé à la longueur du doigt ; c'est-à-dire qu'il est le plus rapide (0,1 mm par jour) pour le majeur et le plus lent pour le petit doigt [Standring et al., 2008].

4.2 L'étude des ongles en spectroscopie RPE

Dans le cadre d'une étude dosimétrique par spectroscopie RPE, il est indispensable de caractériser les signaux intrinsèques afin de bien discerner les composantes spécifiques à l'irradiation ou au stress mécanique. L'objet de cette partie consiste à présenter l'ensemble des signaux observables en spectrométrie RPE dans les ongles, qu'ils soient sains ou irradiés, ainsi que leur principales caractéristiques. Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, le tableau 5 récapitule toutes les caractéristiques des signaux observés dans les ongles (page 80).

4.2.1 Le signal endogène et les signaux mécaniquement-induits

Un spectre RPE d'un échantillon d'ongle sain, i.e non irradié, présente de nombreux signaux qui se superposent les uns autres comme le montre la figure 30 et comme rappelé dans le chapitre II Contexte et objectifs du travail de thèse. Ceux-ci peuvent être attribués à des radicaux natifs (ou endogènes) dans la substance de l'ongle ou à des entités paramagnétiques générées par le stress mécanique (processus de coupe ou de presse). Ces derniers ont naturellement été nommés « signaux mécaniquement induits » (*MIS* pour « Mechanical Induced Signals ») dans de nombreuses publications scientifiques et, dans un premier temps, sans aucune autre différenciation supplémentaire. La plupart de ces signaux ont pour origine des radicaux formés le long du bord de cisaillement. Il a notamment été suggéré que la rupture des ponts disulfures entre les molécules de cystéine adjacentes au sein des fibres de kératine au moment de la coupe de l'ongle pouvait mener à la production d'espèces radicalaires soufrées expliquant l'origine de certains de ces signaux mécaniquement induits [Chandra et al., 1987, Symons et al., 1995, Black et al., 2010].

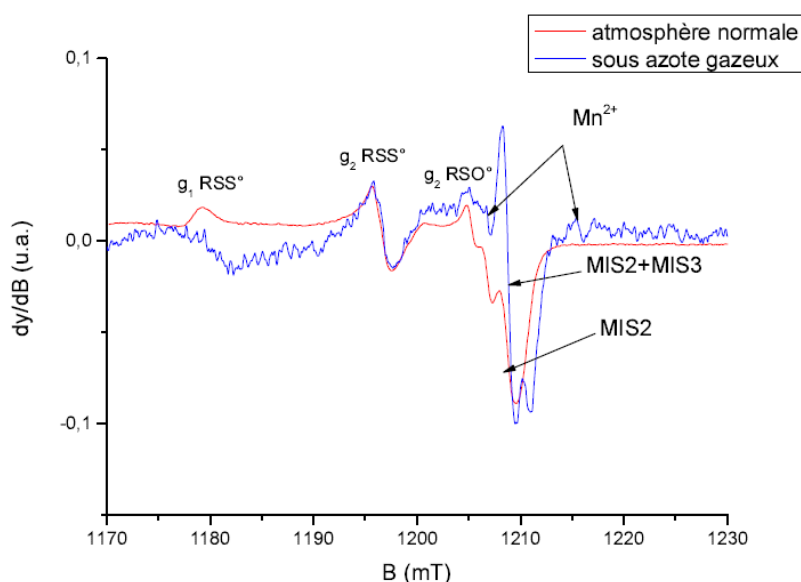


Figure 30 Spectre RPE acquis en bande Q d'un ongle stressé mécaniquement. Les 4 composantes mécaniquement induites y sont représentées. En rouge l'acquisition spectrale a été effectuée sous atmosphère inerte tandis qu'en noir sous atmosphère standard. Figure de Trompier et al., (2014).

L'ensemble de ces signaux a très largement été étudié ces 3 dernières décennies et il en résulte une nomenclature fournie et disparate pour les définir. Je présenterai ici, de manière

succincte, ces différents signaux qu'ils soient mécaniquement induits ou endogènes et spécifierai la nomenclature qui leur est associée. Aussi, pour éviter toute ambiguïté, j'utilise celle de référence définie dans « State of the art in nail dosimetry : Free radicals identification and reaction mechanism » [Trompier et al., 2014] qui est actuellement la plus utilisée dans ce domaine.

Le signal endogène ou *BKS* :

Ce signal est défini par un singlet défini par un facteur g égal à **2,004** selon Trompier et al., (2014) ou à 2,0068 selon Reyes et al., (2008). Ce dernier suggère que son origine est directement liée aux contraintes mécaniques présentes au sein de l'ongle. Cependant, la **nature du signal** responsable du signal endogène reste encore **inconnue**. Ce signal endogène est également caractérisé par une stabilité thermique relativement forte, jusqu'à 120 °C [Trompier et al., 2014]. Il présente également une particularité en spectroscopie RPE : son intensité est minimale directement après humidification dans l'eau distillée puis elle augmente d'un facteur 2 à 3 au cours des semaines suivantes et ce, de manière reproductible [Zhang et al., 2016, Reyes et al., 2008]. Les différences de hausse du signal seraient liées aux propriétés intrinsèques des ongles (variabilité inter-individu due à la composition biochimique, à la taille de l'échantillon, à l'humidité intrinsèque...).

Le signal mécaniquement induit n°1 ou *MIS 1* :

Il est caractérisé par un large signal anisotrope de facteur g défini par $g_1=2,055$, $g_2=2,024$ et $g_3=1,998$ et de constante de couplage hyperfin $a_H = 0,85 \text{ mT}$ selon Trompier et al., (2014). Reyes et al., (2008) l'appellent également *MIS 1* et le définissent par $g_1=2,025$ et $g_2=2,010$ avec une constante de couplage hyperfin $a_H=0,85 \text{ mT}$. Ce même signal a été reporté par Wilcox et al., (2010) avec un facteur g défini par $g_1=2,061$, $g_2=2,025$ et $g_3=2,000$. Le *MIS 1* est très intense juste après la coupe de l'ongle puis disparaît dans les 24 heures à température ambiante. De plus, un simple traitement dans de l'eau distillée est suffisant pour l'éliminer entièrement. L'attribution du *MIS 1* la plus probante d'après Trompier et al., (2014) et Black and Swarts (2010) est celle de radicaux **perthiyls (R-S-S $\cdot$)** qui se forment sous contrainte mécanique par la rupture de ponts disulfure entre deux molécules de cystéines adjacentes. Ce modèle proposé depuis longtemps [Sevilla et al., 1988, 1987] dans des

solutions gelées (cystéine, glutathion et pénicillamine) est corroborée par les calculs de « Density Functional Theory (DFT) » d'Engström et al., (2000) qui obtiennent des valeurs de facteur g et de constantes de couplage hyperfin similaires.

Le signal mécaniquement induit n°2 ou MIS 2 :

Il est similaire au signal endogène, se caractérise par un singlet de facteur g défini par $g=2,004$ selon Trompier et al., (2014) ou par $g=2,003$ selon Wilcox et al., (2010). L'hypothèse concernant la **nature du radical** responsable de ce signal est un **radical sulfonyl** de type **$\text{RSO}_2\cdot$** . En revanche, il a été montré que ce signal sature à faible puissance micro-onde [Wilcox et al., 2010, Reyes et al., 2008], et qu'il peut être entièrement éliminé par simple humidification dans de l'eau distillée [Trompier et al., 2014, 2007].

Le signal mécaniquement induit n°3 ou MIS 3 :

C'est un signal instable défini par un doublet en $g=2,004$ avec une constante de couplage hyperfin $a_H=2,0 \text{ mT}$ et ayant pour origine un **radical centré** sur un **carbone** dont l'**électron célibataire** est **couplé** à **1** ou **2 protons** [Trompier et al., 2014]. Ce signal a également été observé par Wilcox et al., (2010) en $g=2,007$. Après la coupe de l'ongle, il n'est observable que pendant les 2 heures suivantes, et l'hypothèse qui permettrait d'expliquer cette décroissance est la réaction du radical avec le dioxygène ambiant. Cette décroissance s'accélère en présence d'eau et une simple humidification permet de l'éliminer [Trompier et al., 2014].

Le signal mécaniquement induit n°4 ou MIS 4 :

Ce signal a été observé par Trompier et al., (2014) uniquement à la fréquence micro-onde de 34 GHz (bande Q). Il agit d'un radical sulfinyl (**$\text{R-S-O}\cdot$**) défini par $g_1=2,025$, $g_2=2,008$ et $g_3=2,0027$ et de constante de couplage hyperfin $a_H=1,4 \text{ mT}$. Le MIS 4 est très intense en présence de dioxygène mais est très faible en atmosphère inerte (azote).

4.2.2 Les signaux spécifiques à l'irradiation

Plusieurs études datant de ces dernières décennies, et notamment celles réalisées à la fin du 20e siècle par Dalgarno et Symons, ont montré que l'exposition aux rayonnements

ionisants de différents matériaux kératinisés (soie, laine, corne, sabot...), dont les ongles, engendrait la création de radicaux libres stables sur une période relativement longue (de quelques jours à plusieurs semaines) [Dalgarno et al., 1989, Symons., 1988]. Théoriquement, il serait alors possible de réaliser une dosimétrie sur ce type de matériaux. [Reyes et al., 2012 et 2009, Black et al., 2010, Wilcox et al., 2010, Trompier et al., 2009]. Les protocoles qui ont d'ores et déjà été développés en dosimétrie RPE sont présentés en annexe.

Les signaux RPE créés à la suite d'une exposition aux rayonnements ionisants sont nommés *RIS* dans la littérature scientifique pour « Radio-Induced Signals ». Ces signaux présentent, comme nous allons le voir, des caractéristiques spectrales identiques aux signaux mécaniquement induits selon la dose de rayonnement qui a été délivrée. L'objectif de cette partie est de décrire ces différents signaux, à savoir dans quelles gammes de doses ils apparaissent ainsi que leurs principales caractéristiques. Un tableau récapitulatif de l'ensemble des signaux RPE observables dans les ongles (*MIS*, *RIS*, *BKS*) est fourni à la fin de ce présent chapitre et fait office de synthèse (tableau 5).

Les différentes composantes radio-induites :

Le signal résultant de l'irradiation est constitué de plusieurs composantes (figure 31), dont certaines n'apparaissent qu'au-delà d'un certain seuil de dose, généralement plusieurs centaines de grays. Dans le cadre de cette thèse de doctorat, nous nous intéressons aux accidents radiologiques et, par conséquence, les doses d'intérêt sont comprises entre 0 et 100 Gy (doses typiques dans ce type d'accidents). Dans cette gamme de dose, le signal radio-induit global n'est composé que d'une seule composante isotrope définie par un facteur g de 2,004. Une étude réalisée par Black et Swarts, (2010) a permis de montrer qu'au-delà d'une centaine de grays, l'intensité du signal isotrope saturait rapidement et un nouveau signal proportionnel à la dose apparaissait. Ce signal a été nommé *RIS I* par Trompier et al., (2014). Toutefois, dans la gamme de dose d'intérêt, nous n'observons jamais cette nouvelle composante.

Pendant de nombreuses années, les mesures en spectroscopie RPE sur les ongles étaient réalisées en bande X. Il faut noter qu'il est extrêmement compliqué de différencier les

signaux mécaniquement induits (*MIS*) de ceux spécifiques à l'irradiation (*RIS*) à cette fréquence micro-onde. En effet, à cause de leurs caractéristiques spectrales similaires, ces signaux se chevauchent et il devient très compliqué de les différencier [Trompier et al., 2009, Reyes et al., 2008]. Afin de remédier à ce problème, des études ont été réalisées à plus haute fréquence dans le but de séparer spectralement les différentes composantes. Romanyukha et al., (2011) ont ainsi comparé les spectres RPE d'ongles irradiés et sains obtenus en bande X avec ceux en bande Q. Cette étude a notamment permis de montrer que l'utilisation d'une fréquence plus élevée permettait, d'une part, d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit pour de petits échantillons (2 mg en bande Q contre 20-30 mg en bande X) et d'autre part, de mieux discerner les composantes spectrales. Cette meilleure résolution spectrale a notamment permis d'identifier une nouvelle composante radio-induite (*RIS 3* ayant les mêmes caractéristiques que le *MIS 3*) sans quelconque traitement numérique sous-jacent.

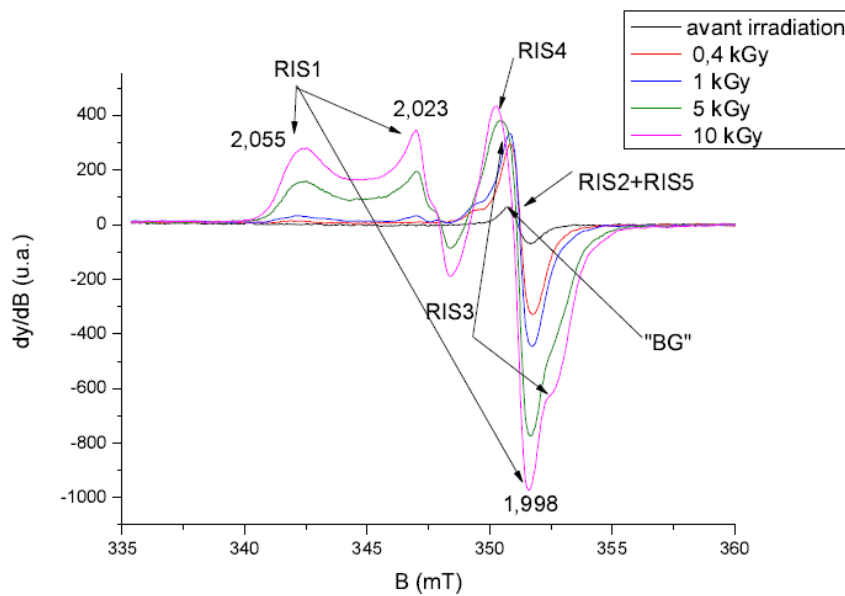


Figure 31 Spectre RPE en bande X d'un ongle irradié à différentes doses. Les 5 signaux radio-induits *RIS* y sont représentés. Figure de Trompier et al., (2014).

Les propriétés des signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5* :

De récents travaux en dosimétrie d'accident ont reporté la caractérisation de deux signaux radio-induits présents entre 1 et 100 Gy : le *RIS 2* et le *RIS 5* respectivement définis par un facteur *g* de 2,004 et 2,005 [Trompier et al., 2014]. Une étude menée sur plusieurs échantillons d'ongles a notamment permis de montrer que l'intensité du *RIS 2* variait

linéairement avec la dose absorbée jusqu'à environ 125 Gy [Trompier et al., 2009] alors que celle du *RIS 5* variait de manière parabolique avec la dose absorbée [Trompier et al., 2014] comme le montre la figure 32. Il a notamment été suggéré que la dose pour laquelle l'intensité du *RIS 5* est maximale (appelée dose de saturation) est identique pour un individu donné et ce, quelque soit l'ongle prélevé (mains, pieds). En revanche, une cohorte de 10 individus a été évaluée et montre une très forte disparité de cette dose de saturation entre les différents individus de 28 à 60 Gy [Marciniak et al., 2016].

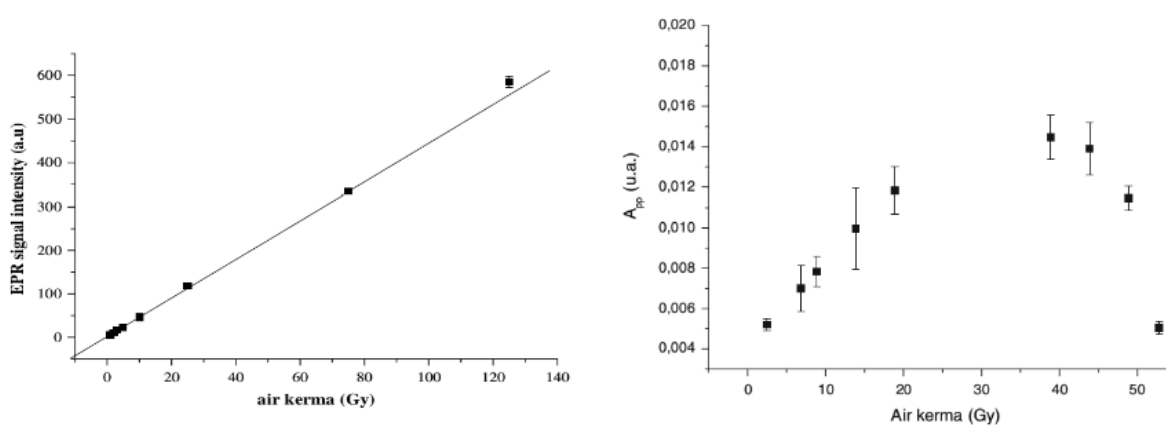


Figure 32 : a) Variation de l'intensité pic à pic du *RIS 2* en fonction de la dose exprimée en kerma dans l'air (grays). b) Variation de l'intensité pic à pic du *RIS 5* en fonction de la dose exprimée en kerma dans l'air (grays).

Figures de Trompier et al., (2014).

Les signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5* réagissent différemment au contact de l'eau. Si l'intensité du *RIS 2* diminue très rapidement, voire disparaît entièrement lors de l'humidification de l'échantillon, celle du *RIS 5* reste stable. Les conditions de stockage des échantillons post-accident ont donc un impact crucial sur la décroissance de la composante radio-induite *RIS 2* [Sholom et al., 2017, Zhang et al., 2016, Trompier et al., 2007]. Le fait de stocker les échantillons à basse température, -20 °C [Trompier et al., 2007] ou sous vide [Sholom et al., 2017] permet d'éviter cette diminution d'intensité. En revanche, si les échantillons sont laissés à température ambiante (20 °C), alors l'intensité du signal radio induit *RIS 2* diminue d'un facteur 2 en moins de 24 heures pour un taux d'humidité de l'ongle initiale proche des taux in vivo (7 % massique) [Trompier et al., 2009]. Il a également été montré que la décroissance du signal est corrélée à la teneur en humidité de l'ongle [Trompier et al., 2009]. Ainsi, le *RIS 2* est aussi stable qu'à basse température lorsqu'il est généré dans

des ongles déshydratés mais décroît en quelques heures lorsque l'ongle possède un taux d'hydratation de 10 % avant irradiation. Dès lors, on comprend qu'un simple lavage des mains de la victime irradiée conduirait à une élimination partielle ou totale de la composante *RIS 2* ce qui est problématique et empêche d'envisager toute utilisation dans des conditions réelles d'accident. Il est donc surprenant que la communauté scientifique continue à élaborer des protocoles de dosimétrie RPE basés uniquement sur cette composante instable qu'est le *RIS 2* [Sholom et al., 2017 et 2016, Wang et al., 2015] sachant qu'il est très rare qu'une victime d'accident radiologique stocke spontanément ses ongles dans un congélateur ou sous vide juste après l'irradiation. En 2014 pour palier ce problème, l'IRSN a développé un protocole de dosimétrie RPE pour les fortes doses (plusieurs dizaines de grays) en utilisant le signal radio-induit stable mais très peu intense, le *RIS 5* et en se basant sur ce phénomène de saturation du signal avec la dose [Trompier et al., 2014]. Ce protocole est présenté en annexe.

La nature des radicaux responsables du *RIS 2* et du *RIS 5* :

Concernant l'origine des signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5*, seule l'origine radicalaire du *RIS 2* a été étudiée au cours de ces dernières années étant donné que le *RIS 5* n'a été découvert que récemment en 2014 [Trompier et al., 2014]. Dans un premier temps, Symons et al., (1995) ont émis l'hypothèse que le signal radio-induit global provenait d'un ensemble de plusieurs signaux qui se superposent. L'origine de ces signaux serait liée à des radicaux libres secondaires intrinsèquement stables, produits finaux de réactions chimiques faisant intervenir les radicaux primaires radio-induits et l'environnement (dioxygène, eau, molécules voisines...) [Symons et al., 1995] sans donner davantage d'informations. D'après les travaux de Trompier et al., (2014) l'hypothèse la plus probante pour expliquer l'origine radicalaire du *RIS 2* serait le radical sulfonyl $\text{RSO}_2^\bullet$, hypothèse en accord avec les calculs des facteurs *g* de Sevilla et al., (1988, 1987). Enfin, Tipikin et al., (2016) montrent par le biais de calculs de chimie quantique couplés à des mesures RPE à haute fréquence micro-onde (bande W, 90 GHz) que les facteurs *g* mesurés et calculés coïncident avec ceux d'un radical semiquinone anionique. Cette hypothèse n'avait pas été retenue dans le passé car la semiquinone était connue pour être produite dans les tissus kératinisés par la dégradation de la mélanine qui n'est pas présente normalement dans les ongles. Cependant Tipikin et al., (2016) ont montré que d'autres mécanismes de production étaient connus, notamment en faisant intervenir les

molécules de DOPA générées à partir de la tyrosine. Il aurait été néanmoins très intéressant de poursuivre cette étude par des simulations numériques pour conforter cette hypothèse. Enfin, les signaux *RIS 3* et *RIS 4* ont pour origine radicalaire les mêmes radicaux que le *MIS 3* et le *MIS 4* mais générés différemment [Trompier et al., 2014], à savoir respectivement un radical centré sur un carbone et couplé avec 1 ou 2 protons pour le *RIS 3*, et un radical soufré pour le *RIS 4*. Il aurait été néanmoins très intéressant de poursuivre cette étude par des simulations numériques pour conforter cette hypothèse. Enfin, les signaux *RIS 3* et *RIS 4* ont pour origine radicalaire les mêmes radicaux que le *MIS 3* et le *MIS 4* mais générés différemment [Trompier et al., 2014], à savoir respectivement un radical centré sur un carbone et couplé avec 1 ou 2 protons pour le *RIS 3*, et un radical soufré pour le *RIS 4*.

La problématique des faibles doses :

Il est nécessaire d'insister sur le fait que l'étude de la composante radio-induite stable, le *RIS 5*, n'est pas chose aisée. En effet, ce signal centré en $g = 2,004$ se superpose à la fois à une composante mécaniquement induite, le *MIS 2*, et également à une composante endogène, le *BKS*, ce qui constitue une véritable difficulté dans l'estimation des doses, et l'intensité seule du *RIS 5* est nettement inférieure à celles des autres composantes [Trompier et al., 2014]. En ce sens, Reyes et al., (2012) ont observé qu'une conservation à l'air libre et à la température ambiante des échantillons irradiés engendrait une augmentation du signal global les 3-4 mois suivants jusqu'à saturation où l'intensité valait 2 à 3 fois celle initiale. Ils ont émis l'hypothèse que l'augmentation du signal total est lié à la contribution des radicaux mécaniquement induits qui augmente lors du séchage de l'ongle. En d'autres termes, plus l'échantillon est sec, plus les contraintes mécaniques au sein de celui-ci sont importantes, et plus l'intensité du *MIS 2* l'est également. Ces mêmes auteurs ont conclu que le niveau de stress mécanique ainsi que la teneur en eau dans l'échantillon étaient des paramètres cruciaux dans l'estimation des doses et qu'ils affectaient la reproductibilité des mesures.

Afin de mieux discerner le *RIS 5* des autres composantes, certains auteurs recommandent de travailler sur des échantillons d'ongles préalablement traités dans l'eau afin de n'avoir que deux contributions dans les signaux RPE : le *BKS* et le *RIS 5* et donc de s'affranchir d'une quelconque contribution des signaux mécaniquement induits [Trompier et

al., 2014]. Seulement, le signal endogène *BKS* et le signal radio-induit *RIS 5* se superposent. De plus, le *BKS* est à la fois très variable et nettement plus intense que le *RIS 5*. Ainsi, l'estimation des « faibles doses » (que nous considérons entre 0 et 10 grays dans notre étude) est clairement problématique [Black et al., 2010, Romanyukha et al., 2010, Trompier et al., 2009, Reyes et al., 2008]. Il y a là une véritable limite à l'utilisation des ongles pour déterminer les faibles doses reçues par les victimes d'accident radiologiques d'autant plus que des doses de seulement quelques grays provoquent d'ores et déjà de graves effets déterministes biologiques (5 Gy localisés au niveau des mains provoquent de grave brûlures radio-dermiques par exemple). Évidemment, dans des conditions de laboratoire et en ayant mesuré les échantillons avant irradiation pour déterminer l'intensité du *BKS*, il est possible d'estimer des doses de l'ordre du gray. Cependant, dans des situations réelles, sans évaluation préalable de ce dernier et compte tenu de sa variabilité, la limite de détection a été estimée à 2,1 Gy.

L'impact des produits chimiques :

Un autre facteur important qui peut affecter l'intensité des signaux radio-induits et, par conséquent, les résultats de la dosimétrie, est l'influence des produits chimiques entrant en contact avec les ongles avant ou pendant l'irradiation. Les effets des vernis et des dissolvants sur le signal endogène, sans irradiation préalable ont été étudiés récemment [Trompier et al., 2015]. La nature même des radicaux présents dans les vernis à ongles diffèrent d'une couleur à l'autre et également selon les marques. Toujours est-il, les vernis étudiés rajoutent des signaux parasites qui se superposent au signal endogène. Par chance, ces signaux sont facilement éliminables par un simple traitement des ongles à l'acétone. Il pourrait être intéressant de poursuivre cette étude en caractérisant l'impact de ces cosmétiques pendant l'irradiation sur les signaux radio-induits et d'évaluer s'ils pourraient être utilisés à des fins dosimétriques si ces derniers présentent une réponse spécifique à la dose d'irradiation.

Le recours à des produits chimiques pour traiter les ongles avant la mesure RPE, en agissant sélectivement sur l'intensité d'une des composantes, pourrait éventuellement permettre d'extraire, avec un protocole adapté, l'intensité du *RIS 5*. Des essais ont été réalisés en ce sens et Romanyukha et al., (2007) ont montré que le traitement d'ongles irradiés dans

une solution aqueuse de 0,1 M de dithiothréitol (DTT) suivi d'un rinçage à l'eau puis d'un séchage à l'acétone permettait de réduire d'un facteur 10 l'amplitude du signal RPE d'intérêt, et ce dans une gamme de dose de 0 à 8 Gy [Romanyukha et al., 2007]. Cependant, ce traitement chimique modifie également l'intensité du signal radio-induit et également l'allure des courbes de réponse en dose. L'utilisation de réactifs chimiques pour extraire sélectivement la composante radio-induite d'intérêt (*RIS 5*) est un concept qui serait intéressant de développer.

Dans une récente étude, Tipikin et al., (2016) en tentant d'identifier la nature radicalaire du *RIS 2*, ont été surpris par la repousse d'un signal similaire lorsque l'échantillon d'ongle irradié était traité par une solution oxydante. Leurs investigations les ont menés à irradier différents échantillons pour créer et mesurer le *RIS 2*, puis de le détruire par un traitement dans l'eau et d'oxyder les échantillons avant d'effectuer une ultime mesure. Le signal mesuré après ce dernier traitement chimique était du même ordre de grandeur que le *RIS 2* (les données ne sont toutefois pas fournies dans l'article) et les caractéristiques spectrales étaient identiques à celle du *RIS 2*. Cependant, les auteurs n'ont observé aucune corrélation avec la dose absorbée.

En résumé :

Dans l'intervalle de dose qui nous intéresse, à savoir entre 0 et 100 grays, seuls deux signaux radio-induits sont observables. L'un très intense, dont l'intensité varie linéairement avec la dose absorbée, qui a été nommé *RIS 2*, et l'autre, le *RIS 5*, faible en intensité et qui varie de manière parabolique et dont la dose de saturation diffère d'un individu à l'autre.

Le *RIS 2* est assujetti à une forte décroissance liée au taux d'humidité ambiant et un simple lavage à l'eau peut l'éliminer complètement. Si certaines conditions de stockage permettent de limiter sa décroissance, elles n'en demeurent pas moins compliquées à mettre en place dans des conditions réelles d'accident, rendant illusoire tout espoir d'application en dosimétrie RPE. En revanche, le deuxième signal spécifique à l'irradiation, le *RIS 5*, est résistant à l'eau et il est envisageable de l'utiliser en dosimétrie. Le problème majeur réside dans le fait qu'il est peu intense et qu'il se superpose à l'intense signal endogène *BKS*.

Si un protocole d'estimation des fortes doses (supérieures à 10 Gy) a été mis en place récemment, principalement pour les situations d'irradiation localisée aux mains, il n'en existe pas à ce jour pour les doses plus faibles. Notons également qu'un tel protocole pourrait éventuellement avoir un rôle déterminant dans le cas d'irradiation corps entier.

Tableau 5 : Caractéristiques des différents signaux observables par spectroscopie RPE dans les ongles [Trompier et al., 2014]

Origine du signal	Nomenclature	Caractéristiques spectrales	Origine radicalaire	Propriétés physico-chimiques
Endogène	<i>BKS</i>	$g = 2,004$	Inconnue	Stable thermiquement Intensité liée au taux d'humidité (réversible)
Stress mécanique	<i>MIS 1</i>	$g_1 = 2,055$	$\text{RSS}^{\bullet}$	Éliminable avec H_2O
		$g_2 = 2,024$		
		$g_3 = 1,998$		
		$a_H = 0,85 \text{ mT}$		
	<i>MIS 2</i>	$g = 2,004$	$\text{RSO}_2^{\bullet}$	Éliminable avec H_2O
	<i>MIS 3</i>	$g = 2,004$	$\text{C}^{\bullet}$ couplé avec 1 ou 2 protons	Éliminable avec H_2O et au contact d' O_2
		$a_H = 2,0 \text{ mT}$		
	<i>MIS 4</i>	$g_1 = 2,025$	$\text{RSO}^{\bullet}$	Éliminable avec H_2O
		$g_2 = 2,008$		
		$g_3 = 2,003$		
		$a_H = 1,5 \text{ mT}$		
Irradiation	<i>RIS 1</i>	$g_1 = 2,055$	$\text{RSS}^{\bullet}$	Éliminable avec H_2O Apparaît aux fortes doses ($> 100 \text{ Gy}$)
		$g_2 = 2,024$		
		$g_3 = 1,998$		
		$a_H = 0,85 \text{ mT}$		
	<i>RIS 2</i>	$g = 2,005$	$\text{RSO}_2^{\bullet}$	Éliminable avec H_2O Dominant pour doses d'intérêt ($0 - 100 \text{ Gy}$)
	<i>RIS 3</i>	$g = 2,004$	$\text{C}^{\bullet}$ couplé avec 1 ou 2 protons	Éliminable avec H_2O Apparaît aux très fortes doses ($> 1000 \text{ Gy}$)
		$a_H = 2,0 \text{ mT}$		
	<i>RIS 4</i>	$g_1 = 2,025$	$\text{RSO}^{\bullet}$	Éliminable avec H_2O Apparaît aux fortes doses ($> 100 \text{ Gy}$)
		$g_2 = 2,008$		
		$g_3 = 2,003$		
		$a_H = 1,5$		
	<i>RIS 5</i>	$g = 2,004$	Inconnue	Stable thermiquement résistant à l'eau Apparaît aux doses d'intérêt ($0 - 100 \text{ Gy}$)

5 Les dispositifs d'irradiation à l'IRSN

Dans le cadre de notre sujet d'étude, les échantillons ont souvent dû être irradiés afin de générer les radicaux radio-induits définis dans le chapitre précédent. Pour ce faire, nous avons eu recours à plusieurs types de source de rayonnements qu'ils soient ionisants ou non. Concernant les rayonnements ionisants, il s'agissait d'une source de ^{137}Cs émettrice de photons gamma avec une énergie moyenne de 0,66 MeV, ou bien d'un générateur de rayons X de haute énergie, typiquement 20 MV (installation « Alphé » à l'IRSN). L'étude sur les rayonnements non-ionisants a été réalisée à l'aide d'une lampe UV générant des UVA (365 nm), UVB (302 nm) et UVC (254 nm) avec une fluence énergétique respectivement égale à $1,85 \text{ mW.cm}^{-2}$, $11,14 \text{ mW.cm}^{-2}$ et $1,93 \text{ mW.cm}^{-2}$.

La réponse des signaux radio-induits en fonction de la nature (photons, électrons, protons, neutron...) ou de l'énergie des rayonnements incidents n'a pas été étudiée. En règle générale, les matériaux utilisés dans le cadre de la dosimétrie par spectroscopie RPE présentent des rendements radiolytiques bien différents selon le type de particules ou de l'énergie des rayonnements incidents [Trompier, 2012]. Il a été montré que les rendements associés aux neutrons étaient nettement inférieurs à ceux associés aux photons [Trompier et al., 2008, Hervé et al., 2006]. Or, la plupart des accidents radiologiques rencontrés jusqu'à présent impliquent principalement des rayons γ ou X et c'est la raison pour laquelle nous avons principalement irradié nos échantillons à l'aide de ce type de sources.

6 Le choix des outils de traitement des spectres RPE

6.1 Les logiciels de simulation spectrale

Il existe un certain nombre de logiciels dédiés à la simulation des spectres RPE tels que Easyspin [Stoll & Schweiger, 2006] WinSim [Duling et al., 1994] tous deux gratuits mais non libres ou encore Xsophe, SpinFit et SimFonia qui sont des logiciels commerciaux non libres développés par la société Bruker.

6.1.1 Les logiciels commerciaux Bruker

Une étape fondamentale dans le processus d'analyse des données est l'obtention de simulations fiables et robustes des spectres RPE étudiés. À l'époque, cette démarche nécessitait le développement de programmes de simulation spécifiques au système étudié. Afin de surmonter de telles limitations, la société Bruker commercialise un ensemble de logiciels de simulations spectrales pour répondre aux besoins de simulations des chercheurs en spectroscopie RPE. À ce jour, on retrouve les logiciels Xsophe, SpinFit et SimFonia. Ils permettent de simuler des systèmes complexes en onde continue. Ces logiciels reposent sur la théorie des perturbations et prennent en compte un grand nombre de paramètres RPE pour fournir la meilleure description du spectre mesuré. Les matrices de facteurs g , les constantes de couplage hyperfin et autres paramètres peuvent être ajustés avec une flexibilité totale. Il existe également des routines permettant l'estimation de la concentration des spins électroniques au sein du système étudié.

6.1.2 Easyspin

Easyspin est un outil de simulation spectrale et d'analyse en RPE gratuit mais non « open-source » et développé sous Matlab par le Dr. Stefan Stoll en 2006 [Stoll & Schweiger, 2006]. Easyspin fournit de nombreuses fonctionnalités étendues en spectroscopie RPE, allant de la physique des spins élémentaires à l'analyse de données. En outre, il fournit des routines pour la simulation de spectres RPE à l'état liquide et solide (figure 33). Ces fonctions de simulation sont basées sur une série d'algorithmes présentés comme novateurs par l'amélioration de la portée, de la vitesse et de la précision des simulations spectrales réalisées.

Rappelons qu'il est nécessaire que l'utilisateur connaisse les caractéristiques spectrales de l'entité paramagnétique étudiée, et ce afin de pouvoir la simuler car, à ce jour, il n'existe pas de base de données universelle. La structure de cet outil numérique ainsi que son contexte théorique sont présentés dans la série d'articles suivants : [Stoll & Schweiger, 2006, Stoll & Britt, 2009, Stoll, 2015].

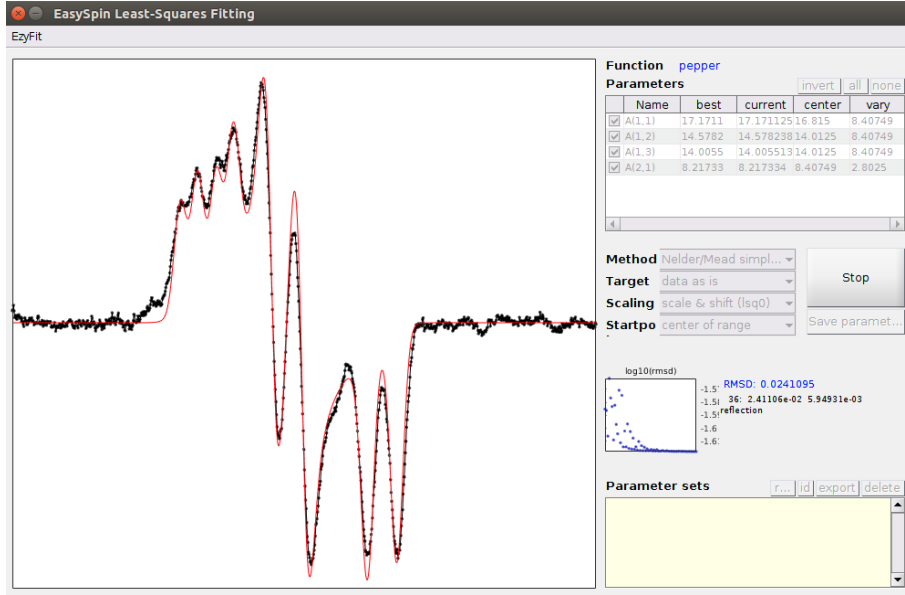


Figure 33 : Capture d'écran d'une simulation spectrale via Easyspin sur un spectre expérimental d'un cofacteur à Mo d'une protéine à 55 K. Source : VIe École Thématique de l'ARPE, Obernai, 2016.

L'écart moyen entre le modèle théorique (simulation spectrale) et le spectre expérimental est un indicateur pour voir à quel point le modèle théorique représente correctement l'expérience. On appelle cet indicateur le *RMSD* ou « Root Mean Square Deviation » (équation 23) :

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - Y_i)^2}{N}} \quad (23)$$

où X_i et Y_i sont respectivement les i -èmes ordonnées du spectre expérimental et simulé et N le nombre total de points échantillonnés.

6.1.3 EPR-WinSim

Le National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) a également produit un logiciel gratuit mais non « open-source » pour l'analyse par spectroscopie RPE depuis 1983. Ce logiciel permet, comme ses semblables, de simuler de nombreux spectres RPE afin de valider d'éventuelles hypothèses quant à la nature des entités paramagnétiques étudiées. Cependant, le logiciel n'a pas été mis à jour depuis 2011.

Pour ce travail de thèse, j'ai choisi l'outil de simulation spectrale Easyspin. En effet, tous mes traitements numériques se font sous Matlab et Easyspin, qui a largement fait ses preuves au sein de la communauté RPE, utilise également cette plateforme.

6.2 L'outil de traitement numérique *Chebfun*

L'analyse et la manipulation de données discrètes digitalisées soulèvent plusieurs questions comme rappelé dans la partie « 4.2 Les difficultés liées à l'analyse des spectres RPE des ongles ». En effet, l'opérateur peut avoir des doutes quant aux réelles valeurs d'absorption mesurées ainsi que dans les zones où aucun point n'a été échantillonné. En pratique, chaque laboratoire développe et utilise ses propres pratiques d'analyse pour pallier cette difficulté. **Ainsi se pose la problématique suivante : comment traiter un ensemble de données discrètes de manière univoque, reproductible, fiable et si possible, rapidement ?**

Dans le cadre de cette thèse de doctorat, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec l'IRCP de Chimie-ParisTech qui, par de récentes études dans le domaine de l'imagerie RPE [El Afit et al., 2016], a montré qu'il était possible de limiter ces difficultés d'analyse à l'aide de la « technologie Tchebychev » présentée ici. L'objet de cette partie n'est pas de rentrer dans d'exhaustives et rigoureuses démonstrations mathématiques mais simplement de faire ressentir au lecteur cette vision particulière de traiter des fonctions plutôt que des données discrètes. En ce sens je tente d'expliquer avec des termes simples le concept de base sous-jacent à cette technique et surtout de convaincre quant à son réel intérêt en spectroscopie RPE.

Nous expliquerons ici les différentes étapes pour représenter des spectres RPE théoriques sous forme de fonctions mathématiques uniques et propres à chacun d'eux. Le traitement numérique des spectres expérimentaux sera présenté plus loin dans le chapitre.

Les débuts de la « technologie Tchebychev » remontent au mathématicien russe Pafnuty Tchebychev (1821-1894) et à ses descendants mathématiques tels que Zolotarev et Bernstein (1880-1968). Ces scientifiques ont réalisé que tout comme les séries de Fourier fournissent un moyen efficace de représenter une fonction périodique lisse, les séries de polynômes de Tchebychev peuvent faire la même chose pour une fonction lisse non périodique. Le projet Chebfun a débuté en 2002 à l'Université d'Oxford avec Zachary Battles et Nick Trefethen [Driscoll et al., 2014]. Un « chebfun » est une fonction d'une unique variable et définie sur un intervalle $[a, b]$. La particularité d'un chebfun est de traiter les fonctions exactement de la même manière que les vecteurs sous Matlab. L'avantage majeur d'un chebfun est qu'il permet de transformer une fonction continue quelconque en une fonction polynomiale nettement plus simple à appréhender. De plus, les polynômes de Tchebychev, contrairement aux autres techniques d'interpolation, minimisent les oscillations entre les points échantillonnés. Notons également qu'un des points forts de Chebfun est qu'il permet de trouver automatiquement le bon degré du polynôme dans le but de représenter chaque fonction avec une précision machine, c'est-à-dire à 10^{-15} [Battles and Trefethen, 2004, Platte and Trefethen, 2008, Trefethen, 2015].

L'approche d'un *chebfun* est la suivante : **représenter approximativement (à la précision machine soit à 10^{-15} près) une fonction continue quelconque par une fonction polynomiale**. En ce sens, l'approche originale qui a été développée à l'IRCP de Chimie-ParisTech est la suivante : **un ensemble de données expérimentales peut être représenté par un unique polynôme et les résultats obtenus à l'aide de cette fonction sont les mêmes que ceux obtenus à partir des données brutes au bruit près**. Mais alors, quel est l'intérêt de passer par une telle transformation si les résultats finaux sont identiques au bruit près ? Le dernier chapitre de ce manuscrit apportera ces réponses.

6.2.1 La représentation des spectres sous forme de polynômes de Tchebychev

Considérons un spectre RPE théorique quelconque défini par les facteurs g donnés par $g_1=1,9950$, $g_2=2,0120$ et $g_3=2,0440$, de largeur de raie égale à 2,00 mT et échantillonné uniformément sur 100 points comme présenté dans la figure 34. Le choix du spectre RPE n'a pas d'importance puisqu'il s'agit simplement d'illustrer le potentiel de l'outil numérique *Chebfun*.

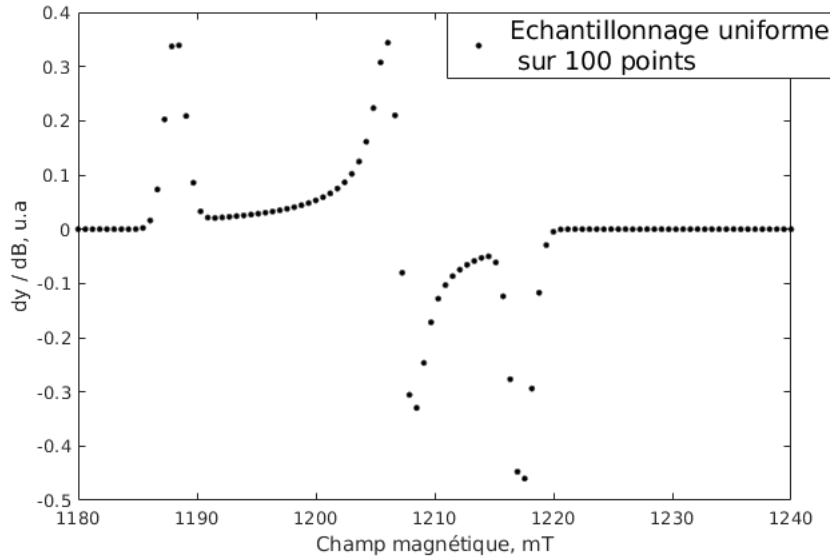


Figure 34 : Spectre RPE théorique rhomboédrique défini par les facteurs g suivants, $g_1=1,9950$, $g_2=2,0120$, $g_3=2,0440$, une largeur de raie de 2,00 mT et échantillonné uniformément sur 100 points

L'utilisation de l'outil numérique *Chebfun* sous Matlab permet de générer, à partir d'un ensemble de données discrètes, une seule et unique fonction polynomiale dite de Tchebychev si l'échantillonnage a été réalisé sur des points particuliers appelés « nœuds de Tchebychev » (équation 24) :

$$x_i = -\cos\left(\frac{i\pi}{N}\right), \quad 0 \leq i \leq N \quad (24)$$

Lors d'une expérience de spectroscopie RPE, le champ magnétique B est balayé uniformément sur N points dans un intervalle $[a, b]$ tel que $B_{i,uniforme} = a + \frac{(b-a)}{N}i$ avec

$i \in [0, N]$ et à chaque valeur du champ magnétique $B_{i, \text{uniforme}}$ est associée une valeur d'absorption notée y_i . En revanche, lorsqu'on considère un échantillonnage sur les nœuds de Tchebychev, les valeurs du champ magnétique pour lesquelles l'absorption y_i va être mesurée sont différentes : $B_{i, \text{Tchebychev}} = \frac{1}{2}(a+b) - \frac{1}{2}(b-a) \cos(i \frac{\pi}{N})$ avec $i \in [0, N]$. La figure 35 représente ces deux méthodes d'échantillonnage.

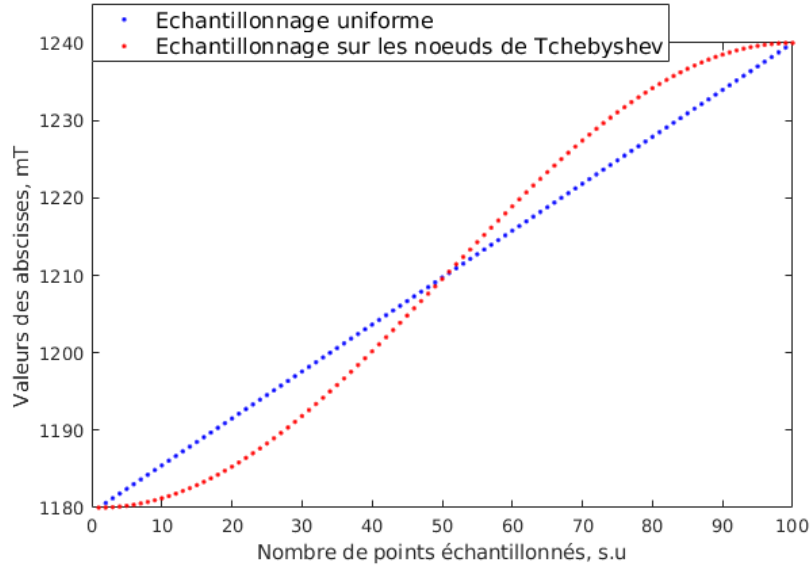


Figure 35 : Représentation de l'échantillonnage uniforme (en bleu) et sur les nœuds de Tchebychev (en rouge) sur 100 points.

L'approche « Relativistic Sampling Principle » (RSP) développé par Yann Le Du à l'IRCP de PSL-Chimie ParisTech en 2018 [Le Du et al., 2018] permet de passer d'un échantillonnage uniforme à un échantillonnage sur les nœuds de Tchebychev via la relation 25.

$$B_{i,uniforme} = a + \frac{(b-a)}{N} i \quad \text{donc} \quad i = \frac{(B_{i,uniforme} - a)}{(b-a)} N$$

Dans le cadre du RSP, on utilise un « boost » qui consiste à remplacer i dans

l'échantillonnage sur les nœuds de Tchebychev de la façon suivante : (25)

$$B_{i,Tchebychev} = \frac{1}{2}(a+b) - \frac{1}{2}(b-a) \cos\left(\frac{B_{i,uniforme} - a}{(b-a)} N \frac{\pi}{N}\right)$$

$$B_{i,Tchebychev} = \frac{1}{2}(a+b) - \frac{1}{2}(b-a) \cos\left(\frac{B_{i,uniforme} - a}{(b-a)} \pi\right)$$

Ainsi, il est parfaitement possible de passer simplement d'un échantillonnage uniforme à un échantillonnage sur les nœuds de Tchebychev grâce à la relation 25. De plus, connaissant les ordonnées du spectre $\{y_i\}$ aux points échantillonnés, il est possible de générer une unique fonction polynomiale, notons la p , dont les valeurs en dehors des nœuds $B_{Tchebychev}$ sont déterminées par la formule d'interpolation barycentrique de Salzer [Salzer et al., 1972] (équation 26) :

$$p(x) = \frac{\sum_{i=0}^N \frac{w_i}{x - x_i} y_i}{\sum_{i=0}^N \frac{w_i}{x - x_i}} \quad (26)$$

$$\text{avec } w_j = \frac{-1^j}{2} \text{ si } j = 0 \text{ ou } N, \quad w_j = -1^j \text{ sinon.}$$

En d'autre termes, on connaît les valeurs d'absorption aux points échantillonnés mais également en dehors de ces points.

L'outil numérique *Chebfun* nous permet donc de passer d'un ensemble de données discrètes à une seule et unique fonction polynomiale p comme le montre la figure 36. La différence entre les ordonnées originales $\{y_i\}$ aux abscisses $B_{i,uniforme}$ et les valeurs $p(B_{i,Tchebychev})$ est également représentée dans la figure 36.

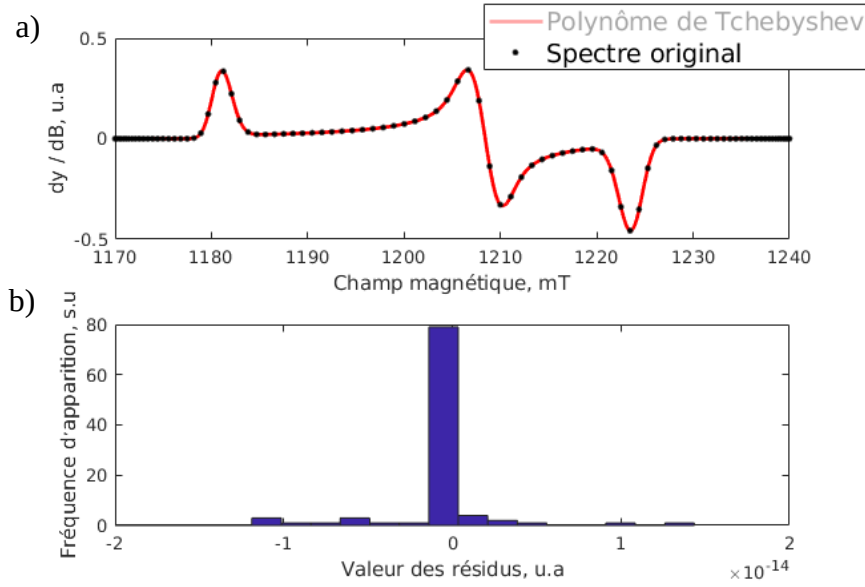


Figure 36 : a) Spectre RPE théorique original échantillonné uniformément sur 100 points (points noirs) et polynôme de Tchebychev associé (rouge). b) Histogramme des résidus entre le spectre original et la fonction polynomiale interrogée aux nœuds de Tchebychev. La majorité des résidus est centrée autour de $-5,19 \cdot 10^{-16}$ qui est inférieur à la valeur caractéristique de la précision machine (10^{-15}).

La distribution de la différence entre les ordonnées du spectre original $\{y_{ij}\}$ et les valeurs $p(B_{i,Tchebyshev})$ est centrée autour de 10^{-15} , valeur caractéristique de la précision machine. En d'autres termes, la fonction polynomiale p permet de représenter les ordonnées d'origines $\{y_{ij}\}$ à 10^{-15} près en plus de permettre l'estimation des valeurs d'absorption dans les zones où il n'y a pas de points échantillonnés. Pour ce faire, il suffit d'interroger la fonction p à l'abscisse souhaitée. Remarquons déjà qu'en dehors des points échantillonnés, la précision ne sera évidemment pas de 10^{-15} près mais sera évaluée au bruit comme nous le montrerons.

L'outil *Chebfun* permet de représenter un ensemble de données discrètes propres aux spectres RPE par une unique fonction polynomiale si l'échantillonnage a été effectué sur les nœuds de Tchebychev. En règle générale, l'échantillonnage étant uniforme, il a fallu développer une approche dite « Relativistic Sampling Principle » [Yann Le Du et al., 2018] pour générer les valeurs en ces nœuds particuliers. Le traitement numérique d'une fonction mathématique polynomiale satisfait aux critères de reproductibilité, fiabilité et rapidité.

Avant la mise au point du RSP qui suppose des transformations par *boost* d'un « référentiel d'échantillonnage » à l'autre, il existait une autre façon de traiter les données échantillonnées uniformément comme nous allons le voir.

6.2.2 Les polynômes de Tchebychev « uniformes »

Georges Klein a implémenté en 2011 dans *Chebfun* l'algorithme d'interpolation d'Hormann-Floater [Floater & Hormann, 2007] qui permet de générer les polynômes de Tchebychev à partir d'ensembles de données discrètes échantillonnées uniformément. Pour travailler avec les données échantillonnées uniformément, il est nécessaire de connaître les valeurs aux nœuds de Tchebychev. Or, n'ayant les valeurs qu'aux nœuds uniformes, une interpolation de ces valeurs aux nœuds de Tchebychev doit être effectuée pour ensuite générer les polynômes de Tchebychev que nous appellerons « Polynômes de Tchebychev uniformes ». Le lecteur désirant obtenir de plus amples informations peut se référer aux travaux d'Hormann et Floater [Floater & Hormann, 2007] et à ceux de Driscoll, Hale et Trefethen [Driscoll et al., 2014].

La figure 37 représente le spectre théorique, de la partie précédente (34), échantillonné uniformément ainsi que son « Polynôme de Tchebychev Uniforme » associé. La distribution des résidus, à savoir la différence entre les ordonnées du spectre original $\{y_i\}$ et les valeurs $p(B_{i,uniforme})$, y est également représentée.

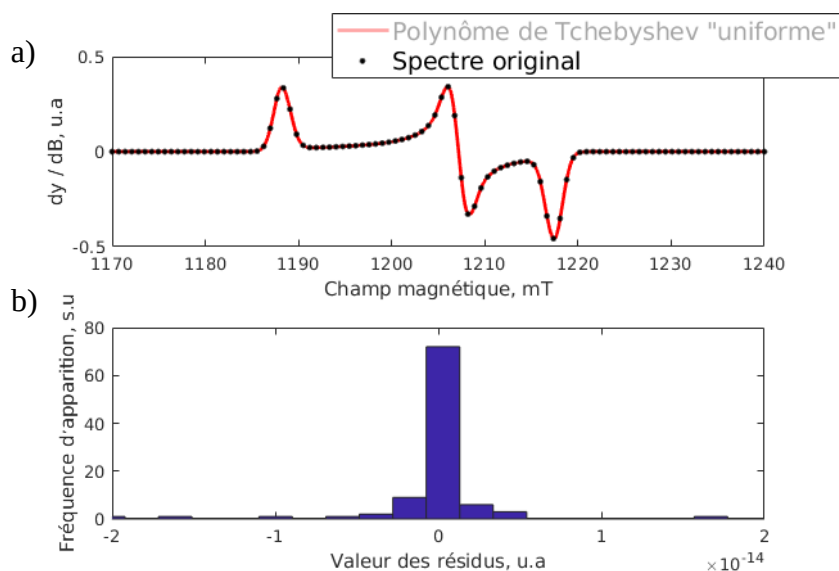


Figure 37 : a) Spectre RPE théorique échantillonné uniformément sur 100 points (points noirs) et son polynôme de Tchebychev associé (rouge). b) Histogramme des résidus entre le spectre original et la fonction polynomiale interrogée sur les nœuds de Tchebychev. La majorité des résidus est centrée autour de $2,96.10^{-16}$ qui est inférieure à la valeur caractéristique de la précision machine (10^{-15}).

Cette nouvelle version du polynôme de Tchebychev permet de manipuler cette fonction directement aux abscisses du champ magnétique échantillonnées uniformément. Cette approche ne nécessite pas de changement de référentiel comme c'est le cas du RSP mais nécessite cependant une interpolation [Floater & Hormann, 2007].

De plus, les polynômes de Tchebychev « uniformes » ne nécessitent que quelques centaines de points échantillonnés alors qu'en pratique, les spectres RPE sont acquis avec plusieurs milliers de points expérimentaux (selon l'intervalle du champ magnétique balayé). Autrement dit, pour obtenir un spectre RPE de qualité « similaire » au polynôme de Tchebychev obtenu sur un spectre RPE de 100 points, il faudrait effectuer une acquisition spectrale avec une infinité de points ce qui n'est pas réalisable en pratique (figure 38).

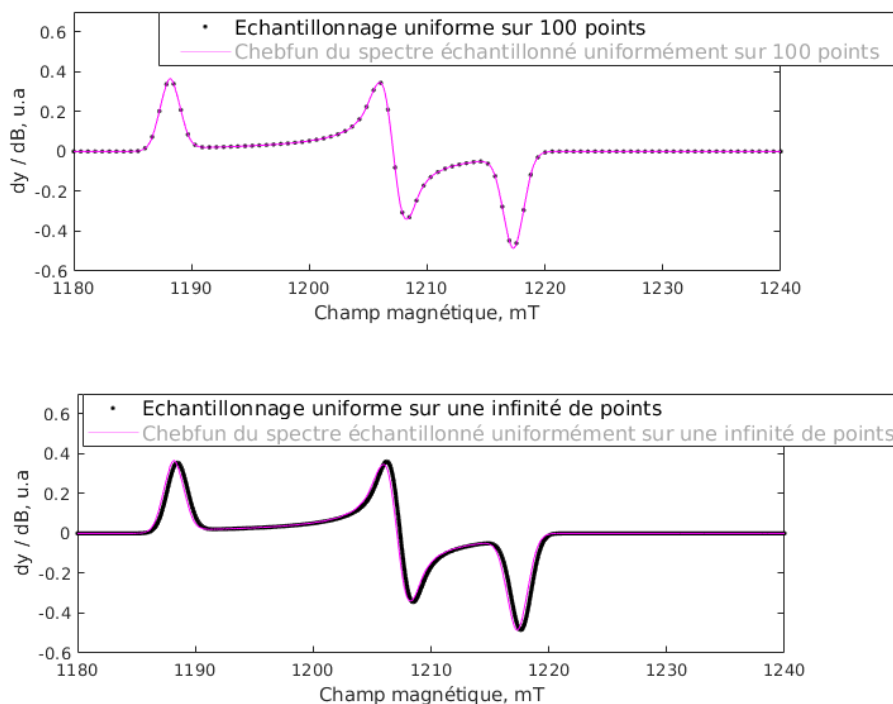


Figure 38 : a) Spectre RPE échantillonné uniformément sur 100 points et le polynôme de Tchebychev associé.
b) Spectre RPE échantillonné uniformément sur 100 000 points et le polynôme de Tchebychev associé au spectre échantillonné sur 100 points.

Maintenant, comment peut-on extraire les variables d'intérêt que sont, par exemple, l'intensité du spectre (aire sous la courbe d'absorption), les amplitudes des signaux ou bien les largeurs des raies ? Avec cette fonction polynomiale p , c'est très simple, il suffit d'exécuter les commandes basiques de Matlab, à savoir « min », « max », « cumsum », « diff » et « sum » qui, respectivement, permettent d'obtenir les ordonnées maximales ou minimales avec leurs abscisses associées, la primitive ou la dérivée du spectre RPE, et de calculer simplement les aires sous ces courbes, dans l'intervalle choisi. En ce sens, la figure 39 permet d'illustrer les spectres d'absorption et les 1^{ère} et 2^d dérivées du spectre RPE et le tableau 6 répertorie les variables d'intérêt extraites. Le traitement numérique satisfait aux critères de reproductibilité, fiabilité et rapidité.

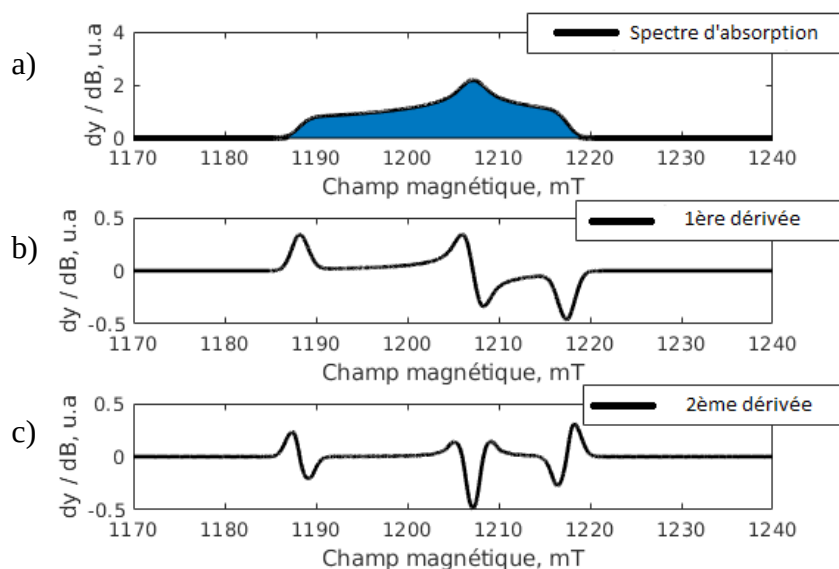


Figure 39 : Représentation du spectre RPE théorique original à l'aide de polynôme de Tchebychev. La primitive et la dérivée du spectre RPE sont obtenues instantanément et simplement à l'aide de commandes basiques de Matlab. a) Spectre d'absorption b) 1^{ère} dérivée c) 2nd dérivée.

Tableau 6 : Extraction de certaines variables d'intérêt du spectre RPE théorique à l'aide de la transformation des données discrètes en polynômes de Tchebychev.

Variable d'intérêt	Valeurs calculées à l'aide des polynômes de Tchebychev
Intensité (u.a) (Spectre absorption, a)	34,83 u.a
Largeurs des raies (mT) (Spectre 1 ^{ère} dérivée, b)	2,02 mT
Facteurs g (s.u) et amplitude « pic à pic » (u.a) (Spectre 1 ^{ère} dérivée, b)	g ₁ = 2,044 et H ₁ = 0,340 u.a g ₂ = 2,012 et H ₂ = 0,676 u.a g ₃ = 1,995 et H ₃ = 0,458 u.a

Au bilan, la transformation de données discrètes en polynômes de Tchebychev à l'aide du « Relativistic Sampling Principle » (RSP) est théoriquement plus solide car elle permet de générer ces fonctions sur les nœuds théoriques de Tchebychev contrairement à l'algorithme d'Hormann-Floater qui les calcule en effectuant une approximation à partir des nœuds équidistants.

Les résultats obtenus à l'aide des deux techniques sont similaires puisque que nous nous intéressons aux données RPE au bruit près et non à la précision machine près (actuellement, une précision à 10^{-15} près sur une amplitude ou une largeur de raie n'est pas exigée). De plus, l'utilisation du RSP nécessite un changement de référentiel qui rend les calculs d'extraction des variables plus compliqués. En ce sens, il faudrait intégrer ce changement de référentiel automatique dans les algorithmes de traitement numérique sous Matlab. Au cours de ce travail de thèse, malheureusement, nous n'avons pas pu développer toutes les idées que nous aurions voulues. Toutefois, il est envisageable de les réaliser par la suite.

Nous possédons un outil numérique, *Chebfun*, permettant de représenter un ensemble de données discrètes propres à l'acquisition du spectre RPE en une unique fonction polynomiale. Le traitement numérique d'une telle fonction est élémentaire, et l'extraction de variables d'intérêt vérifie les critères de reproductibilité, fiabilité, rapidité et surtout non opérateur-dépendante. L'outil *Chebfun* constitue un concept novateur et prometteur notamment pour la création de base de données universelle ou pour harmoniser les protocoles d'extraction de paramètres RPE inter-laboratoires à l'échelle internationale. Enfin, la génération des polynômes de Tchebychev des spectres RPE ne requière seulement quelques centaines de points échantillonnés. Or, en pratique, on acquière généralement plusieurs milliers de points expérimentaux (selon l'intervalle de champ magnétique balayé). Ainsi, cet outil pourrait permettre de faire gagner un temps considérable d'autant plus que le temps est un paramètre crucial en dosimétrie RPE d'accident radiologique.

*IV. Étude et caractérisation
du signal endogène et des
signaux radio-induits*

Chapitre IV

Étude et caractérisation du signal endogène et des signaux radio-induits.....95

1 Introduction.....	97
2 Le signal endogène <i>BKS</i>.....	99
2.1 Variabilité spectrale du signal endogène <i>BKS</i>	102
2.2 Caractérisation du signal endogène.....	108
2.3 Variabilité en intensité du signal endogène.....	133
2.4 Synthèse sur le signal endogène.....	141
3 Les signaux radio-induits.....	144
3.1 Le signal radio-induit <i>RIS 2</i>	145
3.2 Variabilité du signal radio-induit <i>RIS 2</i>	160
3.3 Le signal radio-induit <i>RIS 5</i>	166
3.4 Discussion sur le protocole de dosimétrie RPE des ongles développé par l'IRSN en 2014.....	173
3.5 Conclusion sur les signaux radio-induits.....	177
4 Synthèse des résultats et perspectives pour la dosimétrie RPE des ongles.....	179

1 Introduction

En cas d'irradiations aiguës localisées au niveau des mains, il est relativement compliqué d'estimer les doses de rayonnements ionisants reçues par la victime avec les méthodes de dosimétrie existantes et ce, notamment en cas de préhension de sources radioactives. Les scénarios étant complexes, la reproduction numérique de l'accident s'avère également délicate à mettre en œuvre. Jusqu'à présent, seule l'analyse RPE de prélèvements osseux pouvait fournir une information dosimétrique robuste mais avec un champ d'application limité (celle-ci étant possible après amputation). Afin de pallier cette difficulté, de nombreux chercheurs étudient la possibilité d'extraire ces informations cruciales en dosimétrie RPE à l'aide d'autres matériaux. À ce titre, les ongles offrent de nombreux avantages tels que, pour ne citer qu'eux, la facilité de prélèvement et une cartographie de la dose aux extrémités. L'information dosimétrique est d'autant plus pertinente qu'elle est fournie au plus tôt avant même l'apparition des premiers signes cliniques post-irradiation. La victime pourra ainsi bénéficier rapidement des traitements les mieux adaptés. Cependant, l'analyse des spectres RPE des ongles reste difficile et de nombreux paramètres influent à la fois sur la production des radicaux et leur stabilité dans le temps.

Toutefois, de récents travaux ont permis d'estimer les doses reçues par plusieurs victimes d'accidents radiologiques [Trompier et al., 2014, Romanyukha et al., 2014] en utilisant leurs ongles. Si ces protocoles ont fourni des résultats jusqu'alors cohérents, leur validation reste à faire et le délai d'expertise constitue en revanche une véritable limite quant à leur mise en place systématique. Par ailleurs, aucun protocole opérationnel, à ce jour, ne permet d'estimer des doses comprises entre 0 et 10 grays ce qui est problématique puisque les lésions radio-induites surviennent dès quelques grays. Certaines études récentes [Sholom et al., 2016, Choi et al., 2014, Trompier et al., 2007] ont montré qu'il était effectivement possible d'estimer des faibles doses mais seulement en condition de laboratoire. En effet, l'ensemble de ces protocoles se basent sur le signal radio-induit instable *RIS 2* et, étant donné qu'un simple lavage des mains suffit à le détruire, on comprend que de tels protocoles se

voient inutilisables en pratique. Il existe cependant un signal radio-induit stable, le *RIS 5*, qu'il est possible d'utiliser à des fins dosimétriques. Toutefois, le problème des faibles doses réside dans le fait que ce signal radio-induit stable possède les mêmes caractéristiques spectrales que le signal endogène. En d'autres termes, ces signaux se superposent et sont indiscernables l'un de l'autre. Un des objectifs de l'étude présentée ici est de caractériser le signal endogène et le signal radio-induit stable afin de développer une nouvelle approche qui permettrait l'estimation des faibles doses entre 0 et 10 Gy et d'optimiser le protocole des plus fortes doses (> 10 Gy). Ainsi, il est fondamental d'étudier et de caractériser le signal endogène *BKS* et cette étude constitue la première partie de ce chapitre IV. Par la suite, sur la base de ces résultats, nous nous intéresserons aux signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5* et nous verrons s'il est envisageable de proposer de nouvelles approches expérimentales permettant l'estimation de faibles doses entre 0 et 10 Gy applicables dans des conditions réelles d'accident radiologique.

2 Le signal endogène *BKS*

Le signal endogène, également connu sous le nom de « Background Signal (*BKS*) » dans la littérature, est un signal RPE isotrope (ou singlet) défini par un facteur g égal à 2,004 en bande X [Trompier et al., 2014]. Ce signal est persistant même après traitements chimiques [Romanyukha et al., 2007] et son intensité varie avec un grand nombre de paramètres (humidité, température, conditions de stockage ...) [Sholom et al., 2017, Marciniak et al., 2016, Zhang et al., 2016, Şahiner et al., 2015, Trompier et al., 2014, Reyes et al., 2012, 2008]. Il est également intéressant de souligner le caractère original de ce signal : son intensité est minimisée après traitement dans l'eau puis elle augmente jour après jour jusqu'à atteindre une saturation (environ 2 à 3 fois l'intensité initiale) au bout d'une dizaine de jours de séchage à l'air libre [Trompier et al., 2014, Reyes et al., 2008] (figure 40).

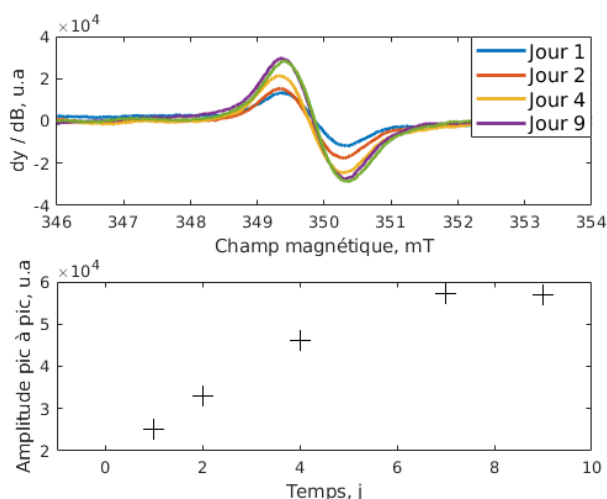


Figure 40 : Evolution du spectre RPE du signal endogène d'un prélèvement d'ongle sain après traitement dans l'eau distillée pendant 1 heure puis séchage à l'air libre.

Ce phénomène est reproductible et répétable sans limite apparente (figure 41). Peu de matériaux paramagnétiques, à notre connaissance, présentent cette particularité.

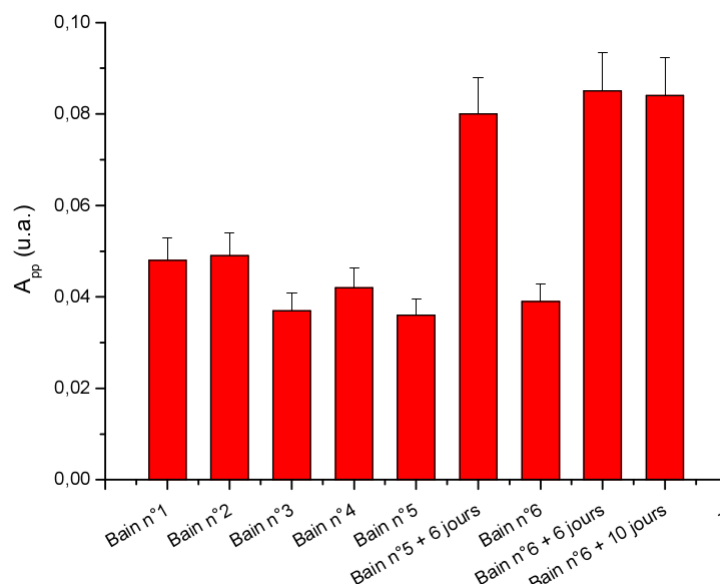


Figure 41 : Variation de l'intensité du signal endogène *BKS* en fonction du nombre de traitements dans l'eau distillée. Source : Trompier, 2012.

Par conséquent, il est indispensable de contrôler et maîtriser le taux d'humidité de l'échantillon lors de l'étude de ce signal endogène *BKS*.

Outre le *BKS*, il existe un autre signal qu'on pourrait également qualifier d'endogène qui est le manganèse Mn^{2+} (« 4.1 L'étude des ongles en spectroscopie RPE »). Le manganèse possède un facteur $g=2,0012\pm0,0002$ [Yordanov et al., 1999] proche de celui de l'électron libre et la 3^{ème} et 4^{ème} raie RPE de celui-ci sont réparties de part et d'autre du signal endogène. Ce dernier point est intéressant car, connaissant le facteur g du Mn^{2+} (souvent utilisé comme étalon interne), il nous est possible de recalculer les facteurs g des spectres RPE des ongles pour les analyses et simulations de spectres par exemple. Concernant les signaux parasites, une étude récente a été menée sur les signaux RPE des vernis à ongles [Trompier et al., 2015]. Les signaux RPE générés par les vernis à ongles dépendent bien évidemment de leur composition chimique, et certains présentent des signaux super-paramagnétiques très intenses (notamment ceux de l'oxyde de Fer) et de largeur de raie très importante qui empêchent toute observation des signaux RPE des ongles. Toutefois, il a été montré que ces signaux étaient facilement éliminables par simple traitement à l'acétone et ils ne constituent donc pas de réels problèmes

concernant la dosimétrie RPE des ongles. Enfin, les ongles sont des bio-accumulateurs de métaux lourds [Parizanganeh et al., 2014, Sukumar et al., 2007, Rodushkin et al., 2000] et de produits chimiques [Zariyantey et al., 2017]. Ils sont également révélateurs de l'alimentation [Keen et al., 1999, Johansson 2011] et de la santé des individus [Sureda et al., 2017, Takagi et al., 1988]. Ainsi, il est probable de mesurer des signaux « endogènes » qui, en réalité, seraient « parasites » car générés par une contamination interne.

Toutefois, pour les prélèvements de la majorité des individus, les seuls signaux RPE endogènes observables avec un facteur g proche de 2 sont le manganèse Mn^{2+} et le *BKS*. Concernant la dosimétrie RPE des ongles, la problématique réside dans le fait que le signal endogène *BKS* possède les mêmes caractéristiques spectrales que le signal radio-induit stable *RIS 5* [Trompier et al., 2014] comme mentionné précédemment. Ainsi, toute fluctuation du signal endogène *BKS* engendre une variation du signal global (regroupant le *BKS* et le radio-induit *RIS 5*) et constitue, par conséquent, une source d'incertitude supplémentaire pour l'estimation de l'intensité du *RIS 5* et donc de la dose estimée. Ainsi, il est nécessaire de caractériser ce signal endogène *BKS* dans l'optique de développer de nouvelles approches permettant une estimation fiable et robuste des doses de l'ordre du gray dans le cas d'accidents radiologiques réels. En ce sens, une étude du signal endogène *BKS* a été entreprise en spectroscopie RPE bande X et bande Q. Les principaux objectifs de cette partie sont les suivants :

1. Identifier la nature du radical à l'origine du signal endogène *BKS* ;
2. Évaluer la variabilité du signal endogène *BKS* à la fois qualitativement, dans la forme des spectres, et quantitativement, en intensité pour un même individu et pour différents donneurs. Nous verrons également comment varie ce signal au cours du temps et selon l'extrémité de prélèvement (mains, pieds, doigts) ;
3. Étudier l'influence des paramètres extérieurs tels que l'exposition à la lumière du jour, la température mais également les conditions de conservation des échantillons.

2.1 Variabilité spectrale du signal endogène *BKS*

À notre connaissance, aucune étude publiée ne concerne la variabilité que ce soit en intensité ou dans l'allure de ce signal. Pourtant, étant donné que le *BKS* se superpose aux signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5*, on comprend l'importance d'une telle étude. **La signature spectrale du signal endogène *BKS* est-elle la même pour tous les individus ?** Afin d'avoir une vision plus claire de l'allure de ce signal, nous avons étudié un ensemble d'échantillons provenant de 30 donneurs différents. La figure 42 représente le signal RPE endogène *BKS* typiquement observé sur des échantillons d'ongles sains et non irradiés mesurés par spectroscopie RPE à la fois en bandes X et Q.

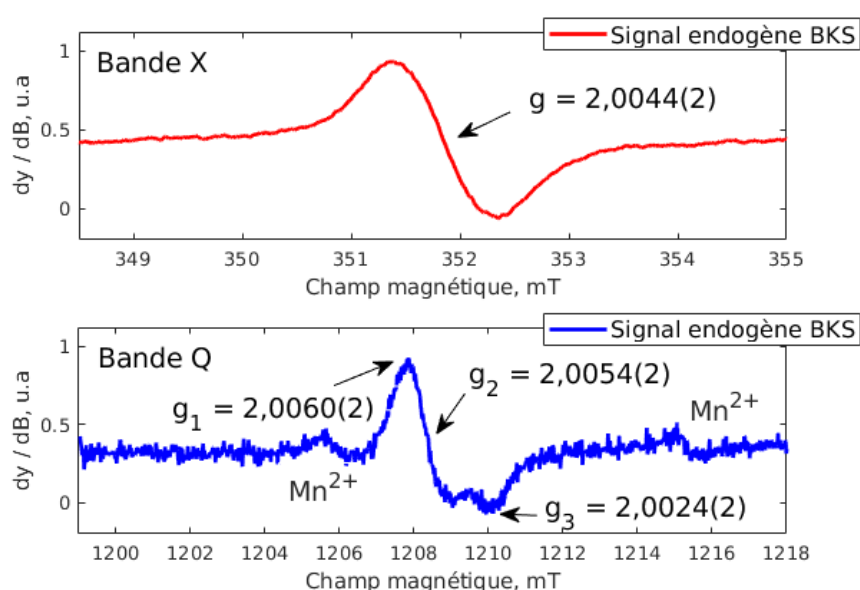


Figure 42 : Spectre RPE d'un ongle sain préalablement traité dans de l'eau distillée, séché et acquis en spectroscopie RPE bandes X et Q (0,6 mW).

Afin d'isoler uniquement le signal endogène *BKS*, nous avons d'abord éliminé les radicaux mécaniquement induits en trempant les échantillons d'ongles dans de l'eau distillée ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) pendant 1 heure puis en les séchant dans un dessiccateur sous vide avec du gel de silice pendant 16 heures [Trompier, 2014]².

2 Les mesures RPE sont effectuées tout au long de la journée, et le traitement chimique des échantillons à la fin de celle-ci. Ainsi, le séchage dure en moyenne 16 heures soit toute la nuit ce qui est bien plus pratique.

En bande Q, le signal endogène *BKS* est caractérisé par les facteurs *g* suivants : $g_1=2,0060(2)$, $g_2=2,0054(2)$ et $g_3=2,0024(2)$ alors qu'un seul singlet apparaît à $g=2,0044(2)$ en bande X. Ainsi, l'utilisation d'un spectromètre bande Q permet de résoudre en partie l'anisotropie du facteur *g* du signal endogène *BKS*.

La mise en évidence des impuretés manganèses est très dépendante à la fois de son état d'oxydation et de la fréquence du rayonnement micro-onde utilisée. À ce titre, le manganèse présent dans les ongles est principalement présent à l'état Mn^{2+} , et il est clairement observable à température ambiante en spectroscopie RPE bande Q (en raison de la sensibilité plus importante par rapport à la bande X). Ce dernier possède un spin nucléaire $I=5/2$ et présente, en conséquence, une structure hyperfine de $2I+1=6$ raies RPE centrées en $g=2,0012\pm0,0002$ [Yordanov et al., 1999]. L'intérêt majeur de la présence du Mn^{2+} dans les ongles est que ses 3^e et 4^e raies RPE se répartissent de part et d'autre des signaux RPE des ongles (endogène, mécaniquement et radio-induits) permettant un recalage des facteurs *g* par simulation spectrale.

À défaut d'utiliser un spectromètre de très haute fréquence (bande W 94 GHz et au-dessus), l'utilisation du spectromètre en bande Q (35 GHz) permet d'obtenir une bien meilleure résolution spectrale et une sensibilité plus élevée qu'en bande X conventionnelle. De plus, la quantité d'ongle nécessaire pour acquérir un spectre RPE est moindre : 1 à 3 mg en bande Q contre 10 à 30 mg en bande X. C'est la raison pour laquelle j'ai principalement utilisé le spectromètre en bande Q au cours de cette étude afin d'obtenir de plus amples informations sur les caractéristiques spectrales des signaux RPE présents dans les ongles.

2.1.1 Variabilité dans l'allure spectrale

Sur l'ensemble des échantillons étudiés, nous avons observé des différences dans l'allure du signal endogène *BKS* pour quelques échantillons uniquement. La figure 43 représente trois spectres RPE du signal endogène *BKS* provenant de trois donneurs différents.

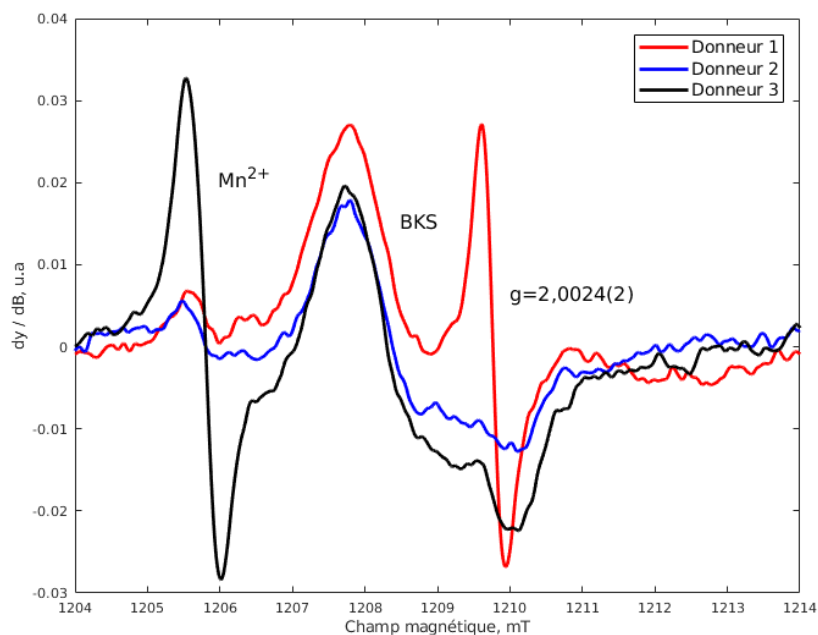


Figure 43 : Spectres RPE de trois donneurs sains acquis en bande Q. La composante principale du *BKS* est définie par $g_1=2,0060(2)$, $g_2=2,0054(2)$ et $g_3=2,0024(2)$. Pour un faible nombre de donneurs (10 % de la cohorte), un signal isotrope très intense apparaît pour 2,0024(2) (spectre rouge). Enfin, la concentration en radicaux Mn^{2+} varie également d'un individu à l'autre.

On remarque quelques différences flagrantes concernant l'allure des spectres RPE. D'une part, on constate que la quantité de radicaux manganèse Mn^{2+} varie en conséquence d'un individu à l'autre ce qui a également été observé dans la littérature par analyse PIXE (Particle Induced X-rays Emission) [Olabanji et al., 2005]. Ces variabilités en intensité pourraient être dues à des différences dans l'alimentation [Afridi et al., 2006, Hull, 2003, Barret, 1985]. Ce dernier point pourrait éventuellement avoir un intérêt dans des études médicales par exemple pour corréler la concentration en manganèse avec certaines pathologies (cancers, maladies neurodégénératives...).

Concernant les signaux d'intérêt en dosimétrie RPE, on remarque l'apparition systématique du signal endogène *BKS* défini par $g_1=2,0060(2)$, $g_2=2,0054(2)$ et $g_3=2,0024(2)$ mais, pour un faible nombre de donneurs (10 % de la cohorte étudiée), on observe également un signal isotrope (ou singlet) très intense à $g=2,0024(2)$ qui n'a jamais été reporté dans la

littérature. Les échantillons d'ongles sont lavés et traités dans l'eau distillée avant d'être mesurés ce qui écarte l'hypothèse que ce signal supplémentaire provient d'une impureté en surface. De plus, les ongles récupérés n'ont pas été traités à l'aide de produits cosmétiques (durcisseurs, vernis à ongles...). À l'instar du signal endogène *BKS*, ce signal supplémentaire semble donc également intrinsèque. Nous avons également vérifié que l'apparition de ce signal n'était pas dépendant de l'orientation de l'échantillon par rapport au champ magnétique. Toutefois, une méthode simple pour vérifier s'il s'agit de la même espèce paramagnétique est une étude du comportement de ces signaux RPE avec la puissance du rayonnement micro-onde. En effet, si ces signaux présentent deux comportements différents, alors les temps de relaxation des deux espèces sont différents et il est probable que ces deux signaux ne proviennent pas d'une même entité paramagnétique. Le résultat est présenté en figure 44.

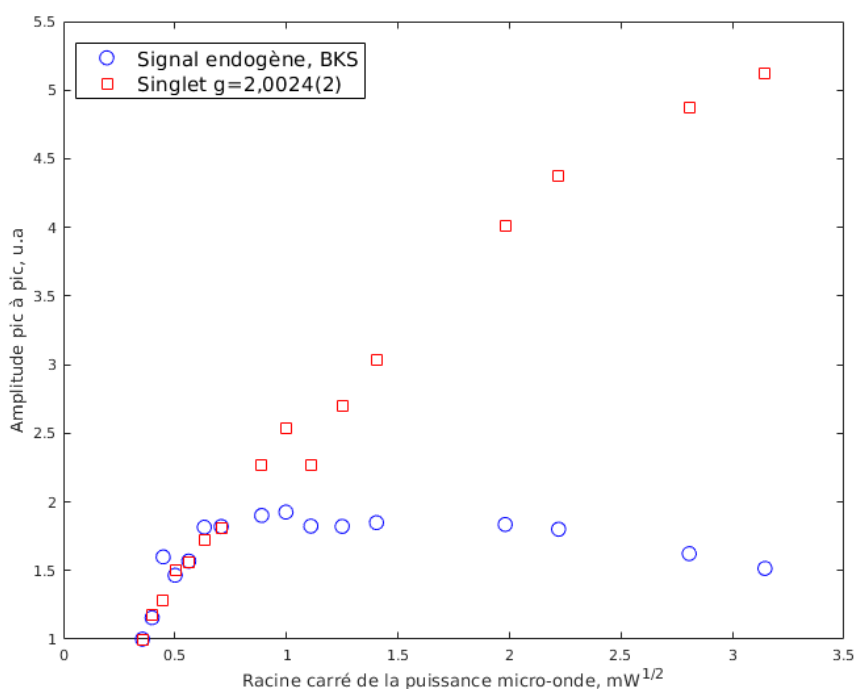


Figure 44 : Variation des amplitudes pic à pic du *BKS* (ronds bleus) et du singlet particulier (carrés rouges) normalisées en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde. On constate que le *BKS* sature à environ 1 mW contrairement au signal isotrope qui ne présente aucun comportement de saturation.

On constate que l'intensité du signal endogène *BKS* sature à environ 1 mW alors que le second ne montre aucun comportement de saturation entre $0,1$ et 10 mW . L'allure de ces courbes est un indice précieux : la courbe du signal endogène *BKS* passe par un maximum (à environ 1 mW) puis décroît ce qui est caractéristique d'une raie RPE homogène. A contrario, la courbe du signal isotrope en $g=2,0024(2)$ ne présente aucune saturation dans la gamme de puissance de rayonnement micro-onde étudiée. Ainsi, on peut conclure que les temps de relaxation du signal endogène *BKS* sont plus longs que ceux du signal intrinsèque supplémentaire. Il est alors fort probable que ces deux signaux soient liés à des entités paramagnétiques bien distinctes. Une étude complémentaire en spectroscopie RPE pulsée permettrait d'estimer ces temps de relaxation et constitue dès lors une perspective à considérer.

Au cours de ce travail, j'ai été amené à étudier des échantillons d'algues marines provenant principalement de Bretagne. Celles-ci présentent des signaux similaires aux ongles mais bien plus intenses et elles auraient pu servir pour des études RPE nécessitant un signal intense visant à l'identification des espèces radicalaires responsables sur signal endogène, notamment la composante à $g=2,0024(2)$. Ces expériences ne relèvent pas du hasard car les algues sont riches en de différents types d'acides aminés [Černá, 2011, Kaladharan, 2007] tels que, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane et la méthionine pour ne citer qu'eux et un certain nombre d'entre eux sont présents dans les ongles. Les photos et les spectres RPE associés de chacune des algues étudiées sont répertoriés en annexe (« 1.6 Algues marines étudiées en spectroscopie RPE »). La figure 45 représente les spectres RPE de certains de ces échantillons d'algues.

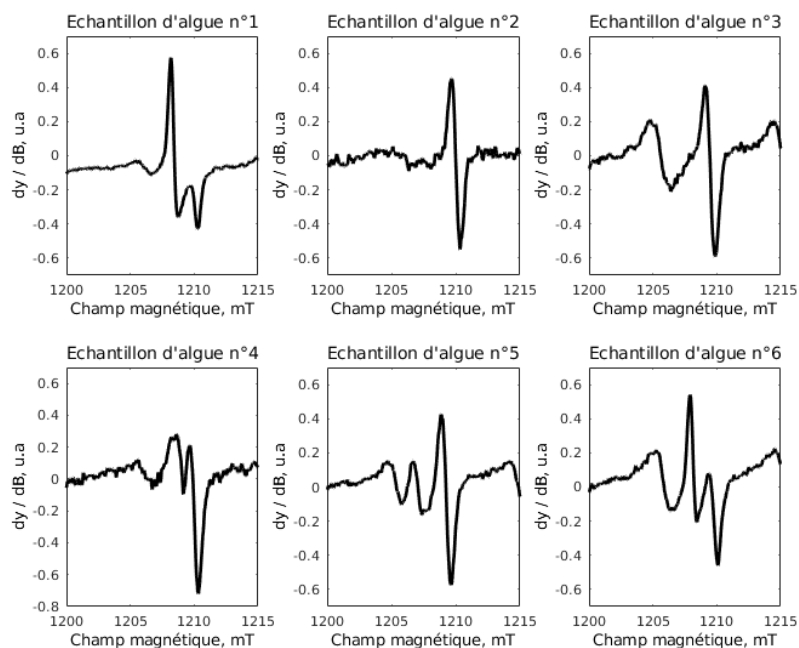


Figure 45 : Spectres RPE des algues étudiées au cours de ce travail (voir annexe « 1.6 Algues marines étudiées en spectroscopie RPE »).

On constate certaines similarités dans l'allure des spectres par rapport à ceux obtenus pour les ongles et notamment concernant le singlet supplémentaire en $g=2,0024(2)$. Par exemple, l'algue n° 2 présente le même signal RPE isotrope défini par $g=2,0024(2)$ (mais avec une plus grande largeur de raie). À ce niveau-là de l'étude, nous ne savons pas de quelle entité paramagnétique il s'agit. Toutefois, cette observation conforte l'hypothèse que cette composante spéciale n'appartient pas au *BKS* tel que décrit dans la littérature, mais constitue une composante supplémentaire. Plus d'investigations sont nécessaires pour déterminer son origine et le chapitre suivant permettra d'apporter des éléments de réponse.

Le signal endogène *BKS* est défini par $g_1=2,0060(2)$, $g_2=2,0054(2)$ et $g_3=2,0024(2)$ en bande Q. Il arrive, pour 10 % des individus étudiés, d'observer un intense signal RPE isotrope additionnel en $g=2,0024(2)$ dont l'origine semble également être intrinsèque à l'échantillon.

2.2 Caractérisation du signal endogène

2.2.1 Le mécanisme de formation de l'entité radicalaire

Dans le cadre de ce travail, une étude bibliographique sur les entités radicalaires susceptibles d'être générées dans les ongles a été menée. Le tableau 7 répertorie les facteurs g d'une partie de ces différentes espèces. Les spectres RPE de ces radicaux ont ensuite été calculés à l'aide de la boîte à outil Matlab Easyspin (6.1.2 Easyspin) et sont représentés en annexe « 1.7 Simulations spectrales des radicaux libres susceptibles d'être générés dans la kératine ».

Tableau 7 : Radicaux libres susceptibles d'être générés au sein de la kératine. Seuls ceux dont les facteurs g sont proches de ceux du signal endogène ont été représentés dans le tableau.

Radical	g_x	g_y	g_z	Source
Signal endogène	2,0060	2,0055	2,0024	Expérience
<i>BKS</i>	2,0058	2,0053	2,0022	
Méthyl sulfonyl $\text{CH}_3\text{-SO}_2^\bullet$	2,0108	2,0075	2,0022	Tipikin et al., (2016)
Cystéine sulfinyl $\text{Cys-SO}^\bullet$	2,0228	2,0122	2,0022	Tipikin et al., (2016)
Semiquinone $\text{R-C}_6\text{H}_3\text{O}_2^\bullet$	2,0059	2,0054	2,0022	Jeschke et al., (2005)
Tyrosyl $\text{R-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{O}^\bullet$	2,0074	2,0047	2,0025	Tipikin et al., (2016)
	2,0081	2,0049		
Tryptophanyl $\text{Try}^\bullet$	2,0034	2,0024	2,0021	Jeschke et al., (2005)
	2,0035	2,0025		

L'espèce radicalaire responsable du signal endogène *BKS* n'a pas encore été identifiée avec certitude mais le radical semiquinone [Jeschke, 2005] apparaît comme l'un des meilleurs candidats. Le radical semiquinone a déjà été mentionné dans la littérature par Strzelczak et al., (2013). Ces derniers ont formulé l'hypothèse que ce radical provenait de la dégradation par rayonnement UV ou gamma de la mélanine potentiellement présente dans les ongles. Cependant, les mélanocytes (cellules responsables de la pigmentation de la peau et des

phanères) sont quiescents (non actifs) dans les ongles et, sauf dans de rares cas de pathologie de l'ongle (mélanonychie), il n'y a pas de mélanine dans les ongles sains [Andre et al., 2006, Perrin et al., 1997, Tosti et al., 1994]. Cette hypothèse a donc longtemps été écartée jusqu'en 2016 où Tipikin et al., (2016) ont suggéré que le radical o-semiquinone anionique pouvait être généré à partir de l'oxydation ou de l'irradiation γ , X ou UV de la molécule L-3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) elle-même provenant de l'oxydation partielle de l'acide aminé tyrosine naturellement présente dans les ongles humains (figure 46) ou par interaction rayonnement-matière [Jain et al., 1997]. Ce mécanisme réactionnel ne fait donc pas intervenir la mélanine.

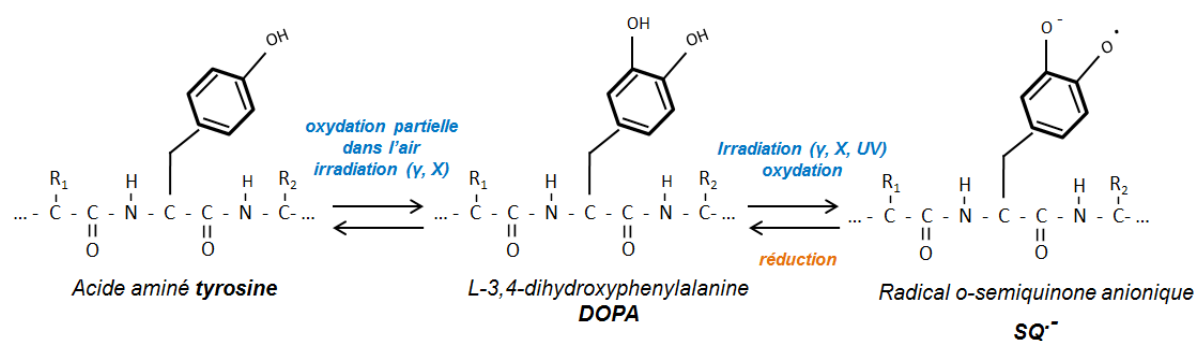


Figure 46 : Mécanisme de formation du radical o-semiquinone anionique à partir de l'acide aminée tyrosine.

Il est important de souligner que le radical semiquinone est le plus stable sous sa forme anionique [Kalyanaraman et al., 1987, Miller et al., 1973, Borg et al., 1965]. Cette caractéristique sera d'importance par la suite. Afin de tester cette hypothèse, le spectre du radical semiquinone a été calculé à la fois en bandes X et Q (figure 47).

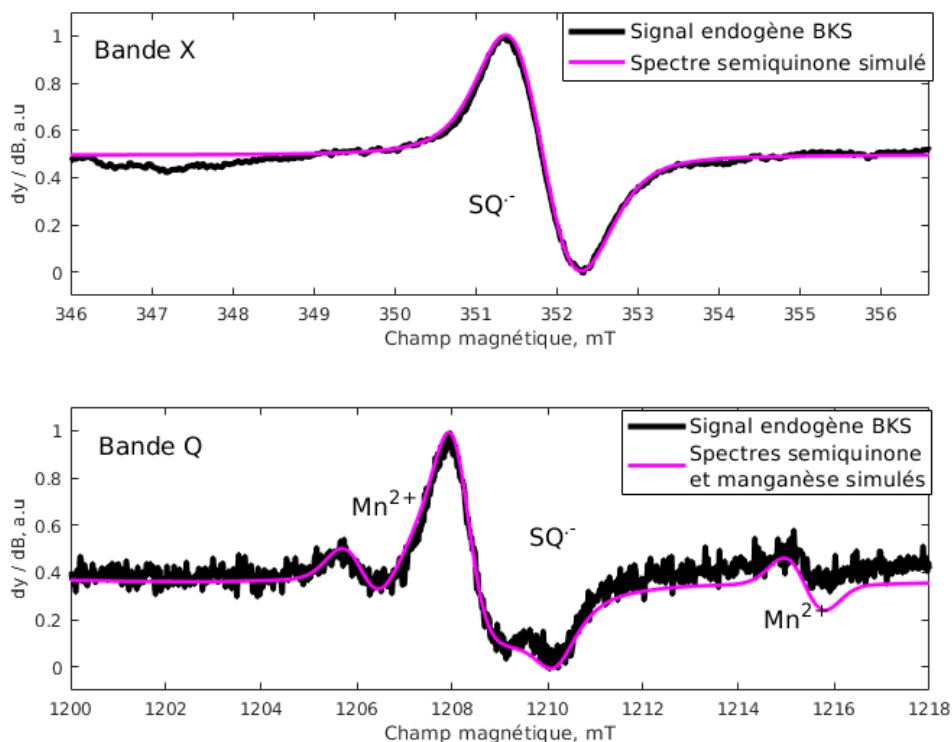


Figure 47 : Spectres RPE du signal endogène d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical semiquinone.

On constate que les spectres simulés représentent fidèlement les spectres expérimentaux avec, respectivement, un écart moyen entre le modèle théorique (simulation spectrale) et le spectre expérimental de 2,7 % en bande X et de 4,2 % en bande Q soutenant l'hypothèse d'un radical semiquinone.

Considérons maintenant le signal intrinsèque additionnel présenté dans la section précédente. En effet, nous avons remarqué un intense singlet en $g=2,0022(2)$ dans quelques échantillons. Parmi les radicaux libres susceptibles d'être générés à partir d'acides aminés, le radical tryptophanyl (tableau 7) présente des caractéristiques compatibles avec celles du signal mesuré. Il est fort probable que l'anisotropie du facteur g ne soit pas résolue en bande Q ce qui expliquerait cette illusion de signal isotrope (figure 43). De plus, il a été montré que le radical tryptophanyl peut être généré par oxydation de l'acide aminé tryptophane [Luis et al., 1997]. Nous avons ainsi simulé le spectre de la semiquinone et le spectre du tryptophanyl et les avons comparés au spectre expérimental (figure 48).

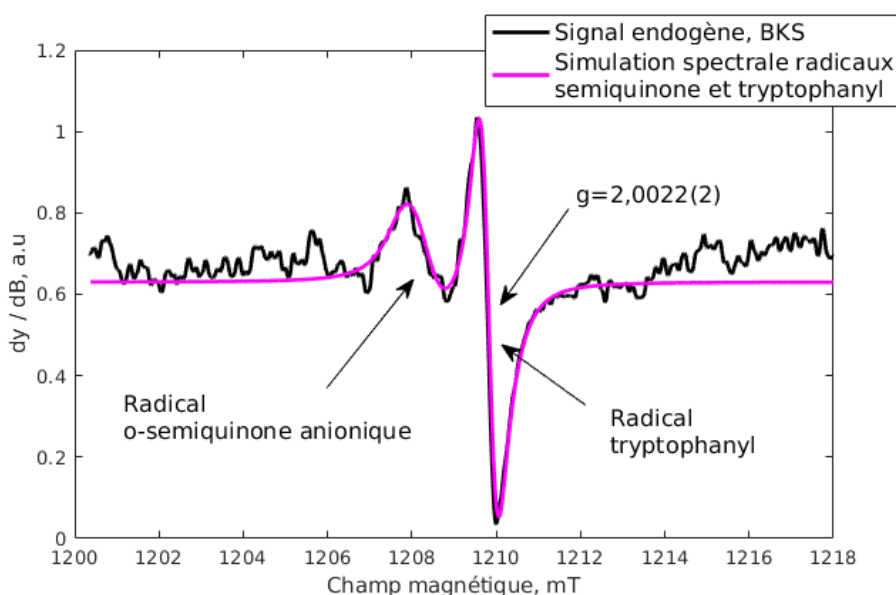


Figure 48 : Comparaison entre le spectre expérimental en bande Q d’ongle sain présentant le signal endogène *BKS* avec un intense singlet en $g=2,0022(2)$ et le spectre simulé de semiquinone et de tryptophanyl.

Le *RMSD* (« 6.1.2 Easyspin ») associé à ces deux spectres est de 5,4 % ce qui conforte l’hypothèse que ce singlet est probablement dû au radical tryptophanyl. Toutefois, ce signal ayant une faible fréquence d’apparition (seulement quelques donneurs parmi les 30 étudiés), nous n’avons pas mené une étude aussi exhaustive que celle du signal endogène.

2.2.2 La stabilité et les propriétés acido-basiques du signal endogène

Afin de vérifier la stabilité du radical o-semiquinone anionique dans les ongles et donc de soutenir l’hypothèse formulée précédemment, nous avons étudié les propriétés acido-basiques de celui-ci en traitant les échantillons d’ongles respectivement dans une solution d’acide chlorhydrique à $pH=1$ et dans une solution de soude à $pH=13$. En effet, si le radical à l’origine du signal endogène *BKS* est effectivement sous forme anionique, alors le traitement de l’échantillon d’ongle en milieu acide devrait l’éliminer, au moins en partie. En revanche, un traitement en solution basique ne devrait pas avoir d’influence concernant l’intensité spectrale du signal endogène *BKS*. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 49.

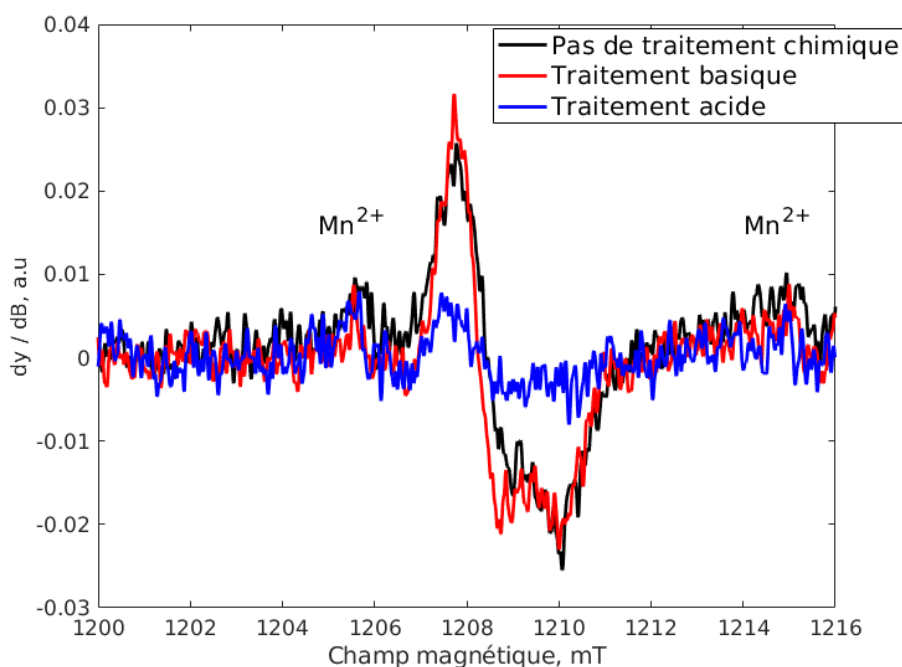


Figure 49 : Spectres RPE du signal endogène d'un ongle sans traitement chimique (noir), après traitement dans une solution de KOH à $pH=13$ (rouge) et après traitement dans une solution d' HCL à $pH=1$ (bleu).

On constate que l'intensité du signal endogène *BKS* reste inchangée après traitement dans la solution de soude ($pH=13$) tandis que son intensité diminue fortement (facteur 3,7) après traitement dans la solution d'acide chlorhydrique ($pH=1$). Cette observation est en accord avec celle de Tipikin et al., (2016) lors de leurs traitements acido-basiques sur le signal radio-induit *RIS 2*. Ce résultat est en accord avec la stabilité plus importante du radical o-semiquinone anionique par rapport à un radical semiquinone cationique ou à un radical semiquinone neutre. En raison de la configuration spatiale des fibres de kératine, il est probable que les solutions chimiques n'aient pas pu pénétrer complètement dans l'ongle pendant les durées de traitement ce qui expliquerait l'élimination partielle du signal endogène. Toutefois, ces résultats sont compatibles avec le comportement acido-basique attendu. L'entité radicalaire responsable du signal endogène semble être a priori sous forme anionique ce qui est également en accord avec la littérature sur les radicaux semiquinone [Brudzynski et al., 2015, Kalyanaraman et al., 1987].

2.2.3 Les propriétés d'oxydo-réduction du signal endogène

Enfin, afin de conclure sur l'origine du signal endogène *BKS*, nous avons traité les échantillons d'ongles dans deux solutions chimiques à $pH=13$, l'une oxydante à base de ferricyanure de potassium $K_3Fe[CN]_6$ à 0,1 M et l'autre réductrice à base de dithiothréitol (DTT) également à 0,1 M. En effet, si la molécule à l'origine du radical o-semiquinone anionique est une molécule de type dihydroquinone, alors il est possible de générer ce radical par traitement oxydant [Kalyanaraman et al., 1987, Miller et al., 1973]. Le ferricyanure de potassium est un oxydant connu pour oxyder les systèmes organiques [Bharat, 1960] et il devrait générer des radicaux o-semiquinones anioniques à partir des molécules DOPA. Le DTT est un réducteur connu pour réagir avec les ponts disulfures (rappel : la kératine est composée de cystéine qui forme des ponts disulfures responsables de la rigidité de l'ongle) et devrait donc réduire les radicaux o-semiquinones anioniques en DOPA. Son action réductrice requière un pH supérieur à 7 [Uptima, 2018]. Les résultats sont présentés dans la figure 50.

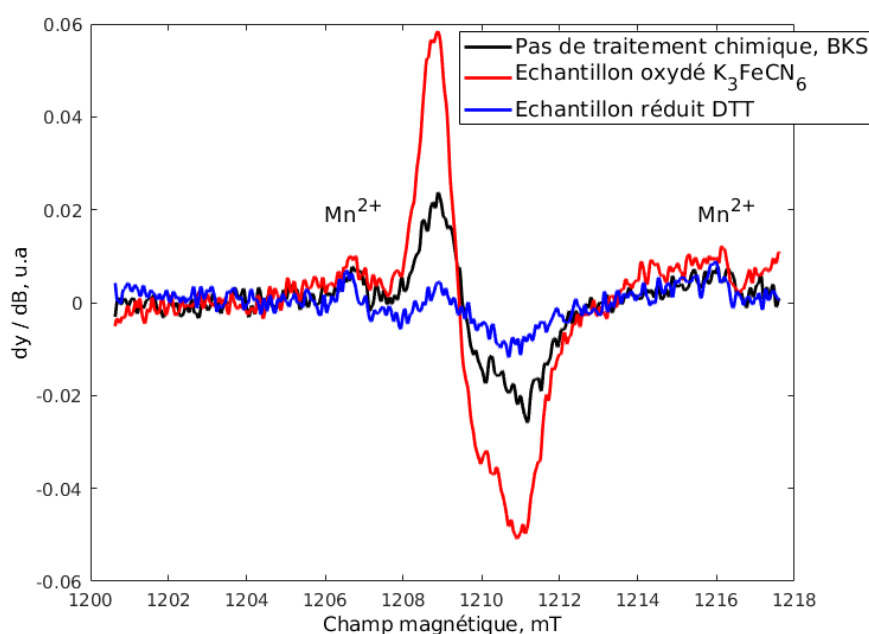


Figure 50 : Spectres RPE du signal endogène *BKS* d'un ongle sans traitement chimique (noir), après traitement dans une solution oxydante à $pH=13$ de 0,1 M de $K_3Fe[CN]_6$ (rouge) et après traitement dans une solution réductrice de 0,1 M de DTT (bleu).

Après avoir oxydé l'échantillon d'ongle, on constate que l'amplitude du *BKS* augmente d'un facteur 2,2 ce qui signifie que les radicaux à l'origine du signal endogène peuvent effectivement être générés par traitement oxydant. Après le traitement réducteur, on observe le comportement inverse, le *BKS* diminue d'un facteur 3,2 mais n'est pas entièrement éliminé. Ces résultats confortent l'hypothèse que le signal endogène *BKS* est lié à un radical semiquinone sous forme anionique issu de l'oxydation des molécules DOPA. Toutefois, ce résultat soulève une nouvelle interrogation : **pourquoi le signal endogène *BKS* ne disparaît-il pas entièrement ?** Des éléments de réponse seront apportés dans la suite de ce présent manuscrit.

L'ensemble des résultats (simulations spectrales, propriétés acido-basiques et rédox) confortent l'hypothèse que le signal endogène *BKS* observé dans les ongles provient d'un radical o-semiquinone anionique stable et défini par $g_1=2,0059(2)$, $g_2=2,0046(2)$ et $g_3=2,0023(2)$. De plus, pour certains échantillons (10 % des donneurs), nous observons un signal, en apparence isotrope, additionnel très intense centré en $g=2,0022(2)$ et qui n'a, à notre connaissance, jamais été reporté dans la littérature. Un radical de type tryptophanyl pourrait expliquer cette composante endogène supplémentaire.

2.2.4 L'impact du milieu ambiant sur l'intensité du signal endogène

Il a été observé que plus les ongles étaient stockés longtemps à l'air libre dans l'obscurité, plus l'intensité du signal endogène *BKS* augmentait jusqu'à ce qu'elle sature (figure 51) [Trompier et al., 2014, Reyes et al., 2008].

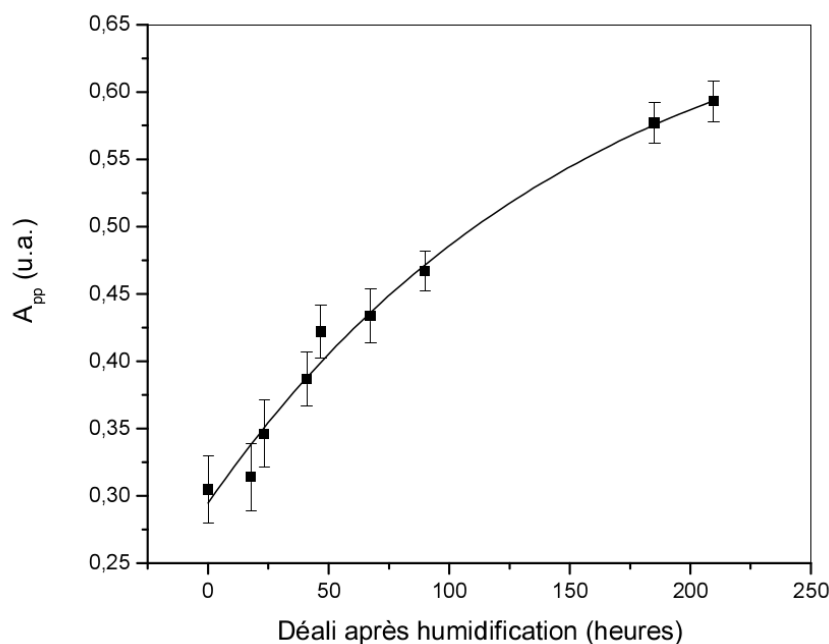


Figure 51 : Variation de l'intensité du signal endogène *BKS* en fonction du temps écoulé après humidification d'un échantillon d'ongle et stockage à l'air libre [Reyes et al., 2008]. Source : Trompier, (2012).

Reyes et al., (2008) ont proposé que l'origine du *BKS* et l'augmentation observée en séchant l'ongle étaient liées aux contraintes mécaniques dans l'échantillon qui augmentaient avec le séchage générant ainsi les mêmes radicaux que ceux responsables du signal mécaniquement induit *MIS 2*. Trompier et al., (2012) ont émis l'hypothèse que les molécules d'eau peuvent relier les radicaux endogènes deux à deux par l'intermédiaire d'une liaison diamagnétique. Le système ainsi formé n'est donc pas observable en spectroscopie RPE. Or, en séchant, les molécules d'eau migrent en surface puis s'évaporent et les radicaux endogènes retrouvent leur caractère paramagnétique d'où la hausse en intensité du signal endogène après séchage.

Par contre, si le radical semiquinone est à l'origine du signal endogène *BKS*, alors l'hypothèse la plus probable pour expliquer cette augmentation est le phénomène d'oxydation de la molécule DOPA en présence du dioxygène ambiant [Brudzynski et al., 2015]. Pour confirmer cela, nous avons trempé deux échantillons d'ongles du même doigt provenant du même donneur et de masse similaire dans de l'eau distillée pendant 1 heure afin d'obtenir l'intensité du signal endogène *BKS* la plus faible possible [Trompier et al., 2014,

Romanyukha et al., 2007]. Nous en avons laissé sécher un dans l'obscurité à l'air libre pendant 72 heures, et l'autre dans un dessiccateur sous vide avec du gel de silice la même durée³ et également dans l'obscurité. Les échantillons sont séchés dans l'obscurité afin de s'affranchir d'une potentielle contribution supplémentaire d'un paramètre extérieur tel que l'exposition à la lumière du jour. L'intérêt d'un séchage sous vide est de déshydrater les échantillons d'ongle sans présence de dioxygène afin de mettre en évidence l'effet potentiel du dioxygène sur la formation du *BKS*. Si les hypothèses formulées par Reyes et al., (2008) et Trompier et al., (2012) sont correctes, et si les deux techniques de séchage sont équivalentes sur une période de 72 heures, alors nous devrions obtenir la même intensité spectrale du signal endogène *BKS*. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 52.

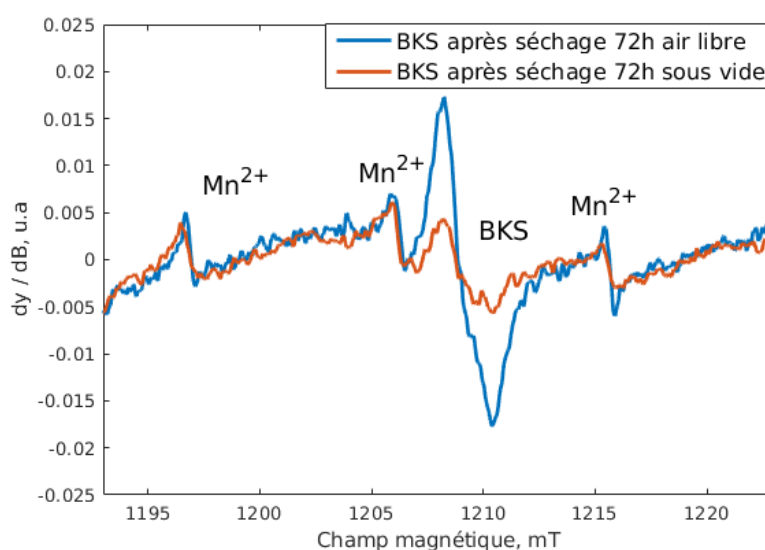


Figure 52 : Spectres RPE du signal endogène d'un ongle sain provenant du même doigt d'un même donneur. Les deux échantillons ont été trempés dans de l'eau distillée pendant 1 heure puis ont séché 72 heures dans l'obscurité respectivement à l'air libre (bleu) et dans un dessiccateur sous vide (orange).

L'amplitude du signal endogène *BKS* est significativement plus importante après séchage pendant 72 heures à l'air libre qu'après séchage sous vide (facteur ≈ 3). En pratique, sur une période de 72 heures, les masses des échantillons sont équivalentes (différence relative de 0,5 %) ce qui revient à dire que l'état de déshydratation des deux échantillons, à ce

³ Nous avons vérifié au préalable qu'au bout de 72 heures les masses des deux échantillons étaient équivalentes et que les différences observées en intensité n'étaient pas dues aux protocoles de séchage (différence massique relative observée de 0,5 %).

moment-là sont identiques. Si l'unique raison de la croissance du signal endogène avec le séchage étaient les liaisons diamagnétiques ou les contraintes mécaniques, alors les intensités spectrales du *BKS* devraient être égales. Toutefois, ces intensités spectrales sont radicalement différentes ce qui indique qu'il y a une raison supplémentaire (a fortiori l'oxydation des molécules de DOPA en radicaux semiquinones). **Ainsi, l'oxydation des molécules de DOPA semble être le principal phénomène responsable de l'augmentation du signal endogène *BKS* lors d'un séchage à l'air libre et dans l'obscurité.**

Au bilan, l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse confortent l'hypothèse que le signal endogène *BKS* observé après traitement dans l'eau a pour origine un radical semiquinone intrinsèque sous forme anionique et que ce dernier peut être généré par oxydation de la molécule DOPA en présence de dioxygène.

2.2.5 Discussion sur la stabilité du signal endogène *BKS*

L'ensemble des résultats présentés jusqu'ici confortent l'hypothèse que le signal endogène *BKS* a pour origine des radicaux semiquinones anioniques stables dans le volume de l'ongle. Il est également possible de les éliminer partiellement en traitant les échantillons dans une solution d'eau distillée ou dans une solution réductrice. Seulement, **comment expliquer le caractère partiel de cette élimination signal endogène *BKS* ?** De plus, ces radicaux semiquinones sont généralement instables et ils se recombinaient vite pour redevenir des quinones en milieu ambiant [Brudzynski et al., 2015, Kalyanaraman et al., 1987, Miller and Rapp, 1973]. Dès lors, **comment pouvons-nous observer un signal endogène *BKS* extrêmement stable dans le temps si celui-ci est lié à la semiquinone ?** Deux explications sont donc proposées ici.

En premier lieu, il est important de préciser que les ongles contiennent également un certain nombre d'ions chargés positivement tels que des ions métalliques Fe^{3+} , Cu^{2+} , des éléments-traces Al^{3+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ [Okoro et al., 2015, Shadman et al., 2012, Bank et al., 1981, Vellar et al., 1970] ou des ions ammoniums R-NH^{3+} . L'hypothèse la plus probante pour expliquer la stabilité des radicaux o-semiquinones anioniques au sein des

ongles est qu'un certain nombre d'entre eux sont localisés à proximité d'une charge positive et sont donc particulièrement stabilisés car ils rétablissent l'électro-neutralité locale ce qui est cohérent avec la littérature [Plonka, 2009, Sarna et al., 2005, Felix et al., 1978, Abragam et al., 1970, Ingram et al., 1969]. Ces radicaux sont donc très stables dans le volume de l'ongle et, par conséquent, observables par spectroscopie RPE sur une longue période. C'est pour cette raison que l'intensité du signal endogène est minimale mais non nulle après traitement dans l'eau ou dans une solution réductrice. Après traitement chimique, seuls les radicaux stabilisés par interaction coulombienne conserveront leur caractère paramagnétique et seront visibles par spectroscopie RPE.

En second lieu, il faut rappeler que les ongles sont composés de kératine et de lipides et parmi l'ensemble des acides aminés qui la composent, certains sont hydrophobes et sont assujettis à un important encombrement stérique tels que la phénylalanine, la proline et la méthionine. Chaque fibre de kératine est composée de trois chaînes d'acides aminés enroulées les unes sur les autres (« 4.1 Une description histologique et biochimique des ongles ») et on peut formuler l'hypothèse que certains des acides aminés hydrophobes sont répartis de part et d'autre des radicaux semiquinones endogènes formant ainsi des « cages hydrophobes ». Par conséquent, lors du traitement des échantillons d'ongles dans l'eau distillée, les radicaux protégés par les acides aminés hydrophobes ne vont pas réagir avec l'eau. Ainsi, il est probable que la cinétique de recombinaison radicalaire soit en partie gouvernée par la présence de ces acides aminés hydrophobes.

2.2.6 L'effet de la température sur le signal endogène

Il est connu que la température active l'oxydation des molécules de DOPA par le dioxygène ambiant [Brudzynski et al., 2015]. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'impact de la température sur le signal endogène.

L'évolution d'un signal RPE avec la température est un indice important pour tester la stabilité thermique des systèmes paramagnétiques étudiés, qu'ils soient endogènes, mécaniquement-induits ou radio-induits. Afin d'étudier la stabilité thermique du signal

endogène *BKS*, une courbe isochrone ($\Delta T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta t = 20\text{ mn}$) a été réalisée entre 25 et 170 $^{\circ}\text{C}$. L'échantillon d'ongle a été traité dans l'eau distillée pendant 1 heure afin d'éliminer les signaux mécaniquement induits puis a séché sous vide pendant 16 heures dans un premier temps pour éliminer les signaux mécaniquement-induits. Les spectres RPE ont été enregistrés à température ambiante après chaque traitement thermique, et ce dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 53.

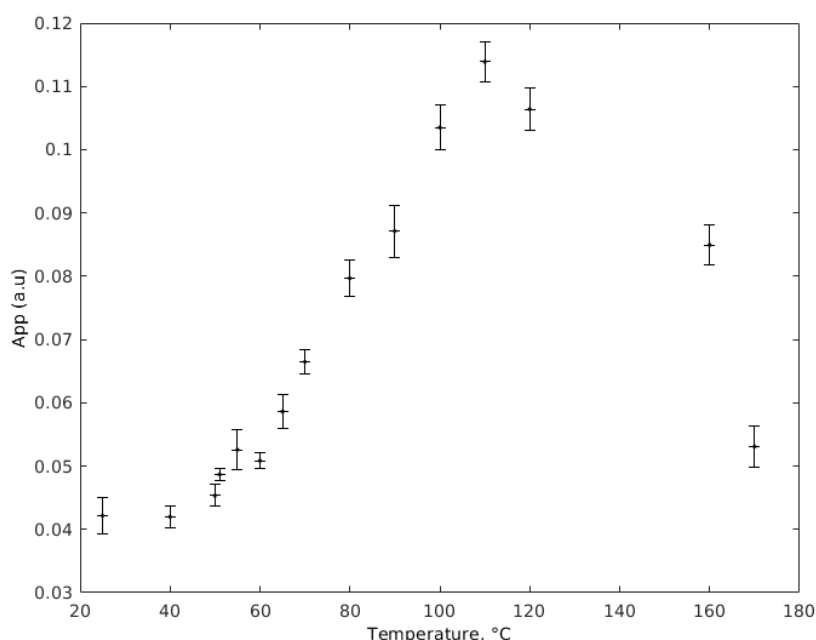


Figure 53 : Evolution de l'amplitude pic à pic du signal endogène *BKS* selon un traitement thermique isochrone tel que $\Delta T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta t = 20\text{ mn}$.

On déduit de ce graphique qu'un processus de recombinaison radicalaire commence à partir de 110 $^{\circ}\text{C}$ qui se traduit par une baisse en intensité du signal RPE. L'augmentation de l'intensité du signal endogène *BKS* à partir de 40 $^{\circ}\text{C}$ est dû au séchage de l'échantillon et à l'oxydation activée thermiquement des molécules DOPA [Brudzynski et al., 2015]. Il est remarquable que le niveau de stabilisation du phénomène d'oxydation soit atteint en quelques heures de chauffage contre une dizaine de jours à température ambiante [Trompier et al., 2014, Reyes et al., 2008]. Cette observation pourrait avoir des applications pratiques s'il fallait rapidement atteindre la stabilisation du *BKS*.

Il semble donc que la température impacte uniquement sur les radicaux o-semiquinones anioniques non stabilisés par les charges positives (Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...). En effet, l'intensité du signal endogène après le traitement thermique à $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ est du même ordre de grandeur que celle initiale (obtenue après traitement dans l'eau). Dès lors, cette température n'est pas suffisante pour dégrader la semiquinone stabilisée. Nous n'avons pas pu augmenter la température car au-delà de $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, les échantillons d'ongles se carbonisent, détruisant ainsi la matrice biologique.

Le signal endogène stabilisé par interaction coulombienne est extrêmement stable.

À ce niveau-là de l'étude sur le signal endogène, une question subsiste : **comment sont générés les radicaux endogènes à l'origine du signal endogène *BKS* stable (mesuré après humidification) ?**

2.2.7 L'impact du rayonnement UV sur le signal endogène BKS

Les signaux UV-induits :

La lumière du soleil, et en particulier les rayonnements UVA, sont connus pour générer des radicaux libres dans les matériaux kératinisés [D'Orazio et al., 2013, Sebetić et al., 2008, Mamedov et al., 2002, Meybeck, 1979] et, par conséquent, dans les ongles [Tipikin et al., 2015, Şahiner et al., 2015]. Il est donc important d'analyser l'effet des rayonnements UV sur les signaux RPE observables dans les ongles et en particulier la nature et la stabilité des signaux induits par ce type de rayonnement. En effet, cette étude pourrait apporter des éléments de réponse sur l'origine possible du signal endogène *BKS*. Étant donné que les individus sont exposés quotidiennement aux rayonnements UV, la question qu'on pourrait légitimement se poser est de savoir si cette exposition régulière génère un signal stable (à l'instar du signal radio-induit *RIS 5*) qui contribuerait, en partie ou entièrement, au signal endogène *BKS*.

Les rayonnements UV se divisent en 3 catégories :

- Les UVA de longueur d'onde comprise entre 320 et 400 nm. Ces rayonnements sont très peu atténués par la couche d'ozone. Le rayonnement UV qui atteint la Terre est composé à 96 % d'UVA ;
- Les UVB de longueur d'onde comprise entre 290 et 320 nm. Ces rayonnements sont très fortement atténués par la couche d'ozone et seulement 4 % du rayonnement UV sur Terre est composé d'UVB ;
- Enfin les UVC de longueur d'onde comprise entre 100 et 280 nm. Ces rayonnements sont quasi totalement atténués par la couche d'ozone.

La figure 54 représente les spectres RPE obtenus après irradiation UV (A, B et C).

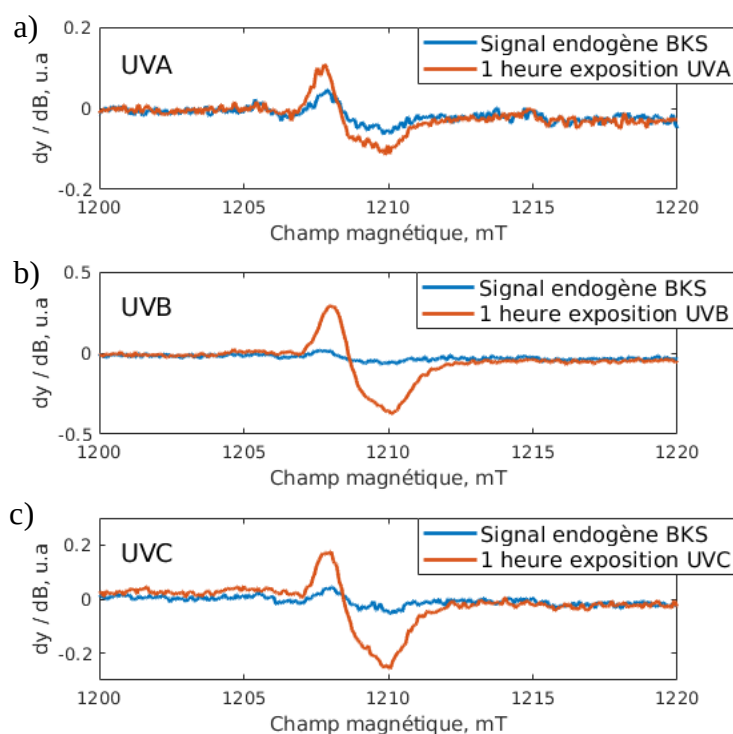


Figure 54 : Spectres RPE avant et après exposition aux rayonnements UVA (a), UVB (b) et UVC (c) pendant 1 heure. Le signal endogène BKS a été obtenu en traitant les échantillons dans de l'eau distillée pendant 1 heure puis en les séchant sous vide pendant 16 heures. La puissance du rayonnement micro-onde est de 0,6 mW.

On constate que l'exposition des ongles aux rayonnements UV (A, B et C) génère des radicaux libres ayant les mêmes caractéristiques spectrales que le *BKS*. Ce résultat est en accord avec la littérature [Tipikin et al., 2015, Şahiner et al., 2015]. Nous avons également mesuré ces échantillons à plus forte puissance micro-onde afin de mettre en évidence les radicaux ayant des temps de relaxation plus courts que ceux à l'origine du *BKS*. Ainsi, la figure 55 montre les spectres obtenus à une puissance micro-onde de 9,5 mW après 1 heure d'irradiation UV (A, B et C).

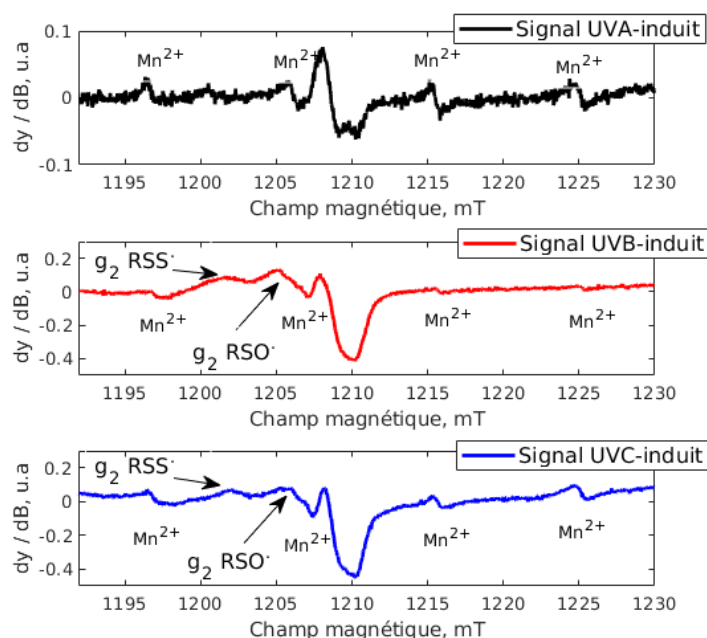


Figure 55 : Spectres RPE des échantillons d'ongles exposés aux rayonnements UVA (a), UVB (a) et UVC (b) obtenus à une puissance micro-onde de 9,5 mW.

Nous remarquons que les rayonnements UV B et C génèrent, en plus du signal endogène *BKS*, des radicaux soufrés. Dans la zone du signal endogène *BKS*, on distingue ainsi les signatures spectrales des radicaux perthiyl $\text{RSS}\cdot$ et sulfinyl $\text{RSO}\cdot$. Ces radicaux peuvent également être générés dans les ongles par stress mécanique (*MIS 1* et *MIS 4*) ou par irradiation à forte dose (*RIS 1* et *RIS 4*) [Trompier et al., 2014]. Ces signaux UV-induits, que nous pourrions nommer *UVIS 1* et *UVIS 4* d'après la nomenclature utilisée pour les signaux radio-induits, sont très peu intenses et ne constituent pas un réel problème en dosimétrie RPE. En effet, ces radicaux sont instables et une simple humidification des échantillons suffit à les

éliminer. Toutefois, nous n'avons pas observé le doublet centré en $g=2,004$ à l'instar des signaux *MIS 3* et *RIS 3*. Le radical glycyle à l'origine de ces signaux réagissent très fortement avec le dioxygène ambiant conduisant à leur extinction rapide. On peut supposer qu'il en est de même avec les molécules d'ozone (O_3) extrêmement oxydantes générées par irradiation UV et c'est peut-être la raison pour laquelle nous n'observons pas de signal *UVIS 3*.

Étude des signaux UVA-induits :

Il est important de préciser que les individus sont principalement exposés aux rayonnements UVA et c'est notamment pour cette raison que l'étude présentée ici porte principalement sur ce type de rayonnement. L'objectif de ce paragraphe est de vérifier si les rayonnements UVA sont susceptibles de générer des espèces radicalaires stables qui pourraient être à l'origine du *BKS*. D'une part, nous avons comparé les spectres RPE d'un échantillon d'ongle non-irradié et mesuré après oxydation à celui d'un échantillon directement après d'irradiation UVA (1 heure, source artificielle, $1,8 \text{ mW.cm}^{-2}$). D'autre part, nous avons comparé les spectres RPE de deux échantillons d'ongles, l'un irradié, l'autre non, tous deux obtenus après traitement dans l'eau puis séchage sous vide. Les résultats sont présentés dans la figure 56.

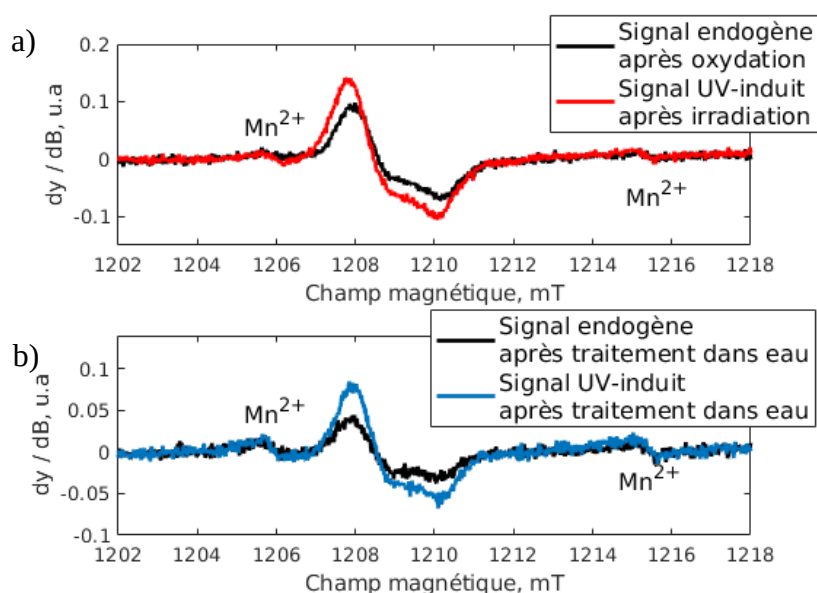


Figure 56 : a) Spectres RPE du signal endogène après oxydation (gris) et UV-induit (rouge).

b) Spectres RPE du signal UV-induit (bleu) et endogène (noir) après humidification et séchage sous vide. La puissance du rayonnement micro-onde est de $0,6 \text{ mW}$.

Directement après une exposition d'une heure aux rayonnements UVA, on observe un intense signal ayant les mêmes caractéristiques spectrales que le signal endogène (figure 56 a). L'intensité de ce signal UV-induit est supérieure à celle du signal endogène oxydé ce qui nous indique que les rayonnements UVA génèrent bien, à l'instar des rayonnements ionisants, des espèces radicalaires, a priori, de la même nature que celles du *BKS*. L'évolution de l'intensité de ce signal mesuré directement après irradiation en fonction de la durée d'exposition aux UVA est présentée sur la figure 57.

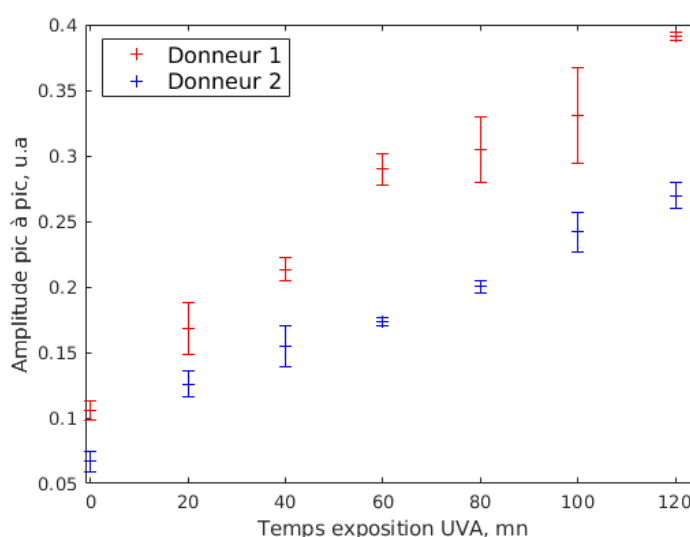


Figure 57 : Evolution de l'intensité du signal UV-induit mesuré directement après irradiation UVA en fonction du temps d'exposition aux rayonnements UVA artificiels (365 nm, 1,8 mW.cm⁻²).

On constate que l'intensité de ce signal varie linéairement avec la durée d'exposition aux rayonnements UVA. Après deux heures d'exposition, nous n'avons pas constaté de saturation du signal. On a là une forte similarité avec l'évolution du signal radio-induit *RIS 2* avec la dose. En vue des similitudes avec le signal endogène, nous avons procédé à des simulations spectrales sur ce signal de la même manière dans la partie « 2.2 Caractérisation du signal endogène ». Les résultats sont présentés dans la figure 58.

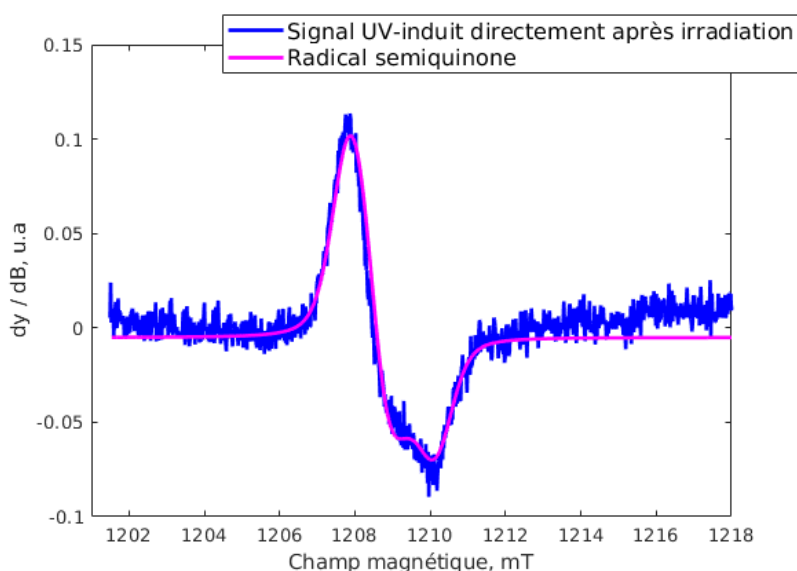


Figure 58 : Spectres RPE représentant le signal UV-induit (bleu) mesuré directement après irradiation et la simulation spectrale du radical semiquinone (violet).

Le spectre simulé de semiquinone reproduit plutôt fidèlement le spectre expérimental obtenu directement après irradiation UVA. En ce sens, le RMSD associé à la simulation spectrale est de 6,4 % ce qui conforte l'hypothèse que les rayonnements UVA génèrent des radicaux semiquinones au sein des ongles. **Ce signal mesuré directement après irradiation UVA est noté *UVIS 2* par analogie à la nomenclature utilisée pour les signaux radio-induits.**

Lorsqu'on humidifie l'échantillon d'ongle, le signal produit sous irradiation UVA est réduit (figure 56 b). Ce signal est notablement supérieur au signal endogène stable (mesuré après humidification). À l'instar de l'étude qui a été menée précédemment sur l'*UVIS 2*, nous avons voulu vérifier si l'intensité de ce second signal UV-induit variait également avec la durée d'exposition aux UVA. Pour ce faire, ce signal UV-induit a été mesuré chez deux donneurs pour différentes durées d'exposition aux UVA (365 nm, 1,85 mW.cm⁻²). En France, la fluence en UVA moyenne reçue par un individu est d'environ 12,4 J.cm⁻² par jour [Chaillol, 2011]. Ainsi, 1 jour d'exposition naturelle correspond à environ 2 heures d'exposition artificielle. La source de rayonnements UVA permet donc d'élaborer les courbes de réponse en dose UV plus rapidement. Les résultats sont présentés dans la figure 59.

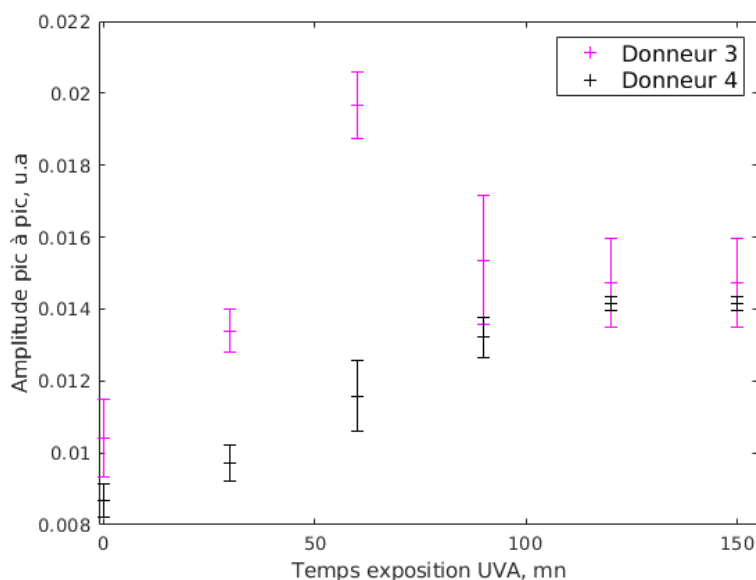


Figure 59 : Evolution de l'intensité du signal UV-induit mesuré après traitement dans l'eau en fonction du temps d'exposition aux rayonnements UVA artificiels (365 nm, 1,8 mW.cm⁻²).

L'évolution de l'intensité du signal UV-induit obtenu après traitement dans l'eau est similaire à celle du signal radio-induit *RIS 5*. En ce sens son intensité augmente également avec la durée d'exposition aux rayonnements UVA et, à l'instar du signal radio-induit stable, le *RIS 5*, son intensité sature. **Ce signal sera noté *UVIS 5*, toujours par analogie des signaux radio-induits.** Concernant les échantillons étudiés, l'*UVIS 5* sature après 60 minutes ou 90 minutes d'exposition aux UVA soit une différence de 50 %. Nous n'avons pas étudié suffisamment d'échantillons pour une étude statistique robuste sur la variabilité de la saturation, toutefois nous remarquons que la « dose rayonnement UVA » de saturation diffère significativement d'un individu à l'autre, à l'instar de la dose de saturation du signal *RIS 5* [Marciniak et al., 2016].

Ces résultats laissent suggérer qu'à l'instar des rayonnements ionisants, les rayonnements UVA génèrent un signal UV-induit stable noté *UVIS 5*.

Stabilité du signal UV-induit stable :

Nous venons de voir que l'intensité du signal UV-induit obtenu après traitement dans l'eau augmente avec la durée d'exposition aux rayonnements UVA. Seulement, ce signal

possède les mêmes caractéristiques spectrales que le signal endogène stable. La question que nous pourrions nous poser est de savoir si ce signal UV-induit stable contribue au signal endogène. Un critère est la stabilité de celui-ci après traitement dans l'eau. En effet, si des bains successifs permettent de l'éliminer, alors il ne constituerait pas de réel souci en dosimétrie RPE et nous pourrions mesurer uniquement le signal endogène sans ambiguïté. Pour cela, nous avons testé la stabilité de ce signal UV-induit mesuré après plusieurs traitements dans l'eau. Les résultats sont présentés dans la figure 60.

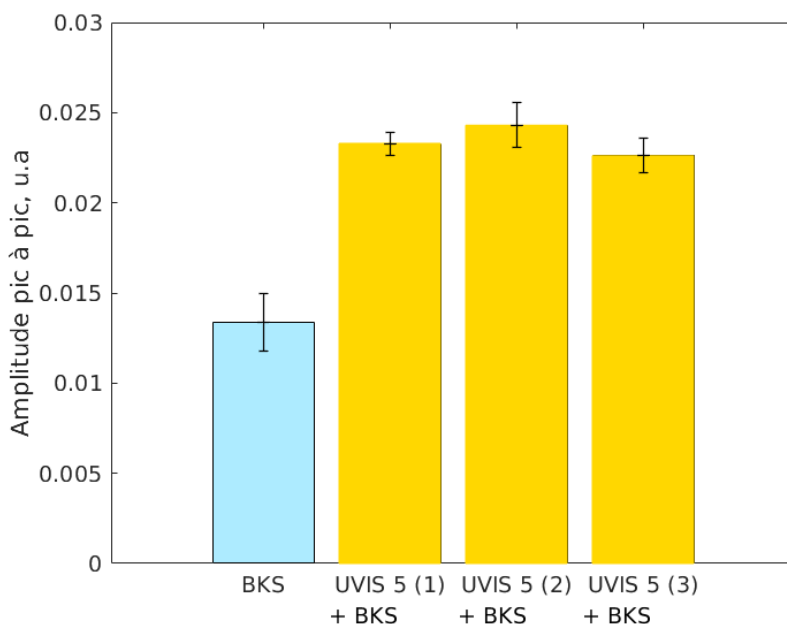


Figure 60 : Intensités spectrales du signal endogène *BKS* et UV-induit après traitement dans l'eau. L'échantillon exposé aux rayonnements UVA a subi trois traitements dans l'eau puis séchage sous vide.

Après irradiation aux UVA et humidification, on note que le signal mesuré est supérieur au signal endogène *BKS* stable, la différence d'intensité est attribuée à l'*UVIS 5*. Même après trois cycles d'humidification et de séchage, l'intensité du signal UV-induit reste inchangée, comme pour le *BKS* et le *RIS 5*. Cette observation laisse suggérer que les rayonnements UVA génèrent un signal UV-induit stable (*UVIS 5*) de la même manière que les signaux radio-induits (*RIS 5*). Ce résultat est particulièrement intéressant puisque nous montrons que les rayonnements UVA contribuent, au moins en partie, au signal endogène. Le signal *UVIS 2* ne pose pas réellement de problème dans le cadre de la dosimétrie RPE des rayonnements ionisants. En effet, à l'instar du *RIS 2*, un simple traitement dans l'eau est

suffisant pour l'éliminer. En revanche, le signal UV-induit stable, l'*UVIS 5*, est résistant à l'eau et il se superpose au signal endogène *BKS* et devrait donc contribuer à sa variabilité intra et inter-individu.

Le signal UV-induit *UVIS 5* est extrêmement stable et résistant à l'eau.

Origine du signal *UVIS 5* :

Nous venons de montrer l'existence d'un signal UV-induit particulièrement stable. Toutefois, la nature de ce radical demeure inconnue et se doit d'être caractérisée. Il n'est pas absurde de penser que les radicaux à l'origine de l'*UVIS 5* sont des radicaux semiquinones anioniques générés à partir des molécules de DOPA et stabilisés par les cations avoisinants à l'instar du signal endogène *BKS*. Afin d'apporter des éléments de réponse, nous avons irradié aux UVA un échantillon d'ongle pendant 2 heures (maximisation de l'intensité de l'*UVIS 5*) puis l'avons traité dans de l'eau distillée et séché sous vide. Le spectre ainsi obtenu a été comparé au spectre simulé de semiquinone de la même manière dont nous avons procédé pour le signal endogène *BKS* (« 2.2 Caractérisation du signal endogène »). Le résultat est présenté dans la figure 61.

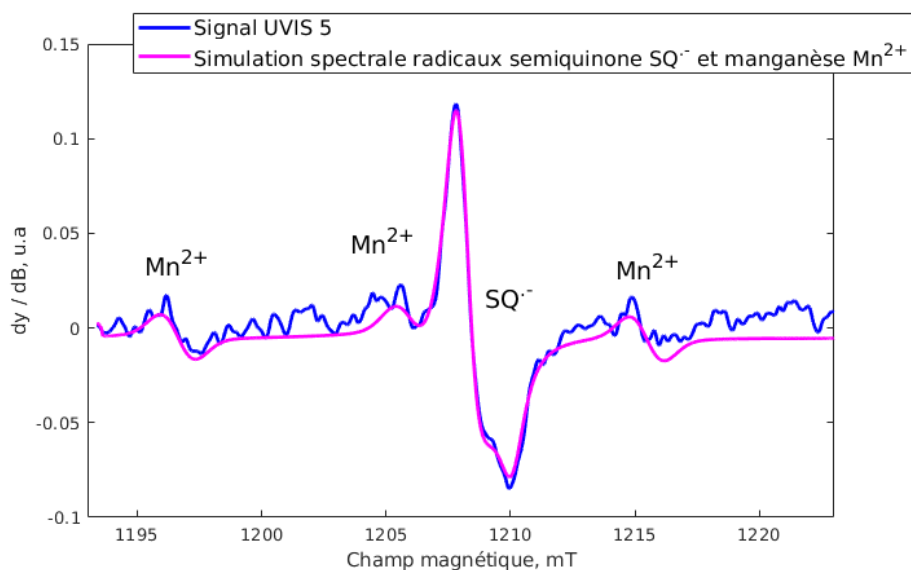


Figure 61 : Spectre RPE représentant le signal UV-induit stable, *UVIS 5* (bleu), après exposition pendant 2 heures à une source artificielle d'UVA (365 nm, 1,85 mW.cm⁻²) et traitement pendant 1 heure dans l'eau puis séchage de 16 heures dans un dessiccateur sous vide. Le spectre simulé de semiquinone est représenté en rose.

Le spectre expérimental de la composante stable induite par les UVA est en accord avec le spectre simulé de semiquinone avec un écart moyen relatif entre le modèle théorique et le spectre expérimental (*RMSD*) de 4,1 %. On peut donc conclure que ce signal UV-induit stable est de la même nature que le signal endogène. Au bilan, un signal UV-induit stable est généré par les rayonnements UVA et se superpose au signal endogène de la même manière que le signal radio-induit stable *RIS* 5. On a là une véritable analogie entre les signaux UV-induits *UVIS* 2 et 5 et les signaux radio-induits *RIS* 2 et 5.

L'intensité du signal *UVIS* 2 varie linéairement avec la durée d'exposition aux rayonnements UVA. L'intensité du signal *UVIS* 5, à l'instar du signal radio-induit *RIS* 5, augmente avec la dose puis sature. Les radicaux à l'origine de ces signaux sont des radicaux semiquinones générés à partir des molécules de DOPA.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici soulèvent de nouvelles questions. En particulier, **qu'est-ce que le signal endogène *BKS* ? Est-il dû uniquement aux radicaux semiquinones générés lors de la genèse de l'ongle par un mécanisme encore inconnu ? Ou est-il uniquement généré par exposition aux rayonnements UVA ?**

Les radicaux UV-induits sont-ils à l'origine du signal endogène ?

On pourrait penser que si le signal endogène *BKS* est uniquement généré par les rayonnements UV (autrement dit l'*UVIS* 5 et le *BKS* ne font qu'un), alors cette composante peut simplement être extraite dans les ongles des pieds. Or, bien que les pieds ne soient que très peu exposés à la lumière du jour, il faut garder en mémoire que la pousse de ces ongles est plus lente que pour les mains (une durée d'un an est nécessaire en moyenne pour une pousse complète des ongles de pieds contre 6 mois pour les mains) et que les dimensions sont également plus importantes. Ainsi, une simple exposition de quelques heures dans l'année serait amplement suffisante pour générer du signal UV-induit stable (*UVIS* 5). Afin d'extraire uniquement le signal endogène *BKS*, il faudrait étudier des ongles qui n'ont jamais été exposés à la lumière du jour ce qui est très compliqué à mettre en œuvre. Afin d'apporter des éléments de réponse, nous avons mesuré, pour un même individu, un prélèvement d'ongle de pieds provenant du gros orteil (auss appelé hallux) et du petit orteil (ou quintus). Le quintus

n'a pas été exposé à la lumière du jour sur la période de la pousse. Nous avons pris soin de prélever deux échantillons de masse similaire et de même taille. Les vitesses de pousse des ongles sont, a priori, les mêmes pour les deux doigts, seulement, leur longueur diffère d'un facteur 5 (1,5 cm contre 0,3 cm). Ainsi, la concentration en radicaux UV-induits devrait être différente entre ces deux échantillons. Si le signal endogène *BKS* n'est généré que par les rayonnements UV, alors nous ne devrions pas observer du signal RPE dans l'échantillon provenant du quintus. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 62.

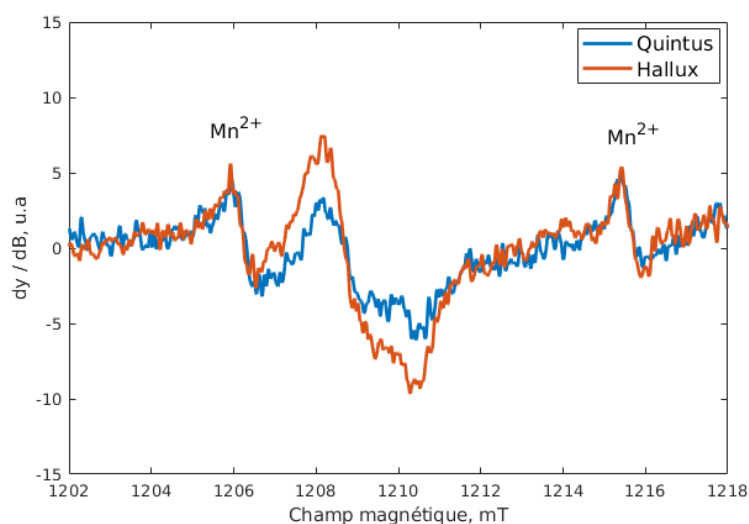


Figure 62 : Intensité du signal endogène *BKS* en fonction du doigt de prélèvement (pouce ou petit orteil).

La présence d'un signal endogène non nul sur l'échantillon prélevé sur le petit doigt de pied (quintus) indique qu'en l'absence d'exposition aux rayonnements UV, un signal endogène est effectivement créé. De plus, on note que l'intensité du signal endogène est différente selon l'hallux (gros orteil) ou le quintus (petit orteil) pour un même individu. Or, si le signal endogène *BKS*, est uniquement généré lors de la genèse de l'ongle, on aurait pu s'attendre à ce que les signaux aient la même intensité. Toutefois, l'échantillon d'ongle prélevé sur le gros orteil (hallux) a vraisemblablement été exposé aux rayonnements UVA. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, sa longueur est 5 fois supérieure à celle du petit orteil. Ainsi, en considérant une même vitesse de pousse (1 mm/mois), les radicaux UV-induits accumulés au sein de l'hallux datent des 15 derniers mois ce qui explique ces différences en intensité. Les radicaux UV-induits s'ajoutent donc aux radicaux endogènes.

Le signal endogène semble être intrinsèque à l'échantillon. Les radicaux UV-induits stables (signal *UVIS* 5) ne sont pas responsables du *BKS* mais contribuent à sa variabilité en intensité. Les radicaux à l'origine du *BKS* et de l'*UVIS* 5 sont des radicaux o-semiquinones anioniques. Ces radicaux sont très probablement localisés à proximité d'impuretés métalliques (Al^{3+} , Ca^{2+} ...) et leur grande stabilité s'explique par leur interaction avec ces ions chargés positivement (interaction coulombienne) qui dépend de la charge de ces centres paramagnétiques et de leur distance respective.

Enfin, afin de confirmer expérimentalement l'impact d'une exposition « normale » à la lumière du jour sur le signal endogène, nous avons mené une expérience sur des échantillons d'ongles de cinq donneurs différents. Le signal endogène *BKS* a été mesuré après traitement dans l'eau et séchage sous vide. Ensuite, les échantillons ont été exposés pendant 3 semaines à la lumière du jour à l'extérieur. À la fin de cette période, les échantillons d'ongles ont été lavés puis traités dans de l'eau distillée avant d'être mesurés en spectroscopie RPE. Les résultats sont présentés dans la figure 63.

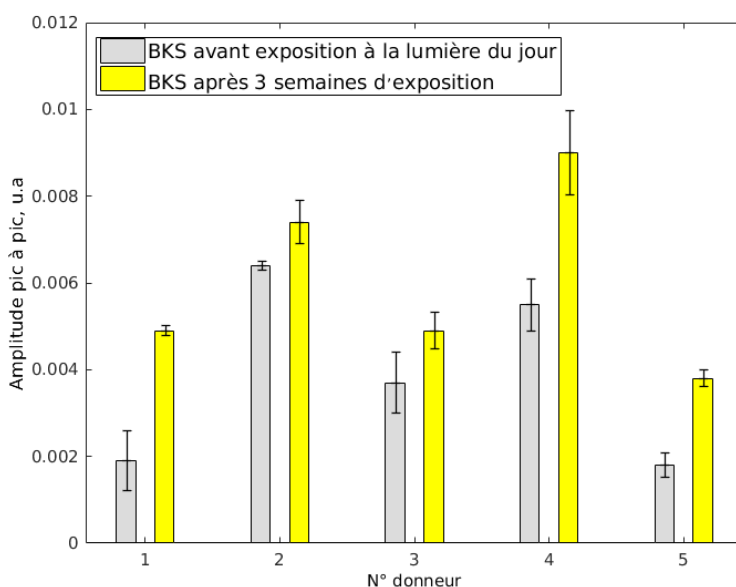


Figure 63 : Evolution de l'intensité du signal global (*BKS* + *UVIS* 5) avant et après 3 semaines d'exposition à la lumière du jour. Avant d'être mesurés, les échantillons ont été traités dans l'eau distillée puis séchés sous vide pour n'isoler que le signal endogène stable *BKS* et le signal UV-induit stable *UVIS* 5.

On constate une augmentation du signal endogène *BKS* qui résulte en fait de la superposition du véritable signal endogène *BKS* et du signal UV-induit stable, l'*UVIS 5*. Pour une même durée d'exposition, cette augmentation est à première vue très variable. Néanmoins, il semble qu'il y ait une corrélation entre l'intensité initiale et le taux d'augmentation de l'*UVIS 5*. Ce résultat est en accord avec le phénomène de saturation en dose de l'*UVIS 5*. En effet, plus la « pré-dose UV » reçue par l'individu est importante et plus le taux d'augmentation de l'*UVIS 5* (pente de la courbe) est faible. Ainsi, si on compare l'individu n°1 et l'individu n°2, il semblerait que la pré-dose UV de ce dernier soit plus importante ce qui explique la plus faible augmentation en intensité du signal global (comme illustré en figure 64).

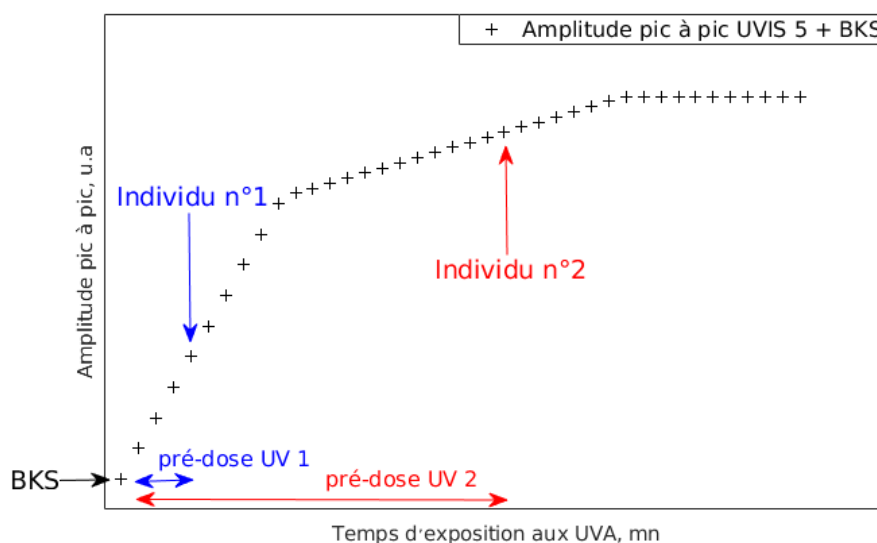


Figure 64 : Illustration de l'évolution de l'intensité du signal UV-induit stable (*UVIS 5*) avec le temps d'exposition aux UVA. En fonction de la pré-dose UV, le rendement de création des radicaux UV-induits stables sera plus ou moins important.

Autrement dit, plus l'individu aura été exposé longtemps à la lumière du jour, plus l'intensité du signal *UVIS 5* sera élevée. Ainsi, l'augmentation du signal RPE global {*BKS* + *UVIS 5*} sera moins importante car proche de la saturation. Le signal *UVIS 5* est un signal stable qui se superpose au signal endogène et qui contribue à sa variabilité entre individu mais également pour un même individu selon la période de prélèvement. La partie suivante de ce chapitre permettra d'apporter des éléments de réponse.

2.3 Variabilité en intensité du signal endogène

Nous avons vu dans la partie précédente quelques différences dans l'allure spectrale du signal endogène *BKS*. Dans le cas d'un accident radiologique localisé au niveau des mains, il n'est pas possible de mesurer le signal endogène étant donné que les signaux radio-induits se superposent à celui-ci. Il faut donc trouver un moyen pour l'estimer. Dès lors, deux approches pourraient ainsi être envisagées :

- Une approche personnalisée qui consisterait à mesurer l'intensité du signal endogène pour l'individu concerné soit en utilisant les ongles de la main non irradiée, soit en utilisant les ongles des pieds. Encore faut-il montrer que l'intensité du signal endogène ne varie pas pour un même individu selon l'extrémité prélevée. Des éléments de réponse seront apportés dans la première partie de ce paragraphe ;
- Une approche générique consisterait à estimer l'intensité moyenne du signal endogène pour un très grand nombre d'individus et de la soustraire au signal global constitué du signal endogène et du signal radio-induit stable *RIS 5*. Nous verrons si cette approche est pertinente dans la seconde partie de ce paragraphe.

2.3.1 La variabilité pour un même individu

Différences en intensité du signal endogène entre les mains et les pieds :

Il n'existe, à notre connaissance, qu'une seule étude portant sur la comparaison du signal endogène *BKS* entre les ongles des mains et des pieds [Le, 2015] réalisée en bande X sur deux individus. Les auteurs n'ont observé aucune différence ni dans l'allure spectrale, ni en intensité. En revanche, aucune étude sur la comparaison du signal endogène *BKS* selon le doigt ou la date de prélèvement n'a encore été menée à ce jour. Dans le but de vérifier si l'intensité du signal endogène est réellement identique pour un même individu quelque soit l'ongle prélevé, nous avons mesuré le signal endogène de plusieurs individus en utilisant, à chaque fois, un échantillon d'ongle de main et de pied. Les spectres RPE ont tous été normalisés par la masse respective des échantillons. L'ensemble des résultats étant similaires, nous n'en présentons ici que deux cas caractéristiques dans la figure 65.

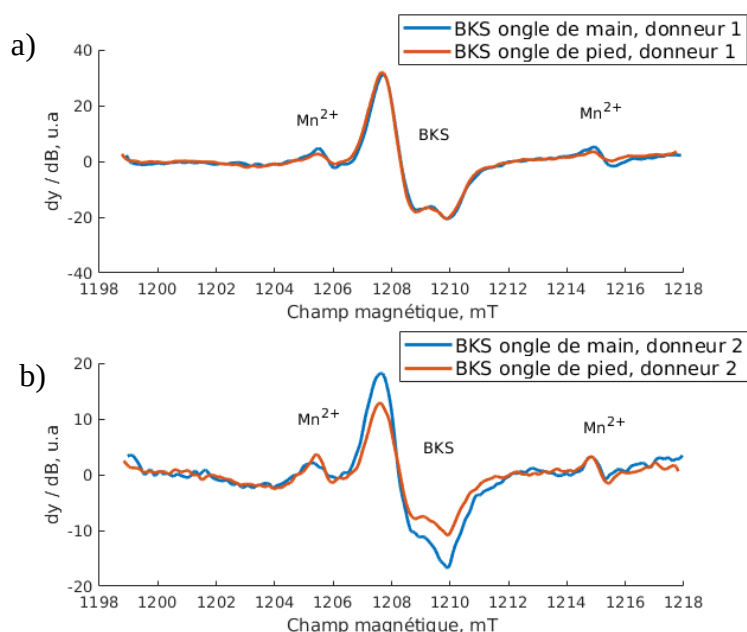


Figure 65 : Spectres RPE du signal endogène BKS pour deux individus (a et b) obtenus à partir d'ongles de mains (bleu) et de pieds (orange).

On constate que pour un même individu, l'intensité du signal endogène de l'ongle de pied (hallux) est soit égale, soit inférieure à celle de l'ongle de la main (différence de 50 %). Ce résultat est partiellement en accord avec l'étude de Le et al., (2002) qui ont trouvé que ces intensités étaient identiques. Dès lors, comment expliquer nos observations ?

Nous avons montré précédemment que l'exposition des ongles aux rayonnements UVA génère des signaux UV-induits identiques au signal endogène BKS. Or, la durée d'exposition à la lumière du jour dépend, pour sûr, des habitudes de vie, de la culture et des origines de chacun. Aussi, il est important de prendre en considération les différences de fluence énergétique en fonction des saisons [Chaillol, 2011]. En ce sens, les individus seront, a priori, moins irradiés en hiver qu'en été et ce, notamment concernant les pieds. De plus, les ongles poussent de façon continue tout au long de l'année à raison de 3 mm/mois pour les mains et de 1 mm/mois pour les pieds. Les ongles poussent donc entièrement (de la racine au bord libre) en 6 mois pour les mains et 1 an pour les pieds en moyenne. Ainsi, l'intensité du signal endogène mesurée à un moment donné est influencée par l'exposition aux rayonnements UV datant de l'ensemble des 6 derniers mois pour les mains, et des 12 derniers pour les pieds.

Il est probable que pour un même individu, l'intensité du signal *UVIS 5* soit plus importante dans les ongles de mains que dans les pieds ce qui expliquerait cette différence observée pour certains donneurs (figure 65 b et cas n°3, figure 66). En revanche, dans les cas où ces deux intensités sont égales (figure 65 a), alors deux possibilités sont envisageables. La première est que la concentration en radicaux semiquinones UV-induits est très faible par rapport à celle des radicaux endogènes (cas n°1, figure 66). Dans ce cas, l'intensité du signal global est principalement due aux radicaux semiquinones générés, a priori, lors de la genèse de l'ongle. La seconde est que la concentration en radicaux semiquinones UV-induits est identique et a atteint la saturation (cas n°2, figure 66). Ainsi, le signal global composé du *BKS* et de l'*UVIS 5* est identique pour les ongles de mains et de pieds.

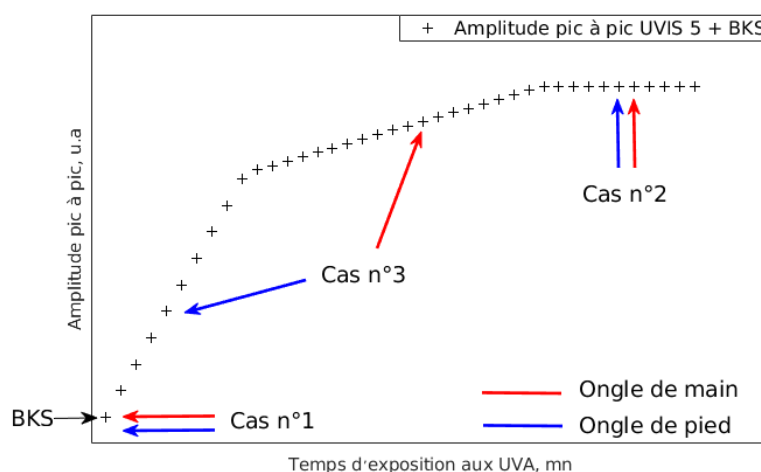


Figure 66 : Illustration de l'évolution de l'intensité du signal *UVIS 5* en fonction de la durée d'exposition aux rayonnements UVA. Dans le cas où le signal endogène (*BKS* + *UVIS 5*) des ongles de mains vaut celui des ongles de pieds, alors il est probable qu'il s'agisse du cas n°1 ou 2. Autrement, si les intensités spectrales sont différentes dans les ongles de mains et de pieds, il s'agit du cas n°3.

Variation de l'intensité du signal endogène selon le doigt de prélèvement :

Nous avons également testé la variabilité de l'intensité du signal endogène en fonction du doigt de prélèvement d'une même main. En effet, chaque doigt de la main est, a priori, exposé de la même façon aux rayonnements UV donc la concentration en radicaux UV-induits devrait être la même. Ainsi, une étude en bande Q a été réalisée en utilisant 1 ongle provenant de chaque doigt de 4 donneurs différents. Avant de faire l'acquisition spectrale, les échantillons ont été traités dans l'eau distillée puis séchés 16 heures sous vide.

Les spectres ont été normalisés par les masses respectives de chaque échantillon. Les résultats de cette étude sont présentés dans la figure 67.

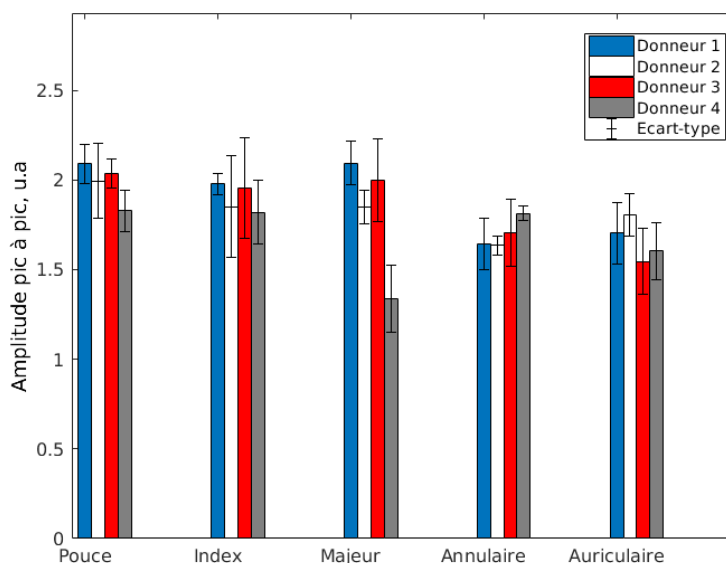


Figure 67 : Intensité du signal endogène *BKS* en fonction du doigt de prélèvement pour 4 donneurs différents.

On constate une variabilité de l'intensité du signal endogène entre 7 % et 13 % selon l'individu concerné. Compte tenu de l'écart-type associé à chaque mesure RPE, environ 8 à 10 %, on peut admettre que la variabilité de l'intensité du signal endogène n'est pas significative. Ce résultat est important et sera utile par la suite.

Variation de l'intensité du signal endogène selon la date de prélèvement :

Nous avons montré précédemment que les rayonnements UV, et plus particulièrement les UVA génèrent un signal stable, l'*UVIS 5*, qui se superpose au signal endogène *BKS*. Ainsi, il est utile d'analyser la variabilité, pour un même donneur, de l'intensité du signal endogène au cours de l'année. En effet, on pourrait s'attendre à ce que le signal endogène soit plus intense en été qu'en hivers du fait de la plus forte fluence énergétique en UVA [Chaillol, 2011].

Pour ce faire, une étude sur la variation de l'intensité du signal endogène *BKS* pour quatre donneurs réguliers sur une période d'un an a été réalisée. À l'instar des études

précédentes, les échantillons ont été traités dans l'eau puis séchés sous vide afin de s'affranchir des signaux RPE instables. La figure 68 représente les résultats de cette étude.

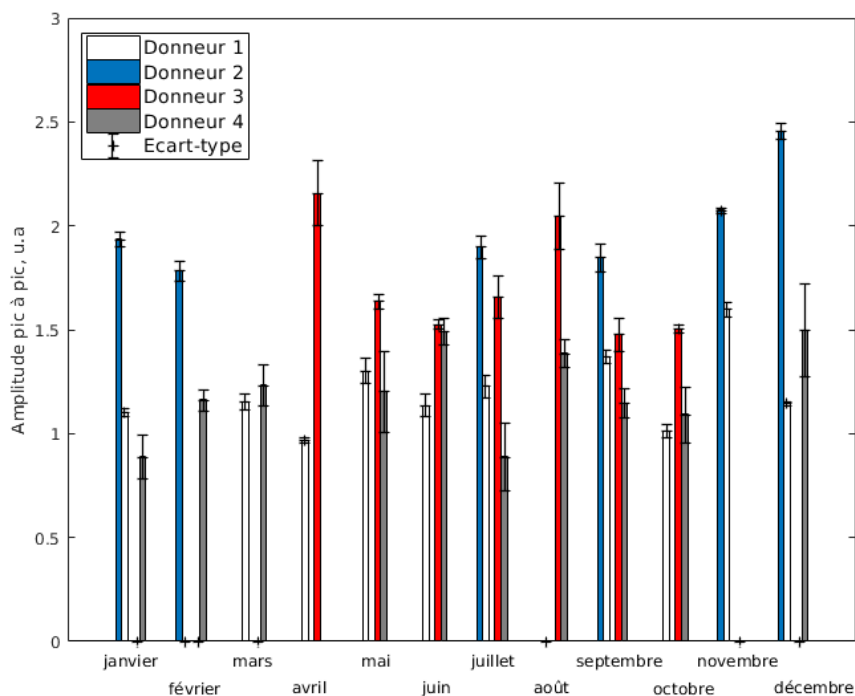


Figure 68 : Evolution de l'intensité du signal endogène BKS tout au long de l'année pour 4 donneurs différents.

L'intensité du signal endogène BKS varie au cours de l'année pour un même donneur. En effet, la dispersion relative des intensités du signal endogène BKS mesurées tout au long de l'année est comprise entre de 9 % et 18 % selon l'individu considéré. Cette variation en intensité peut s'expliquer en partie par l'exposition des ongles à la lumière du jour. Nous n'avons pas identifié de corrélation entre la saisonnalité et l'intensité du signal endogène. Quand bien même ce lien existerait, il serait très compliqué à déceler. En effet, lorsque les ongles sont exposés aux rayonnements UVA, il y a création de radicaux semiquinones UV-induits stables dans l'ensemble de l'ongle, de l'éponychium au bord libre. Il est logique de penser que la quantité de radicaux UV-induits sera plus importante en été qu'en hiver. Seulement, l'ongle pousse de façon continue tout au long de l'année à hauteur de 3 mm/mois pour les mains (1 mm/mois pour les pieds). En théorie, si l'on ne considère qu'une seule et unique exposition aux UV en janvier, il sera possible de mesurer cette information jusqu'en juin pour les mains (décembre pour les pieds). L'intensité du signal endogène mesurée à un

moment donné est donc due à l'exposition aux rayonnements UV datant de l'ensemble des 6 derniers mois pour les mains (12 derniers pour les pieds). La mesure à un instant donné de l'intensité du signal endogène est liée à l'accumulation des radicaux UV-induits des 6 ou 12 derniers mois selon l'extrémité étudiée.

La variabilité en intensité du signal endogène semble dépendre de la concentration en radicaux semiquinones UV-induits stables. Ainsi, l'intensité du signal endogène *BKS* n'est pas forcément égale dans les ongles de pieds et de mains. Par conséquent, dans un souci d'extraction de la composante radio-induite *RIS 5* dans le cas d'un accident radiologique localisé au niveau des mains, il ne serait pas pertinent de soustraire l'intensité mesurée dans les ongles de pieds même celle provenant du quintus. En effet, la contribution des radicaux UV-induits sur le signal endogène serait alors inconnue. Par conséquent, si l'on veut extraire la composante radio-induite *RIS 5* dans le cas d'un accident radiologique réel le plus justement possible, il est impératif de mesurer les ongles de la main non irradiée quand cela est possible.

2.3.2 La variabilité inter-individu

Dans le cas d'un accident radiologique localisé au niveau des mains, une approche générique pour extraire la composante radio-induite *RIS 5* serait de soustraire un signal endogène *BKS* moyen calculé pour un grand nombre d'échantillons provenant des mains des donneurs. L'objet de ce paragraphe est de voir si une telle approche est pertinente ou non.

Pour ce faire, nous avons mesuré le signal endogène *BKS* de 30 donneurs différents : 17 femmes, 13 hommes. Parmi l'ensemble des donneurs, 20 sont de type Caucasien, 6 de type Asiatique et 4 de type Africain. Nous ne sommes pas en mesure de tirer de robustes conclusions statistiques avec une cohorte de 30 donneurs, toutefois, en fonction des résultats obtenus, nous serons capables de juger de la pertinence de cette approche générique. Avant d'être mesurés, les échantillons ont été nettoyés, trempés dans l'eau distillée 1 heure puis séchés sous vide pendant 16 heures. Les résultats de cette étude de variabilité du signal endogène *BKS* sont présentés dans la figure 69.

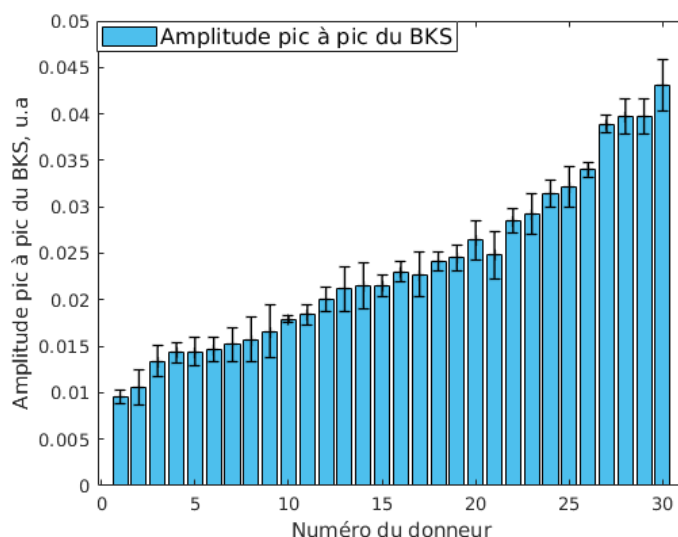


Figure 69 : Intensités du signal endogène *BKS* mesurées pour une cohorte de 30 donneurs différents.

D'après les résultats obtenus, les intensités des signaux endogènes calculés pour la cohorte de 30 donneurs varient d'un individu à l'autre jusqu'à plus de 350 %. La dispersion relative des intensités mesurées est de 37,45 % ce qui est considérable. Comment interpréter ces différences en intensité ? Plusieurs possibilités sont à prendre en compte pour éclaircir ce point. Tout d'abord, nous avons montré l'impact de la lumière naturelle, et plus particulièrement des rayonnements UVA, sur la variabilité du signal endogène pour un même individu (« 2.3.1 La variabilité pour un même individu »). Il est clair que l'ensemble des 30 individus de la cohorte étudiée ne possède pas les mêmes habitudes de vie et certains, plus que d'autres, vont s'exposer davantage au soleil générant au passage plus de radicaux UV-induits. De plus, Greaves et Moll, ont étudié en 1976 la composition en acides aminés des ongles d'une dizaine de donneurs différents. Ils ont notamment montré que le taux en tyrosine pouvait varier à hauteur de 10,67 %. Or, sachant que le signal endogène a pour origine un radical o-semiquinone anionique généré à partir de la DOPA, elle-même provenant de la tyrosine (« 2.2 Caractérisation du signal endogène »), on comprend que le taux initial de tyrosine impactera l'intensité du signal endogène. Enfin, la dernière explication, et sûrement la plus probante, concernant cette variabilité inter-individu est simplement les différences physiologiques des ongles entre les différentes personnes. En effet, le signal endogène est mesuré après traitement dans l'eau puis séchage sous vide afin de ne mesurer que les radicaux

stabilisés par les cations avoisinants. Encore une fois, il est fort probable que la concentration de ces ions diffère d'un individu à l'autre. Ce dernier point devrait faire l'objet d'une étude prochaine et permettra de mettre soutenir cette hypothèse fondamentale.

Finalement, l'ensemble des résultats présentés ici sont en accord avec ceux de Le, 2015 et notamment ceux de Swarts et al., (2016) portant sur la variabilité inter-individus du signal endogène *BKS*. Ces derniers ont réalisé une étude exhaustive sur plusieurs centaines d'individus présentée dans le tableau 8. Je n'ai malheureusement pas eu autant d'échantillons à traiter, toutefois les résultats que je présente ici sont en accord avec les leurs.

Tableau 8 : Intensités du signal endogène en fonction du genre, des origines et de l'âge des donneurs. Données provenant du poster de Swarts et al., lors du 62nd Annual International Meeting- Radiation Research Society (RADRES) en octobre 2016 à Hawaï.

Genre, origine, âge	Intensité du signal endogène BKS	Dispersion relative
	Moyenne (u.a) et écart-type (u.a)	(%)
Homme de type Caucasien 16 à 51 ans	$7,91 \pm 2,32$	29,33
Femme de type Caucasien 16 à 51 ans	$11,3 \pm 3,4$	30,09
Homme de type Africain 16 à 51 ans	$11,9 \pm 3,0$	25,21
Femme de type Africain 16 à 51 ans	$14,7 \pm 4,8$	32,65
Homme de type Asiatique 16 à 51 ans	$6,83 \pm 2,24$	32,80
Femme de type Asiatique 16 à 51 ans	$6,71 \pm 1,15$	14,14

Nous avons proposé, en introduction, une approche générique pour extraire la composante *RIS 5* du signal endogène *BKS*. Cette approche consisterait à soustraire un signal endogène moyen calculé pour un grand nombre d'individus au signal global regroupant le

signal endogène *BKS* et le signal radio-induit *RIS 5*. D'après les résultats obtenus, la dispersion de l'intensité du signal endogène inter-individu est d'environ 40 % et la différence entre deux donneurs peut atteindre plus de 350 %. Sachant qu'une dose de 2 Gy génère un signal radio-induit *RIS 5* qui augmente l'intensité du signal RPE global (*BKS* + *RIS 5*) de seulement 20 % [Trompier et al., 2014], on comprend que cette approche n'est pas pertinente. Nous ne pourrions pas estimer correctement le signal radio-induit *RIS 5* ni les doses estimées.

2.4 Synthèse sur le signal endogène

Le signal endogène est un signal anisotrope défini par $g_1=2,0060(2)$, $g_2=2,0054(2)$ et $g_3=2,0024(2)$. Pour un faible nombre d'individus, environ 10 % des 30 donneurs étudiés, un intense signal apparaît en $g=2,0024(2)$. Nous avons mené une investigation concernant la nature des radicaux responsables de ces signaux endogènes. Les résultats des expériences chimiques (oxydo-réduction, acido-basiques, conditions de stockage) couplés aux simulations spectrales ont permis de soutenir l'hypothèse que le signal endogène *BKS* a pour origine un radical o-semiquinone anionique, et l'intense signal isotrope provient du radical tryptophanyl dont l'anisotropie du facteur g n'est pas résolue en bande Q. Le radical o-semiquinone anionique est généré à partir des molécules DOPA, elles-mêmes provenant de l'oxydation partielle des acides aminés tyrosines par le dioxygène ambiant ou par interaction rayonnement-matière [Jain et al., 1997]. Les radicaux o-semiquinones anioniques semblent être générés dans l'ensemble du volume de l'ongle. Il serait intéressant de réaliser une expérience d'imagerie RPE pour confirmer cette hypothèse. Toutefois, une partie de ces radicaux anioniques semblent être stabilisés par des cations de type Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} naturellement présents dans les ongles expliquant la pérennité de l'information du signal RPE dans le temps. De plus, il est fort probable que certains des acides aminés hydrophobes tels que la méthionine ou la phénylalanine soient répartis de part et d'autre de certains de ces radicaux réduisant ainsi la cinétique de recombinaison radicalaire du signal endogène lors des traitements chimiques. L'ensemble des radicaux stabilisés dans l'échantillon sont responsables du faible signal endogène visible après traitement dans l'eau ou dans une solution réductrice par exemple. Nous avons également montré que l'exposition aux rayonnements UV, et plus particulièrement les UVA, génère un signal UV-induit stable que l'on nomme *UVIS 5*, ayant les mêmes caractéristiques spectrales que le signal endogène *BKS*.

Ceux qui seront stabilisés par les cations de type Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} seront responsables du signal *UVIS 5*, et ceux qui ne sont pas stabilisés seront responsables du signal *UVIS 2*. On a une analogie entre les signaux UV et radio-induits. En effet, l'intensité du signal *UVIS 2* varie linéairement avec la dose de rayonnement UV absorbée à l'instar du *RIS 2*. Et l'intensité du signal *UVIS 5* sature avec la dose de rayonnement UV. Toutefois, les rayonnements UV pénètrent moins profondément dans l'échantillon que les rayonnements γ ou X du fait de leur différence énergétique. C'est la raison pour laquelle le signal *UVIS 5* sature après seulement quelques minutes d'exposition (entre 60 et 90 minutes). Nous avons montré cependant que l'origine du signal endogène n'est pas uniquement due à une exposition préalable aux rayonnements UV. Le signal endogène *BKS* et le signal UV-induit stable *UVIS 5* sont donc deux signaux à part entière, identiques certes, mais d'origine différente. L'origine du *BKS* n'a cependant pas été résolue et constitue toujours une source d'interrogation.

Plusieurs expériences sur la variabilité de l'intensité du signal endogène intra et inter-individu ont permis de montrer que ce signal variait en fonction de l'extrémité prélevée, en fonction de la date de prélèvement et également selon l'individu considéré. Ces résultats sont capitaux. En effet, rappelons que lors d'un accident radiologique, il y a création d'un signal radio-induit stable mais faible en intensité, le *RIS 5*, qui se superpose au signal endogène *BKS* et, a fortiori, au signal UV-induit *UVIS 5*. Nous avons montré que la seule approche potentiellement pertinente pour extraire cette composante radio-induite était de soustraire au signal RPE global $\{BKS + UVIS\ 5 + RIS\ 5\}$ le signal endogène $\{BKS + UVIS\ 5\}$ provenant de la main non irradiée. En effet, ce signal endogène peut différer entre les ongles des mains et des pieds très probablement à cause de l'exposition préalable aux UVA. L'approche générique qui consisterait à soustraire une intensité moyenne calculée pour un grand nombre d'individus est inenvisageable. En effet, la différence en intensité du signal endogène peut atteindre près de 350 % entre 2 individus rendant cette approche inefficace. Enfin, nous avons rédigé plusieurs articles scientifiques qui résument l'ensemble de ces travaux et qui vont être soumis très prochainement (juillet 2018).

3 Les signaux radio-induits

Lors d'un accident radiologique, des radicaux radio-induits sont générés dans les ongles et, dans l'intervalle de dose considéré à savoir entre 0 et 100 Gy, deux signaux spécifiques à l'irradiation apparaissent, l'un très intense, dont l'intensité varie linéairement avec la dose absorbée, qui a été nommé *RIS 2*, et l'autre, le *RIS 5*, faible en intensité et qui varie de manière parabolique avec la dose, et dont la dose de saturation diffère d'un individu à l'autre [Trompier et al., 2014]. Ces signaux se superposent au signal endogène *BKS* et, par conséquent, au signal UV-induit stable *UVIS 5*.

Le *RIS 2* est assujetti à une forte décroissance liée au taux d'humidité in-vivo de l'ongle et un simple lavage de l'échantillon à l'eau peut l'éliminer complètement. De ce fait son utilisation pour réaliser une dosimétrie n'est pas envisageable dans des conditions réelles d'accident. En revanche, le deuxième signal spécifique à l'irradiation, le *RIS 5*, est quant à lui résistant à l'eau et il a déjà été utilisée pour doser la quantité de rayonnements radio-induits dans le cas d'accidents radiologiques [Trompier et al., 2014]. Le problème majeur réside dans le fait qu'il se superpose au signal endogène *BKS* et au signal UV-induit stable *UVIS 5* tous deux variables en intensité. Si un protocole d'estimation des fortes doses (> 10 Gy) a été mis en place récemment [Trompier et al., 2007], celui nécessite cependant d'être amélioré et validé. De plus il n'en existe pas à ce jour pour les plus faibles (< 10 Gy). Dans la suite de ce chapitre, **à défaut de connaître la contribution exacte du signal UV-induit *UVIS 5* dans l'intensité totale du signal endogène de chaque individu**, je ne ferai **plus de distinction entre ces deux signaux**. Lorsque je mentionnerai le signal endogène, celui-ci sera implicitement composé du signal endogène *BKS* et du signal UV-induit *UVIS 5*.

Nous présentons ici une l'analyse des signaux radio-induits *RIS 2* et le *RIS 5*. À l'instar du *BKS*, nous avons tenté de comprendre l'origine de ces signaux et de voir comment ils variaient de manière qualitative (forme spectrale) et quantitative (courbes de réponse en dose) pour un même individu mais également pour différents donneurs.

3.1 Le signal radio-induit *RIS 2*

Bien que ce signal radio-induit soit instable, il reste largement étudié par la communauté de dosimétristes RPE. En effet, il possède des caractéristiques spectrales similaires au signal endogène mais est nettement plus intense que celui-ci. Son intensité varie linéairement avec la dose absorbée ce qui permet une estimation robuste et simple des doses absorbées en conditions de laboratoire (stockage sous vide, absence de lumière). Ce signal est cependant très instable. Toutefois, peut-être existe-t-il une relation entre celui-ci et son homologue stable, le *RIS 5*, qui permettrait de développer une nouvelle approche d'estimation de dose ? À l'instar du signal endogène, un traitement chimique pourrait également être utilisé afin de pallier sa décroissance ? Nous tenterons d'apporter des éléments de réponse afin de conclure sur la potentialité réelle de ce signal radio-induit instable en conditions réelles d'accident.

L'objectif de ce paragraphe est, d'une part, de vérifier si l'allure des spectres des échantillons d'ongles irradiés varie d'un individu à l'autre et également selon l'extrémité prélevée (mains, pieds) et, d'autre part, d'identifier le ou les radicaux à l'origine de ces signaux. L'influence de traitements chimiques sur ce signal sera également étudiée.

3.1.1 Variabilité de l'allure spectrale du *RIS 2*

Avant de comparer les spectres d'ongles irradiés de différents donneurs, nous avons voulu vérifier si, pour un même individu, le signal radio-induit *RIS 2* avait la même allure spectrale en fonction de l'extrémité prélevée (mains et pieds). Les acquisitions spectrales ont été réalisées en spectroscopie RPE bande Q à température ambiante et les irradiations ont toutes été réalisées sur l'installation Alphée (« 5 Les dispositifs d'irradiation à l'IRSN ») en utilisant des rayons X de haute énergie (MeV). Les conditions d'irradiation sont présentées en annexe « 1.8 Irradiations Alphée ». La dose de rayonnements ionisants n'a pas été choisie au hasard. En effet, nous voulions faire l'acquisition spectrale d'un échantillon d'ongle dont l'intensité du signal radio-induit *RIS 2* était supérieure à celle du signal endogène tout en restant dans la gamme de dose considérée, à savoir entre 0 et 10 Gy. Pour comparer qualitativement l'allure des spectres des ongles irradiés, ceux-ci ont été normalisés de façon à obtenir une amplitude du signal radio-induit *RIS 2* égale à 1 u.a (figure 70).

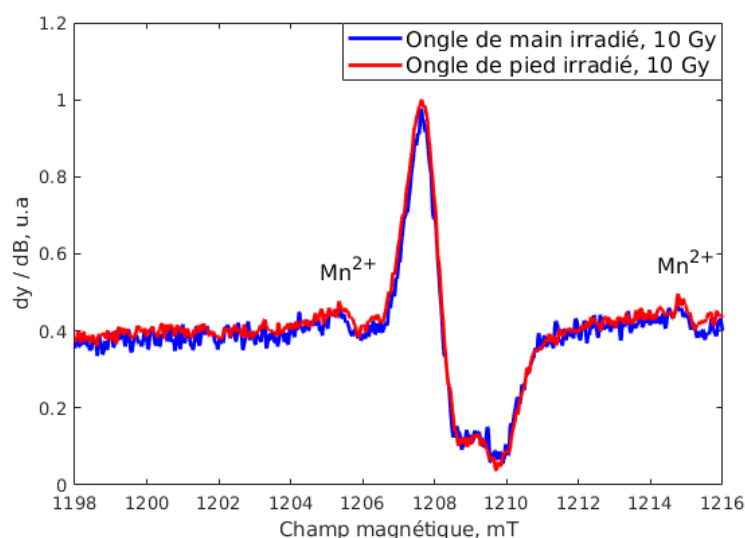


Figure 70 : Spectres RPE en bande Q d'un échantillon d'ongle de main (bleu) et de pied (rouge) tous deux irradiés à 10 Gy et normalisés à une amplitude de 1 u.a à des fins de comparaison.

Comme le montre la figure 70, on constate une très forte similarité dans l'allure des spectres des échantillons d'ongles de main et de pied irradiés et les facteurs g du signal radio-induit *RIS 2* sont similaires. Ainsi, on constate que le signal radio-induit *RIS 2* est défini par $g_1=2,0060-2,0061$, $g_2=2,0052$ et $g_3=2,0022-2,0023$. De plus, si on normalise les spectres RPE représentant le signal endogène et le signal radio-induit *RIS 2*, comme présenté dans la figure 71, on ne constate aucune différence significative si ce n'est un rapport signal sur bruit plus important pour le spectre de l'échantillon irradié. En effet, la concentration en radicaux libres étant directement proportionnelle à la dose absorbée par l'échantillon, plus ce dernier aura été irradié, plus le rapport signal sur bruit du spectre RPE sera important⁴.

⁴ Ce raisonnement est valable dans le cas d'une bijection entre la dose et l'intensité spectrale ce qui est le cas pour le *RIS 2* (variation linéaire) mais pas pour le *RIS 5* qui présente un phénomène de saturation [Trompier et al., 2014].

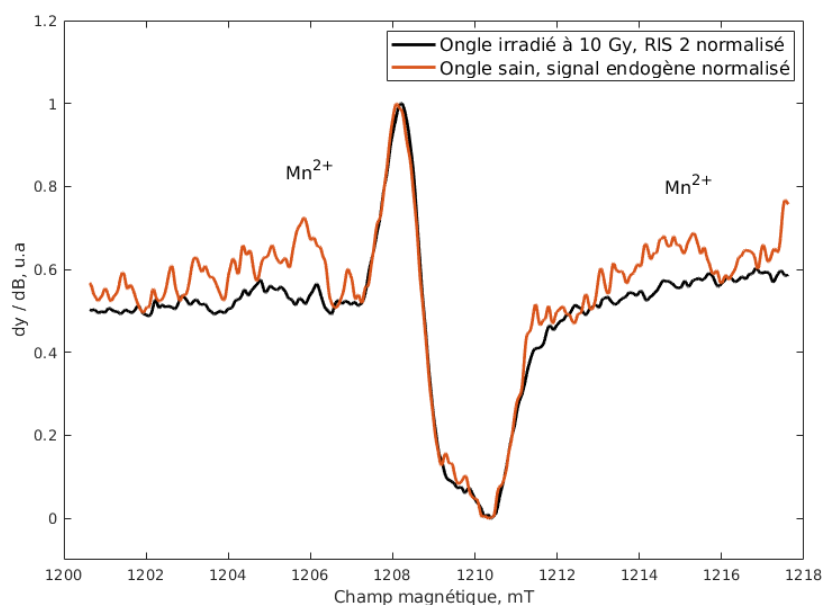


Figure 71 : Spectres RPE normalisés d'un ongle sain (orange) représentant le signal endogène et d'un ongle irradié à 10 Gy (noir) représentant le signal radio-induit *RIS 2*.

À l'instar de l'étude concernant la variabilité de l'allure spectrale du signal endogène, nous avons également vérifié si la forme spectrale du signal radio-induit *RIS 2* était similaire entre les différents individus. Ainsi, la figure 72 représente ce signal radio-induit obtenu après irradiation de 10 Gy pour 3 individus différents, selon les ongles de main (a) ou de pieds (b).

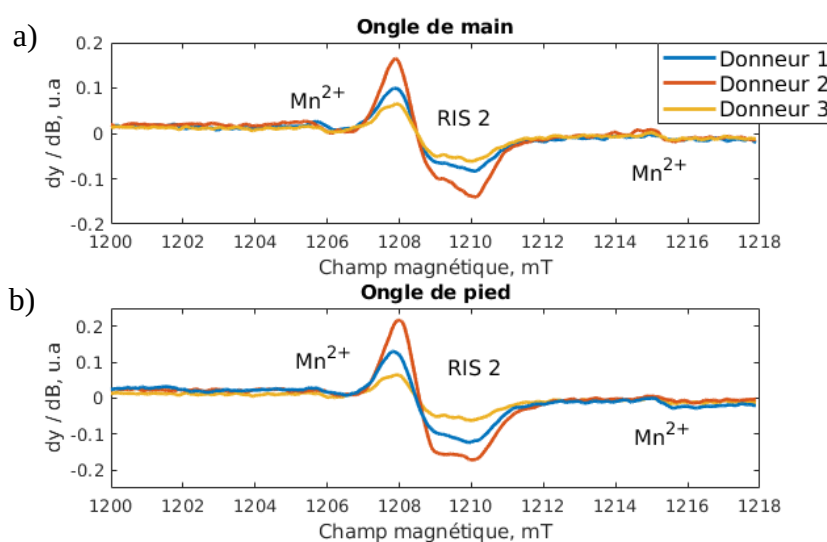


Figure 72 : Spectres RPE des ongles de main (a) ou de pied (b) irradiés à 10 Gy de trois donneurs différents.

Contrairement au signal endogène où nous avons remarqué de flagrantes différences dans les allures des spectres⁵, le signal radio-induit *RIS 2* ne semble présenter aucune particularité inter-individu (parmi l'ensemble des échantillons mesurés dans le cadre de cette étude) et les facteurs *g* sont identiques. Cependant, les intensités spectrales diffèrent et nous y reviendrons dans la suite de ce chapitre.

3.1.2 Identification du radical à l'origine du *RIS 2*

Étant donné que le signal radio-induit *RIS 2* possède des caractéristiques spectrales similaires au signal endogène, il est légitime de se demander si ces radicaux ont la même structure, à savoir un radical o-semiquinone anionique, mais généré différemment. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé l'acquisition spectrale d'un échantillon d'ongle de main et de pied avant et après irradiation de 10 Gy. Le spectre initial (signal endogène) a été soustrait au spectre final afin d'isoler la seule composante radio-induite *RIS 2* avant de procéder aux simulations spectrales du radical semiquinone défini par $g_1=2,0059$, $g_2=2,0054$ et $g_3=2,0022$ [Jeschke et al., 2005]. Ainsi, le tableau 9 et la figure 73 représentent les résultats de ces simulations spectrales.

Tableau 9 : Synthèse des résultats sur l'estimation des facteurs *g* du signal radio-induit instable *RIS 2*.

	Valeurs originales <i>BKS</i>	Intervalle des paramètres spectraux testés	Valeurs <i>RIS 2</i> ongles de main	Valeurs <i>RIS 2</i> ongles de pied
Facteur <i>g</i>	2,0060(2)	[2,0057 ; 20061]	2,0060	2,0061
(sans unité)	2,0054(2)	[2,0052 ; 20056]	2,0052	2,0052
	2,0024(2)	[2,0020 ; 20024]	2,0022	2,0023

⁵ Nous avons remarqué l'apparition d'un intense signal isotrope en $g=2,0022(2)$ lors de l'étude sur le signal endogène (« 2.1 Variabilité spectrale du signal endogène *BKS* »). Ce signal n'apparaissant que pour 3 donneurs de la cohorte totale, nous avons donc fait le choix de réserver ces échantillons pour de futures et complémentaires études en utilisant des spectromètres RPE à plus fortes fréquences micro-ondes (bande *W* à 94 GHz par exemple).

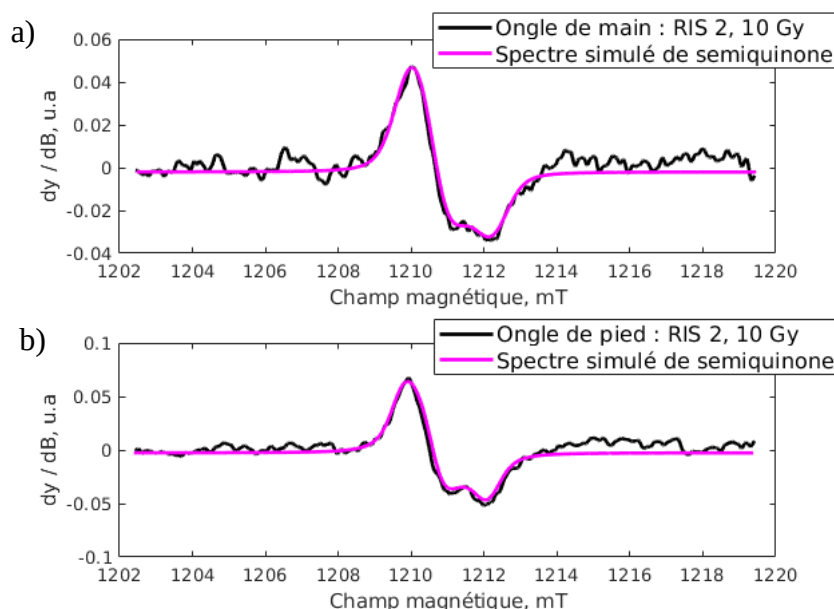


Figure 73 : Spectres RPE des ongles de main (a) et de pied (b) irradiés et leur simulation spectrale associée. Les paramètres spectraux sont répertoriés dans le tableau 9.

On constate que les paramètres utilisés pour simuler le signal endogène sont similaires à ceux utilisés pour simuler le signal radio-induit *RIS 2* (tableau 9). En effet, les facteurs g calculés ne diffèrent qu'à hauteur de 0,0002 au maximum par rapport à ceux du radical semiquinone [Jeschke et al., 2005]. De plus, l'écart moyen relatif (*RMSD*) entre le modèle théorique (spectre simulé de semiquinone) et le spectre expérimental (*RIS 2*) est inférieur à 5 % et ce, à la fois pour les ongles de mains ou de pieds. Cette première étape est en accord avec l'hypothèse que le signal radio-induit observable directement après irradiation, le *RIS 2*, provient d'un radical semiquinone.

La seconde étape pour vérifier si les radicaux o-semiquinones anioniques étaient également responsables du signal *RIS 2* a consisté à étudier l'impact de l'oxydation des échantillons sur ce signal. Nous avons vu dans la partie « 2.2 Caractérisation du signal endogène » que le signal endogène pouvait être généré par oxydation soit en laissant l'échantillon à l'air libre, soit en utilisant une solution oxydante en milieu basique. Ainsi, les deux approches ont été menées sur un échantillon d'ongle irradié.

Il a été montré dans le chapitre précédent que le radical semiquinone était, d'une part, le plus stable sous sa forme anionique et d'autre part, qu'il pouvait être généré à partir de la molécule L-3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) par interaction rayonnement-matière [Tipikin et al., 2016]. Les molécules de DOPA sont générées par oxydation partielle de l'acide aminé tyrosine en présence de dioxygène ou par interaction rayonnement-matière [Jain et al., 1997]. De ce fait, si les entités paramagnétiques responsables de ce signal radio-induit sont effectivement des radicaux o-semiquinones anioniques, alors après la décroissance totale en intensité du *RIS 2*, nous devrions être en mesure de le reconstituer (en plus du *BKS*) en oxydant les échantillons. Ainsi, les intensités spectrales mesurées après un tel traitement devraient être identiques à celles obtenues directement après irradiation.

Dans un premier temps, 4 échantillons d'ongles d'un même donneur et irradiés à différentes doses (0, 10, 25 et 50 Gy) ont été immergés dans de l'eau distillée pendant une heure et ont séché à l'air libre. Les mesures en spectroscopie RPE bande Q ont été réalisées après 1 jour, 7 jours et 22 jours de séchage. Les résultats sont présentés dans la figure 74.

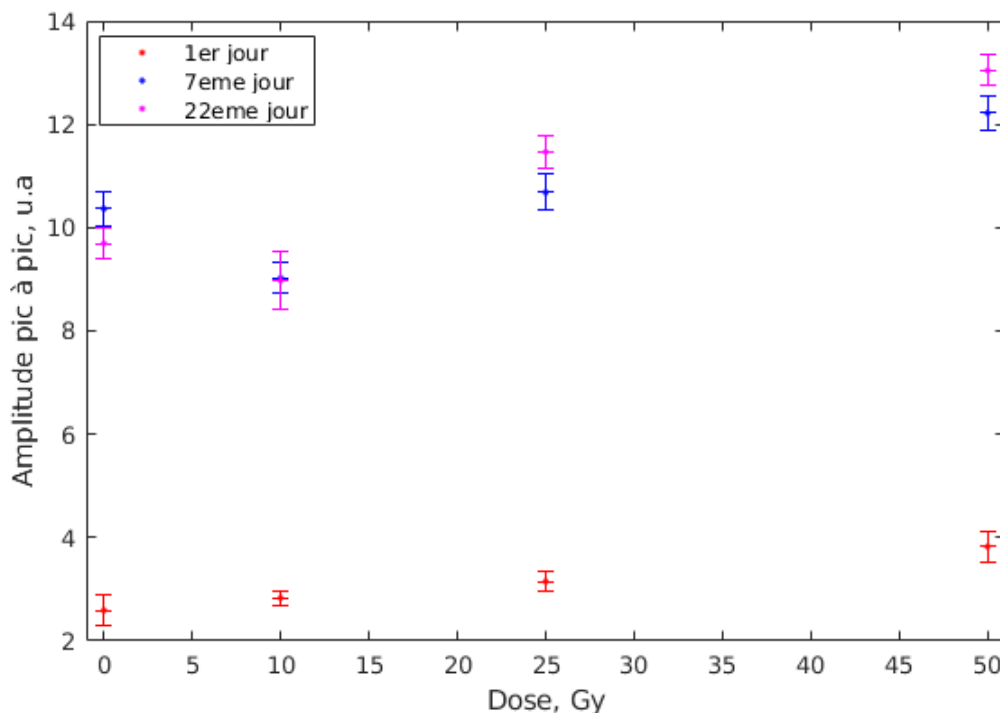


Figure 74 : Evolution de l'intensité du signal RPE après irradiation (0, 10, 25 et 50 Gy) après humidification d'une heure dans l'eau puis séchage à l'air libre 1 jour (rouge), 7 jours (bleu) et 22 jours (magenta).

En premier lieu, on constate qu'après 1 jour de séchage, l'intensité du signal RPE d'intérêt augmente avec la dose. Il s'agit en réalité du signal endogène superposé au signal radio-induit stable *RIS* 5 comme nous le verrons par la suite. L'intensité du signal radio-induit *RIS* 2 varie linéairement avec la dose absorbée [Marciniak et al., 2016, Trompier et al., 2014]. Nous verrons dans la suite de ce chapitre qu'il existe une certaine variabilité inter-individu, toutefois, pour une dose de 10 Gy, le *RIS* 2 devrait être environ 2 fois plus important que le *BKS*, et pour une dose de 50 Gy, 5 fois plus intense. Or, après 22 jours de séchage à l'air libre⁶, les intensités spectrales sont toutes du même ordre de grandeurs et ce pour l'ensemble des doses étudiées (de 0 Gy à 50 Gy). Le signal mesuré au bout de 22 jours correspond au signal endogène oxydé auquel s'ajoute le signal radio-induit stable *RIS* 5. Au bilan, le signal radio-induit *RIS* 2 ne repousse pas comme ce fut le cas du *BKS* (« 2.2.4 L'impact du milieu ambiant sur l'intensité du signal endogène »).

Le signal radio-induit *RIS* 2 est vraisemblablement généré dans tout le volume de l'ongle lors de l'exposition aux rayonnements ionisants. Des études complémentaires en imagerie RPE devrait nous renseigner sur ce point et seront menées prochainement. Les ongles, de par leur constitution (alpha kératine, lipides...) et leur structure particulière (enchevêtrement fibres de kératines sous forme de maillage), empêchent le dioxygène de pénétrer profondément dans le volume et donc d'oxyder les molécules de DOPA spécifiques à l'irradiation. C'est notamment pour cette raison que nous ne sommes pas en mesure de régénérer le *RIS* 2 entièrement. Cependant, les traitements chimiques des échantillons d'ongles dilatent leur structure (ruptures ponts disulfures par exemple) et permettent ainsi une oxydation plus profonde des molécules de DOPA. C'est la raison pour laquelle nous avons investigué l'impact d'une oxydation en solution des échantillons irradiés.

Ainsi, afin d'apporter davantage d'éléments de réponse, un échantillon d'ongle a été irradié à 5 Gy et le *RIS* 2 a été mesuré. Cet échantillon a ensuite été traité dans de l'eau distillée pour éliminer entièrement ce dernier. Enfin, un traitement oxydant a été réalisé avec une solution de 0,1 M de K_3FeCN_6 à $pH=13$ pendant 1 heure. Le ferricyanure de potassium permet d'oxyder les systèmes organiques [Bharat, 1960] et donc permet de générer les

⁶ Après 22 jours de séchage, le signal RPE d'intérêt est stable et ne varie pas dans le temps.

radicaux o-semiquinones anioniques à partir des molécules DOPA. L'échantillon d'ongle a été séché sous vide pendant 16 heures avant d'être mesuré. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 75.

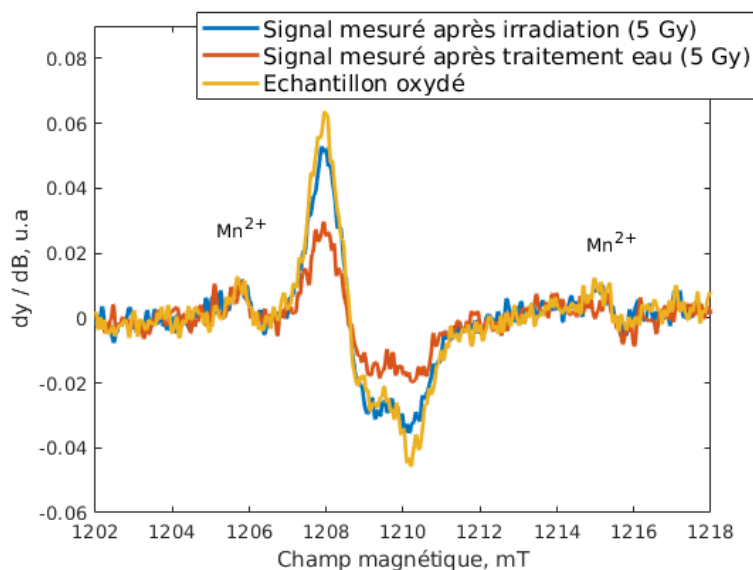


Figure 75 : Spectres RPE d'un ongle irradié : directement après irradiation (*RIS 2*, bleu), après traitement dans l'eau (*RIS 5*, orange) et après traitement oxydatif (jaune).

On constate que le traitement oxydant de l'échantillon d'ongle préalablement irradié et traité dans l'eau permet de régénérer un signal similaire radio-induit *RIS 2* et dont l'intensité spectrale est du même ordre de grandeur. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Tipikin et al., (2016) qui avaient également observé la régénération de ce signal radio-induit par traitement oxydant en milieu basique. Toutefois, les intensités spectrales ne sont pas renseignées dans leur article. Ce résultat montre qu'après la décroissance totale en intensité du *RIS 2*, il semble possible de le régénérer par traitement oxydant en milieu basique. Les radicaux à l'origine du *RIS 2* sont donc, a fortiori, des radicaux o-semiquinones anioniques générés à partir des molécules de DOPA par interaction rayonnement-matière. Ce résultat est remarquable et soulève la question suivante : **pourrions-nous utiliser cette propriété pour une application potentielle en dosimétrie RPE ?**

L'hypothèse selon laquelle le signal radio-induit *RIS 2* a pour origine des radicaux o-semiquinones anioniques radio-induits générés à partir molécules de DOPA est cohérente.

3.1.3 Une régénération possible du signal radio-induit RIS 2 à des fins dosimétriques ?

La raison pour laquelle il n'est pas possible d'utiliser le signal radio-induit *RIS 2* en dosimétrie RPE est qu'il est fortement instable et qu'une simple humidification suffit à l'éliminer. Mais nous venons de voir qu'il était, a priori, possible de régénérer ce signal après son élimination totale ou partielle à l'aide d'une solution oxydante à l'instar du signal endogène. Si ce résultat est reproductible, alors nous disposerions d'une base solide pour développer un protocole de dosimétrie RPE sur les ongles à la fois innovant, rapide et efficace. De plus, l'intensité du *RIS 2* pour les fortes doses (> 10 Gy) est nettement supérieure à celle du signal endogène et la variabilité de ce dernier poserait alors moins de problème. Il est également important de souligner qu'actuellement, l'unique protocole de dosimétrie RPE sur les ongles est basé sur le signal radio-induit stable *RIS 5* (que nous caractériserons plus tard dans ce chapitre) et que les délais d'expertises sont relativement longs (plusieurs jours voire semaines). Or, si la dose absorbée au cours de l'accident radiologique est supérieure à la dose de saturation, il nous est impossible de l'estimer. Ainsi, si nous parvenons à régénérer le signal radio-induit *RIS 2*, alors nous pourrions donner rapidement un ordre de grandeur de cette dose qui constitue une information pertinente pour la prise en charge de la victime.

Pour tenter de vérifier ce point fondamental, nous avons réalisé la même expérience d'oxydation décrite dans la partie « 3.1.2 Identification du radical à l'origine du *RIS 2* » sur des échantillons d'ongles d'un même donneur. Les doses qui ont été retenues sont 0, 2, 5 et 10 Gy afin de juger de la pertinence d'un tel protocole pour l'estimation de faibles doses entre 0 et 10 Gy car, actuellement, aucun protocole validé de dosimétrie RPE sur les ongles ne le permet. L'objectif de cette étude est de vérifier s'il est possible de corréler l'intensité du signal radio-induit après oxydation avec la dose reçue par l'échantillon.

Dans un premier temps, les échantillons d'ongles ont été irradiés à 0, 2, 5 et 10 Gy puis ont été mesurés en spectroscopie RPE bande Q à température ambiante afin d'obtenir le signal radio-induit instable, le *RIS 2*. Les échantillons ont ensuite été immergés dans de l'eau distillée pendant 1 heure afin d'éliminer le signal radio-induit *RIS 2* instable. Afin d'observer l'impact de l'oxydation des échantillons sur les signaux RPE radio-induits, ceux-ci ont ensuite

été traités dans une solution de 0,1 M de $K_3Fe(CN)_6$ en milieu basique ($pH=13$) comme suggéré dans la littérature [Tipikin et al., 2016] pendant 1 heure avant d’être séchés dans un dessiccateur sous vide pendant 16 heures. La figure 76 représente les spectres RPE obtenus après ce traitement chimique et normalisés par les masses respectives des échantillons.

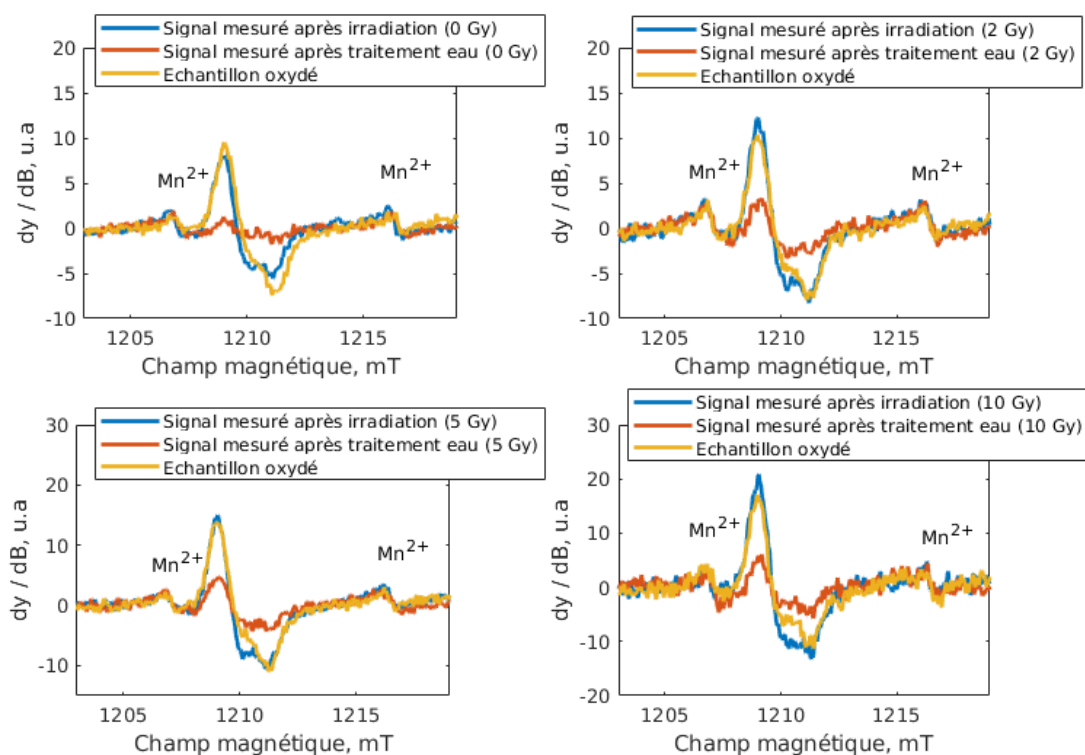


Figure 76 : Spectres RPE normalisés par les masses respectives des échantillons d’ongles irradiés à 0, 2, 5 et 10 Gy mesurés après irradiation (bleu), après traitement dans l’eau puis séchage (orange) et après traitement oxydant (jaune) à $P=0,6\text{ mW}$.

On constate qu’à l’instar de l’expérience d’oxydation menée sur le signal endogène (« 2.2 Caractérisation du signal endogène »), ce traitement chimique génère un signal de même allure que celui du radio-induit *RIS 2* et ce, pour l’ensemble des doses de rayonnements ionisants. Toutefois, on observe quelques disparités concernant les intensités spectrales. Pour le vérifier, nous avons tracé l’évolution des intensités du *RIS 2* et du signal obtenu après traitement oxydant en fonction de la dose absorbée (figure 77).

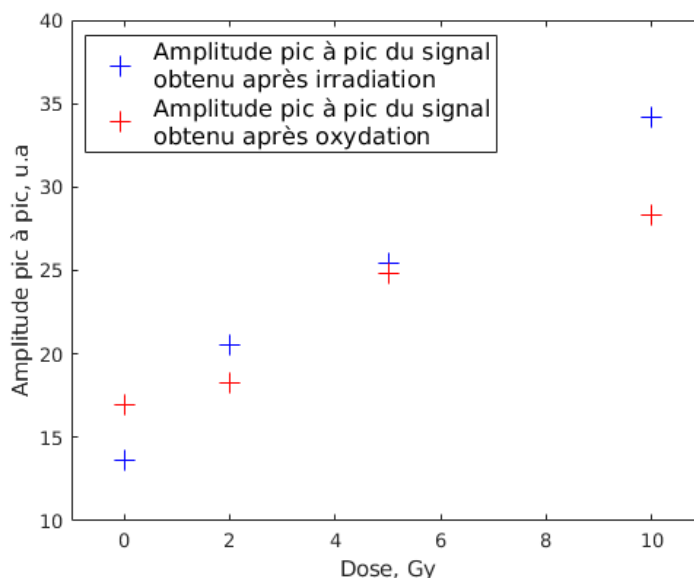


Figure 77 : Variation des intensités des signaux RPE des échantillons après irradiation (bleu) et après traitement oxydant (rouge) en fonction de la dose absorbée.

Comme le montre la figure 77, les intensités de ces spectres sont proportionnelles à la dose absorbée. En effet, l'intensité du signal radio-induit *RIS 2* varie linéairement avec la dose absorbée ce qui est conforme aux résultats de la littérature [Marciniak et al., 2016, Trompier et al., 2009, 2014, Romanyukha et al., 2014]. Toutefois, les résultats concernant l'intensité du signal RPE après oxydation sont plus disparates. Après décroissance totale du *RIS 2*, le traitement oxydant permet de générer un signal similaire à ce dernier et d'intensité du même ordre de grandeur. Les différences relatives en intensité sont comprises entre 2 et 24 %.

Au cours de ces expériences de régénération du *RIS 2*, nous avons remarqué que certains échantillons permettaient de retrouver l'intensité originale du *RIS 2*, alors que pour d'autres, cela n'était pas possible (figure 78).

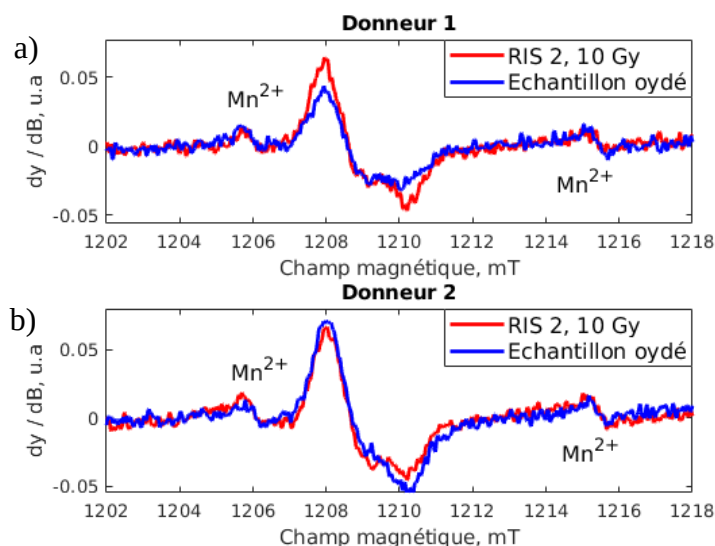


Figure 78 : Spectres RPE des ongles irradiés de deux donneurs (a, b) mesurés après irradiation (*RIS 2*, rouge) et après traitement oxydant (bleu).

Les résultats obtenus ici sont en accord avec ceux obtenus par Tipikin et al., (2016). En effet, ces derniers arrivaient à régénérer le *RIS 2* mais pas de manière systématique. À l'heure actuelle, nous n'avons pas d'explication certaine pour expliquer ces résultats. Pour sûr, il y a un paramètre d'ordre expérimental (Durée de traitement chimique ? Préparation des échantillons ?) que nous ne maîtrisons pas et qui pourrait expliquer ces différences observées.

L'ensemble de ces résultats sont à la fois intrigants et remarquables : il semblerait que nous soyons en mesure de régénérer, souvent, le signal radio-induit *RIS 2* après traitement des ongles dans une solution oxydante. Le *RIS 2* est généré à partir des molécules de DOPA présentes dans l'ongle par interaction rayonnement matière. De plus, le traitement dans l'eau des échantillons d'ongles irradiés permet d'éliminer ce signal par recombinaison des radicaux semiquinones radio-induits en DOPA. Aussi, afin d'avoir un protocole de dosimétrie fiable et robuste, il est impératif d'oxyder uniquement et de façon sélective ces molécules de DOPA spécifiques à l'irradiation [Jain et al., 1997]. Si nous y parvenons, alors l'élimination partielle ou totale du *RIS 2* ne constituera plus de problème en dosimétrie RPE et nous pourrons utiliser cette approche à des fins dosimétriques.

Dans le cas des faibles doses (entre 0 et 10 Gy), nous avons montré précédemment qu'un tel traitement chimique génère également le signal endogène. Celui-ci a la particularité d'être très variable d'un individu à l'autre ce qui est problématique pour extraire la composante radio-induite. Dans cette gamme de dose, le *RIS 2* est du même ordre de grandeur que le *BKS*. Ainsi, il est nécessaire de trouver un moyen de les séparer. L'approche qui est envisagée et qui constitue une perspective de ce travail est la discrimination des deux signaux par leur comportement vis-à-vis de la puissance du rayonnement micro-onde à l'instar des protocoles de dosimétrie basés sur l'émail dentaire [Ignatiev et al., 1996]. En effet, le *RIS 2* et le *BKS* ne présentent pas le même comportement avec la puissance du rayonnement micro-onde [Marciniak et al., 2016]. Si nous arrivons à régénérer de manière systématique et fiable le *RIS 2* après son élimination totale, il sera possible de discriminer, au moins qualitativement, un individu sain d'un individu irradié. Il est donc fondamental de poursuivre ces investigations, notamment sur la variabilité inter-individus, car les résultats obtenus au cours de cette étude sont prometteurs.

Concernant les plus fortes doses (> 10 Gy), cette approche serait très efficace. En effet, dans cette gamme de doses, l'intensité du signal endogène est nettement plus faible que le *RIS 2* et il ne constituerait donc plus de réel problème. Il est nécessaire de mener une étude de la variabilité inter-individu du *RIS 2* pour vérifier s'il est envisageable de générer une courbe de réponse en dose universelle. Dans ce cas, nous pourrions estimer très rapidement l'ordre de grandeur de la dose absorbée par la victime au cours de l'accident.

Enfin, rappelons que lorsque les échantillons d'ongles sont stressés mécaniquement (lors de leur récolte notamment), des radicaux mécaniquement induits sont générés en surface [Trompier et al., 2014]. Parmi ces signaux, le *MIS 2* possède également des caractéristiques spectrales semblables à celles du signal endogène. Une étude exhaustive a été réalisée par Trompier et al., (2014) et il semblerait que ce signal ne soit pas de la même nature que le signal endogène. Toutefois, nous avons voulu vérifier que le traitement chimique explicité précédemment ne régénérerait pas ce signal mécaniquement induit comme suggéré par Tipikin et al., (2016). En effet, ce résultat est d'importance puisqu'il pourrait expliquer la dispersion des résultats obtenus ci-dessus.

Une régénération possible du signal mécaniquement induit *MIS* 2 ?

Le signal mécaniquement induit *MIS* 2 est caractérisé par un singlet en $g=2,0044(2)$ en bande X dans la littérature [Trompier et al., 2014]. Les espèces radicalaires à l'origine du signal *MIS* 2 sont localisées au niveau du bord de la coupe de l'ongle contrairement au signal endogène *BKS* et au signal radio-induit *RIS* 2 où elles sont, a fortiori, réparties dans l'ensemble du volume [Trompier, 2012]. Il est probable que le radical à l'origine du *MIS* 2 soit un radical sulfuré de type $\text{RSO}_2^\bullet$ [Sevilla et al., 1988, 1987] cependant il est important de vérifier qu'il ne s'agit pas de radicaux semiquinones car si tel est le cas, le traitement oxydant régènerait également le *MIS* 2 ce qui constituerait source d'erreur supplémentaire. Si les radicaux susceptibles d'être générés par stress mécanique dans les ongles sont effectivement des radicaux soufrés, alors le traitement chimique d'oxydation des ongles ne devrait pas régénérer le *MIS* 2 mais seulement le signal endogène.

L'objectif de cette partie n'est pas d'identifier la structure du radical à l'origine de ce signal mais simplement de vérifier s'il est affecté par le traitement d'oxydation comme le signal endogène *BKS*. Pour ce faire, nous avons étudié un échantillon d'ongle fraîchement coupé puis laissé à l'air libre pendant 24 heures afin que les signaux mécaniquement induits *MIS* 1, 3 et 4 soient éliminés permettant une mesure spécifique du *MIS* 2 et du signal endogène [Tipikin et al., 2016, Trompier et al., 2014]. L'échantillon a ensuite été traité dans l'eau distillée pendant 1 heure puis séché sous vide pendant 16 heures afin d'éliminer le *MIS* 2 et de ne mesurer que le signal endogène. L'échantillon a ensuite été traité dans une solution de 0,1 M de $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$ en milieu basique $\text{pH}=13$ pendant 1 heure puis séché sous vide pendant 16 heures avant de mesurer le signal RPE résultant. Les radicaux mécaniquement induits sont générés à la surface de l'ongle [Trompier et al., 2014] et doivent donc entrer en contact avec la solution chimique. L'ensemble des mesures ont été effectuées en bande Q et les résultats sont présentés dans la figure 79.

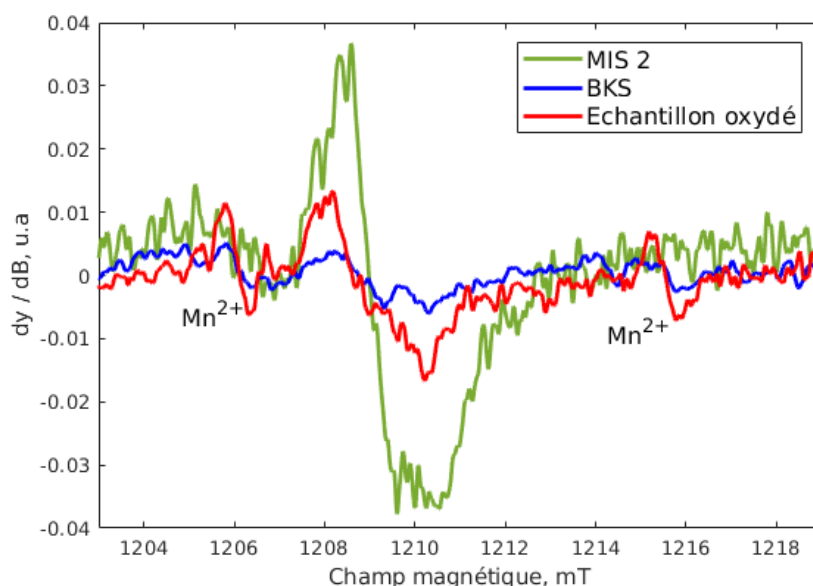


Figure 79 : Spectres RPE du signal mécaniquement induit MIS 2 (vert) d'un échantillon 24 heures après prélèvement. Après traitement dans l'eau, le signal endogène BKS a pu être mesuré (bleu). Enfin, le spectre résultant de l'oxydation de l'ongle est représenté en rouge.

On constate que l'intensité initiale du signal mécaniquement induit *MIS 2* n'est pas retrouvée après traitement dans la solution oxydante $K_3Fe[CN]_6$ en milieu basique ($pH=13$). Si les radicaux à l'origine du *MIS 2* étaient des radicaux o-semiquinones anioniques, alors l'oxydation de l'échantillon aurait permis de le régénérer (à l'instar du *BKS* et du *RIS 2*) ce qui n'est pas le cas ici. De plus, l'intensité du signal mesuré après oxydation vaut 2,8 fois celle du signal endogène ce qui est en accord avec l'étude menée dans le paragraphe « 2.2 Caractérisation du signal endogène ». Le signal mesuré après ce traitement chimique correspond, en réalité, au signal endogène oxydé.

Au bilan, il ne semble pas possible de régénérer le *MIS 2* par oxydation contrairement au signal endogène. L'entité radicalaire à l'origine du signal mécaniquement induit *MIS 2* n'est pas, a fortiori, un radical o-semiquinone anionique ce qui est cohérent avec la littérature [Trompier et al., 2014, Sevilla et al., 1988, 1987].

Ce résultat va à l'encontre de ceux obtenus par Tipikin et al., (2016) qui ont postulé que ce traitement chimique permet de régénérer entièrement ce signal mécaniquement induit.

Seulement, dans leur protocole expérimental, ces derniers retraitent les échantillons d'ongles dans l'eau distillée après les avoir oxydé. Or, puisqu'une simple humidification de l'ongle est suffisant pour éliminer le *MIS 2*, on comprend qu'ils ont, en réalité, mesuré le signal endogène. Ainsi, ils n'observent pas une repousse complète du signal mécaniquement induit *MIS 2* mais une repousse complète du signal endogène ce qui est en accord avec nos résultats « 2.2.3 Les propriétés d'oxydo-réduction du signal endogène ».

Pour conclure, nous avons montré que le traitement oxydatif des échantillons d'ongles permettait de régénérer le signal endogène et, dans certains cas, le signal radio-induit *RIS 2*. Nous avons également montré que le signal mécaniquement induit *MIS 2* ne pouvait pas être régénéré par traitement oxydant. Si des résultats prometteurs ont d'ores et déjà été obtenus concernant la régénération du signal radio-induit *RIS 2* après son élimination complète, il reste néanmoins un travail complémentaire à accomplir pour fiabiliser cette approche originale. L'objectif est de l'optimiser pour permettre une repousse totale et reproductible du *RIS 2*. Rappelons qu'à l'heure actuelle, il n'existe aucun protocole permettant l'estimation de doses entre 0 et 10 Gy en dosimétrie RPE des ongles ce qui rend ces résultats prometteurs.

Admettons qu'il soit possible de régénérer de manière fiable et systématique le signal radio-induit *RIS 2*. Dans une optique de développement de protocole de dosimétrie, il est nécessaire d'étudier la variabilité de ce signal radio-induit que ce soit pour un même individu (différences pieds / mains) mais également inter-individu. Cette analyse fait l'objet de la partie suivante.

3.2 Variabilité du signal radio-induit *RIS 2*

L'étude précédente a permis une meilleure compréhension de l'origine des signaux radio-induits générés dans les ongles. À l'instar de l'étude sur le signal endogène, il est indispensable de vérifier si la radio-sensibilité des ongles varie selon l'extrémité prélevée (mains, pieds) mais également entre les individus. Est-il envisageable de générer une courbe de réponse en dose universelle basée sur le *RIS 2* ? Si tel est le cas, nous disposerions d'un outil permettant une estimation rapide de l'ordre de grandeur des doses reçues par les victimes d'accident radiologique.

3.2.1 Les différences de radio-sensibilité des ongles pour un même individu

Dans le cas où les deux mains de la victime auraient été irradiées, il pourrait être pertinent d'utiliser les ongles des pieds afin de générer des courbes de réponse en dose. Ces courbes permettraient ensuite d'estimer les doses reçues par les mains de manière conventionnelle (à chaque intensité spectrale correspond une dose de rayonnements ionisants). Aussi, la question que nous pourrions nous poser est de savoir si, pour un même individu, la variation du signal radio-induit *RIS 2* avec la dose diffère selon les ongles des mains et des pieds.

Afin d'apporter des éléments de réponse, nous avons étudié les ongles des mains et des pieds d'un même donneur et de même masse. L'objectif était de mesurer le signal radio-induit *RIS 2* pour différentes doses, de 0 à 50 Gy afin de constater si des différences étaient observables entre les mains et les pieds comme c'était le cas lors de l'étude du signal endogène (« 2.3.1 La variabilité pour un même individu »). Les mesures ont été effectuées en spectroscopie RPE bande Q. Ainsi, la figure 80 représente l'évolution du signal radio-induit *RIS 2* en fonction de la dose pour un même individu selon l'extrémité de prélèvement.

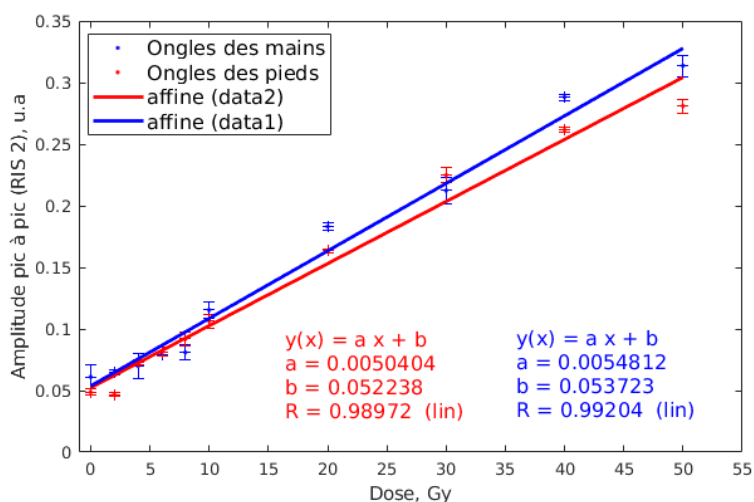


Figure 80 : Evolution du signal radio-induit *RIS 2* en fonction de la dose absorbée par un échantillon d'ongle de main (bleu) et d'ongle de pied (rouge) d'un même individu. Les acquisitions spectrales ont été effectuées en bande Q.

L'intensité du *RIS 2* varie linéairement avec la dose absorbée entre 0 et 50 Gy ce qui est en accord avec la littérature [Marciniak et al., 2016, Trompier et al., 2014, Romanyukha et al., 2010, Black et al., 2010, Wilcox et al., 2010]. De plus, on ne constate pas de différences majeures entre les ongles des mains et des pieds provenant d'un même individu. Ce résultat est important. En effet, le comportement du signal radio-induit *RIS 2* semble être identique pour un même individu et ce, quelque soit l'extrémité prélevée. À ce titre, on constate une hausse de l'amplitude du *RIS 2* de $5,04 \cdot 10^{-3} \text{ u.a.Gy}^{-1}$ pour les pieds contre $5,48 \cdot 10^{-3} \text{ u.a.Gy}^{-1}$ pour les mains soit une légère différence en sensibilité de 8,7 %. Cette observation pourrait éventuellement s'expliquer par une pré-dose UV plus importante dans les ongles de mains que dans les pieds conduisant à une quantité plus faible de radicaux semiquinones radio-induits. En ce sens, plus l'échantillon aura été exposé aux rayonnements UV, plus la quantité restante de molécules DOPA sera faible. Puisque les radicaux radio-induits proviennent de la dégradation de ces molécules par interaction rayonnement-matière, on comprend que l'exposition préalable aux UV a un réel impact concernant le rendement chimique de création des radicaux semiquinone.

Au bilan, l'intensité du signal radio-induit *RIS 2* varie linéairement avec la dose entre 0 et 50 Gy et la radio-sensibilité des ongles de mains et de pieds est similaire pour un même individu. Dans le cas d'une irradiation accidentelle et hétérogène, il semble possible, par exemple, d'utiliser les ongles de pieds (si ceux-ci n'étaient pas irradiés), pour générer une courbe de réponse en dose individu-spécifique permettant l'estimation des doses reçues au niveau des mains. Maintenant, il est crucial de savoir si le comportement du *RIS 2* est identique d'un individu à l'autre ? Si tel est le cas, il serait alors possible de générer une courbe de réponse en dose universelle et de pouvoir fournir des estimations rapides de doses.

3.2.2 Les différences de radio-sensibilité des ongles inter-individus

Nous avons vu dans le chapitre « 2.1 Variabilité spectrale du signal endogène BKS » que l'intensité du signal endogène variait en moyenne à hauteur de 40 % entre les différents donneurs. On doit donc se poser la question de la radio-sensibilité des ongles d'un individu à l'autre. Pour ce faire, nous avons récupéré les ongles de 6 donneurs différents. Les

échantillons ont ensuite été irradiés aux mêmes doses que précédemment, à savoir entre 0 et 50 Gy avant d'être mesurés en spectroscopie RPE bande Q. La figure 81 représente l'évolution du signal radio-induit *RIS 2* avec la dose absorbée pour les 6 individus concernés. Les spectres RPE ont été normalisés par les masses respectives des échantillons à des fins de comparaison. Enfin, le tableau 10 présente les régressions linéaires associées aux données expérimentales.

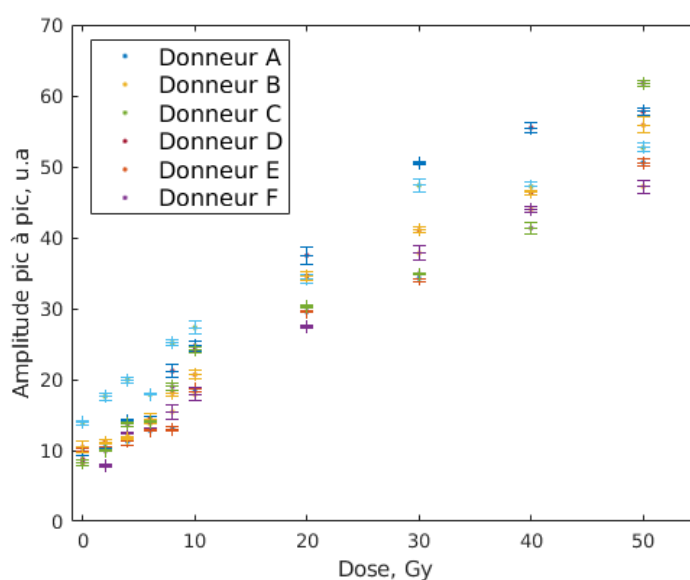


Figure 81 : Variation de l'intensité du signal radio-induit *RIS 2* en fonction de la dose absorbée par l'échantillon.
Au total, 6 donneurs différents ont été étudiés et les spectres sont normalisés par les masses des échantillons.

Tableau 10 Résultats concernant les régressions linéaires de l'évolution du *RIS 2* avec la dose.

Donneur	$y = ax + b$	
	a	b
A	$8,84 \cdot 10^{-1} u.a$	$8,66 u.a$
B	$8,45 \cdot 10^{-1} u.a$	$8,78 u.a$
C	$7,94 \cdot 10^{-1} u.a$	$16,83 u.a$
D	$10,80 \cdot 10^{-1} u.a$	$11,13 u.a$
E	$9,45 \cdot 10^{-1} u.a$	$10,37 u.a$
F	$9,41 \cdot 10^{-1} u.a$	$9,73 u.a$

On constate que l'intensité du signal radio-induit *RIS 2* varie linéairement avec la dose absorbée pour les 6 individus étudiés dans la gamme de dose considérée. Cependant, force est de constater que la hausse de l'intensité du *RIS 2* est variable d'un individu à l'autre avec une dispersion du coefficient directeur des régressions linéaires de 10,85 % inter-individu. De plus, on constate que, pour une même dose de rayonnements ionisants absorbée, les différences en intensité spectrale peuvent atteindre près de 47 %. On comprend dès lors qu'il ne sera pas possible de générer une courbe de réponse en dose universelle basée sur le signal radio-induit *RIS 2*. Ce résultat va à l'encontre de ceux obtenus par Romanyukha et al., (2014). Toutefois, nous n'avons pas plus d'informations concernant l'origine ni le nombre de donneurs de la cohorte étudiée [Romanyukha et al., 2014]. Ils recommandent cependant de préparer les échantillons d'ongles de telle sorte qu'ils aient la même géométrie, la même masse et la même teneur en eau intrinsèque. Nous avons suivi ces recommandations hormis la teneur en eau qui n'a pas pu être contrôlée. Cependant, les échantillons d'ongles ont séché pendant plusieurs semaines à l'air libre afin d'obtenir, d'une part, un intense signal endogène stable, et d'autre part, une teneur en eau la plus faible possible.

Toutefois, **pourquoi observe-t-on de telles différences en radio-sensibilité inter-individu ?** A fortiori, les mécanismes physico-chimiques à l'origine de la génération des radicaux radio-induits dans les échantillons d'ongles sont identiques pour tout individu. Cependant, la composition biochimique des ongles varie d'un donneur à l'autre [Greaves et al., 1976]. En effet, il est très probable qu'un individu possédant un faible taux de tyrosine, et a posteriori, un faible taux de molécules DOPA, générera moins de radicaux semiquinones radio-induits. De plus, il existe une différence du taux d'acides aminés présents dans les ongles en fonction de l'âge et du sexe du donneur [Dittmar et al., 2008]. La composition de la kératine évolue avec le temps ce qui a pour conséquence une variabilité dans la quantité des acides aminés présents dans les ongles. Malheureusement, l'âge de l'ensemble des donneurs est une donnée manquante dans cette étude. Il serait très intéressant par la suite de mener une étude complémentaire de variabilité du signal *RIS 2* en fonction de l'âge et du sexe des donneurs voire de leur régime alimentaire pour potentiellement identifier des groupes ayant des radio-sensibilités similaires.

Nous avons également montré que l'exposition aux rayonnements UV engendrait également un signal UV-induit similaire aux *RIS 2* et 5. Ainsi, les différences dans la génération du *RIS 2* pourraient probablement être liées aux différences d'exposition aux UV des 6 donneurs de l'expérience. Plus la quantité de radicaux UV-induits sera importante, plus la concentration en molécules DOPA restante sera faible. Ainsi, le rendement chimique des radicaux radio-induits par dégradation des molécules de DOPA sera également plus faible.

Concernant le paramètre b de la régression linéaire, il s'agit en fait de l'intensité initiale du signal endogène. On constate une dispersion relative de celui-ci à hauteur de 27,90 %. Or, nous avons montré dans la partie « 2.3 Variabilité en intensité du signal endogène » une variabilité relative de l'intensité de ce signal de 37,45 % ce qui est en accord avec les résultats obtenus ici.

La radio-sensibilité des ongles diffère d'un individu à l'autre. Les hypothèses les plus probantes pour expliquer ces différences sont d'une part, une différence biochimique (taux d'acides aminés inter-individu) et d'autre part, une différence en intensité du signal UV-induit qui réduit la quantité de molécules DOPA restante.

Nous venons de caractériser le signal radio-induit *RIS 2* au cours de cette partie. Ce signal radio-induit est instable et une simple humidification des ongles suffit à l'éliminer rendant tout acte de dosimétrie en conditions réelles d'accident impossible. Toutefois, nous avons montré qu'il était possible de régénérer ce signal après décroissance totale par un traitement oxydant en milieu basique. Ce résultat prometteur demande un approfondissement afin de maîtriser ce processus. Aussi, certaines perspectives sont à envisager. Dans le cas où nous serions en mesure de régénérer systématiquement et de façon reproductible le *RIS 2*, alors nous disposerons d'une méthode innovante et efficace pour doser les doses absorbées par les ongles et notamment celles supérieures à 10 Gy car la variabilité du signal endogène ne poserait plus de problème du fait de l'intensité du *RIS 2* nettement supérieure.

Nous avons identifié des pistes prometteuses pour doser les rayonnements ionisants dans les ongles en utilisant le signal radio-induit *RIS 2*. Intéressons-nous maintenant au signal radio-induit *RIS 5* qui, comme rappelé en introduction, est le seul signal radio-induit exploité en dosimétrie RPE des ongles, dans le cas d'accidents réels et sans quelconque traitement chimique sous-jacent.

3.3 Le signal radio-induit *RIS 5*

Dans leur récente étude, Trompier et al., (2014) ont montré l'existence d'un signal radio-induit stable dans le temps et résistant à l'eau, le *RIS 5*. Ces deux caractéristiques sont essentielles pour une utilisation en dosimétrie RPE d'accident radiologique comme ce fut le cas en 2014 [Trompier et al., 2014]. Cependant ce protocole est limité aux doses supérieures à 10 Gy, du fait de la variabilité observée sur la dose dite de saturation. De plus, ce protocole basé sur des ajouts dosés de l'ordre de 1 à 2 Gy jusqu'à atteindre la saturation est d'autant plus long à mettre en œuvre que les doses à estimer sont faibles et que la dose de saturation est élevée. La dose de saturation pouvant atteindre 55 Gy, une dose à estimer de l'ordre de 25 Gy, nécessitera entre 15 et 30 cycles de post-irradiation, nécessitant chacun 24 heures, soit une durée comprise entre 2 semaines et 1 mois de travail pour estimer la dose. Compte tenu de l'impératif de fournir les estimations de doses au plus vite, on comprend l'intérêt de chercher à optimiser ce protocole pour le rendre plus performant. Le préalable est d'étudier dans le détail l'origine du *RIS 5*, sa variabilité et les paramètres ayant une influence sur sa formation et son intensité. De plus, il est important de mentionner que certains auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence ce signal et contestent ainsi son existence [Sholom et al., 2017]. Il était donc important de consolider les résultats déjà acquis et de comprendre l'origine de ces différences. D'autres auteurs, ont réussi à observer le *RIS 5* mais n'ont pu mettre en évidence la réponse en dose de celui-ci [Marciniak et al., 2016]. Toutefois, les conditions d'expériences sont très différentes de celles préconisées dans Trompier et al., (2007). En effet, il faut noter que dans les études de l'IRSN, les mesures ont été réalisées en bande Q, fréquence très peu utilisée en dosimétrie RPE alors que dans la littérature, les mesures sont exclusivement réalisées en bande X.

Dans un premier temps, afin de vérifier l'existence du signal radio-induit stable *RIS 5*, nous avons mesuré le signal endogène *BKS* d'un échantillon préalablement immergé dans l'eau puis ayant séché dans un dessiccateur sous vide pendant 16 heures. Cet échantillon a ensuite été irradié à forte dose, 55 Gy, puis a été soumis à des bains successifs dans de l'eau distillée avant de sécher sous vide pendant 16 heures. Au total, 6 traitements dans l'eau ont été effectués afin de vérifier la stabilité de ce signal. Les résultats sont présentés dans la figure 82.

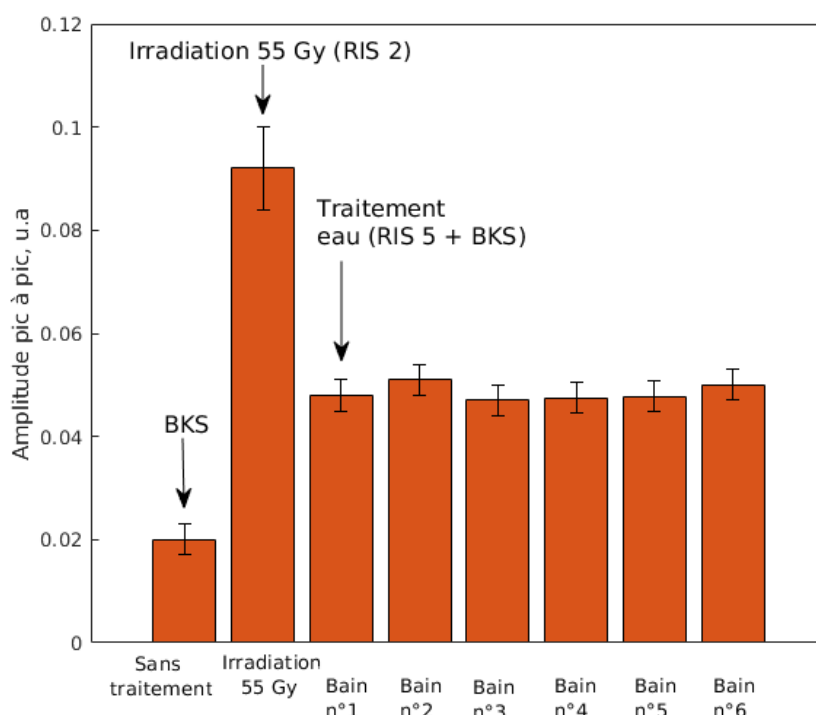


Figure 82 : Impact de bains répétés dans l'eau distillée sur le signal radio-induit *RIS 5*. L'échantillon a été irradié à 55 Gy et les mesures ont été effectuées en bande Q à température ambiante.

La figure 82 permet de mettre en évidence que le signal mesuré après irradiation et traitement dans l'eau est bien supérieur au signal endogène et qu'il est stable et ce, même après 6 bains successifs. Pour confirmer la nature radio-induite de ce signal stable, nous avons récupéré des échantillons d'ongles de mains d'un même individu et avons effectué un ensemble d'ajouts dosés de 0 à 40 Gy par pas de 5 Gy. Avant d'être mesurés en spectroscopie RPE bande Q, les échantillons ont été systématiquement traités dans l'eau distillée 1 heure puis ont séché sous vide pendant 16 heures. L'évolution de l'amplitude pic à pic de ce signal RPE est représentée sur la figure 83.

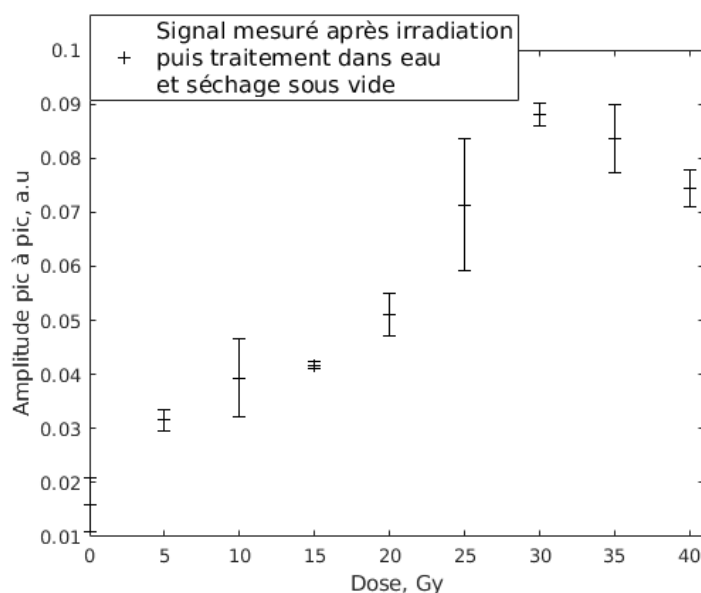


Figure 83 : Evolution de l'intensité du *RIS 5* en fonction de la dose absorbée par un échantillon d'ongle de main.

On constate que l'intensité du signal mesuré après irradiation et traitement dans l'eau augmente avec la dose absorbée et présente un phénomène de saturation ce qui est en accord avec la littérature [Marciniak et al., 2016]. Ainsi, nous ne pouvons pas nier l'existence de ce signal radio-induit stable et c'est la raison pour laquelle il a été possible de l'utiliser à des fins dosimétriques dans le cas d'accidents radiologiques [Trompier et al., 2014].

Nous confirmons que les rayonnements ionisants génèrent un signal radio-induit très stable dans les ongles.

Origine radicalaire du *RIS 5* :

Revenons maintenant à la caractérisation du signal radio-induit *RIS 5*. La nature des radicaux à l'origine de ce signal demeure inconnue. Étant donné que ce signal possède les mêmes caractéristiques spectrales que le *RIS 2* et le *BKS*, il est hautement probable qu'il s'agisse également de radicaux o-semiquinones anioniques. Afin de tester cette hypothèse, il semble pertinent de travailler sur un signal radio-induit *RIS 5* très intense. En effet, l'objectif est de travailler sur un spectre RPE dont l'intensité du *RIS 5* est nettement plus importante que celle du *BKS* afin d'extraire la seule composante radio-induite. Pour ce faire, nous avons généré la courbe de réponse en dose du *RIS 5* d'un échantillon d'ongle de main par la

méthode des ajouts dosés développée [Trompier, 2012] afin de déterminer la dose de saturation et d'extraire le signal radio-induit stable le plus intense (figure 84).

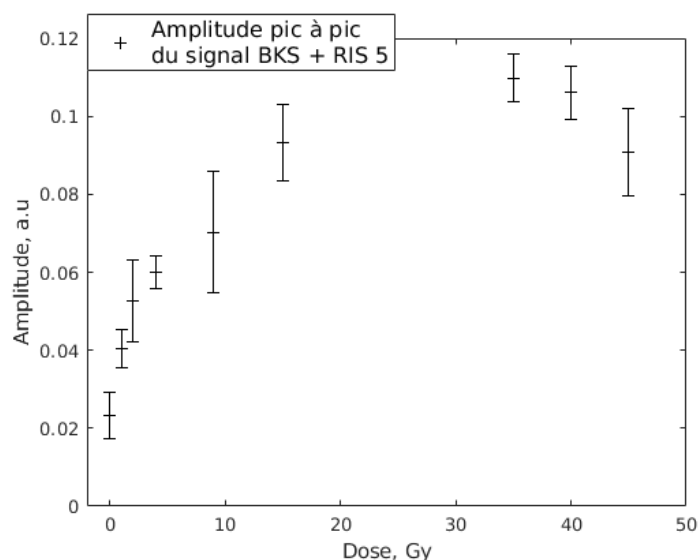


Figure 84 : Courbe de saturation du *RIS 5* obtenue sur un prélèvement d'ongle de main.

Afin d'extraire la composante radio-induite *RIS 5*, le spectre représentant le signal endogène (0 Gy) a été soustrait au spectre acquis après une dose cumulée de 35 Gy (figure 85). Ainsi, il a été possible de procéder à la simulation du signal radio-induit *RIS 5* avec un rapport signal sur bruit suffisant pour s'affranchir de toute ambiguïté (figure 86 et tableau 11).

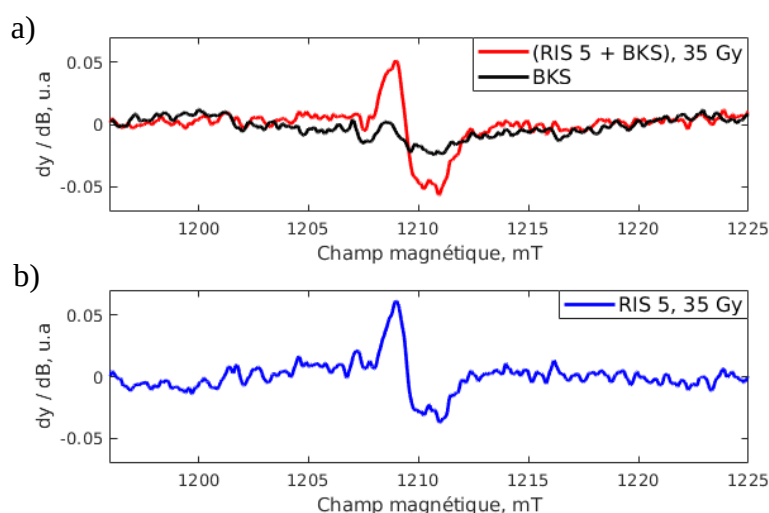


Figure 85 : a) Spectres RPE en bande Q d'un prélèvement d'ongle sain appartenant à la victime gabonaise lors de l'accident radiologique survenu en 2010 (en noir) et irradié à 35 Gy (en rouge). b) Extraction de la composante radio-induite stable *RIS 5* après soustraction du signal endogène *BKS*.

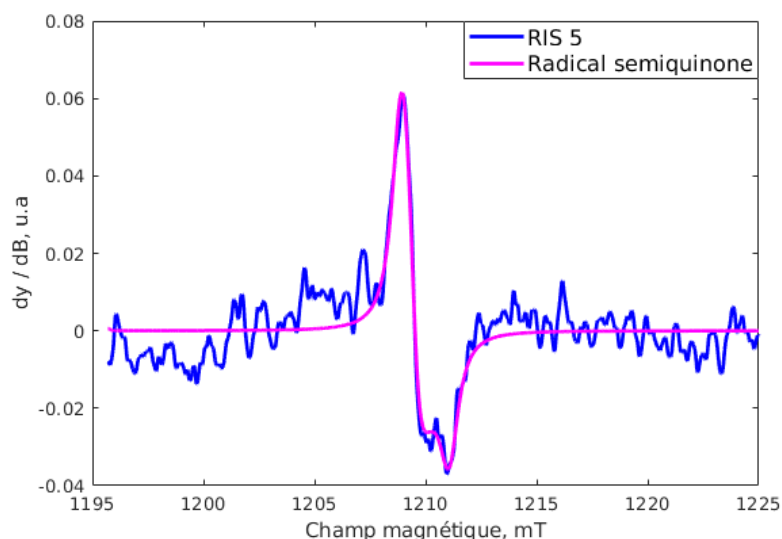


Figure 86 : Spectres RPE d'un ongle irradié à 35 Gy après avoir soustrait le spectre représentant le signal endogène *BKS*. Le spectre bleu représente le signal radio-induit *RIS 5*, et le spectre violet représente la simulation spectrale du radical semiquinone.

Tableau 11 : Synthèse des résultats sur l'estimation des facteurs *g* du signal radio-induit instable *RIS 5*.

	Valeurs originales <i>BKS</i>	Intervalle des paramètres spectraux testés	Valeurs <i>RIS 5</i>
Facteur <i>g</i> (sans unité)	2,0060(2)	[2,0058 ; 20062]	2,0059
	2,0054(2)	[2,0052 ; 20056]	2,0052
	2,0024(2)	[2,0022 ; 20026]	2,0023

D'une part, on constate que les facteurs *g* mesurés ne diffèrent qu'à hauteur de 0,0002 au maximum par rapport à ceux du radical semiquinone [Jeschke et al., 2005]. D'autre part, l'écart moyen relatif entre le modèle théorique (spectre simulé de semiquinone) et le spectre expérimental (*RIS 2*) est estimé à moins de 5 %. Par conséquent, ces résultats confortent l'hypothèse que le signal radio-induit stable *RIS 5* a pour origine un radical semiquinone.

À l'instar du signal endogène, nous confirmons que le radical o-semiquinone anionique est également à l'origine des signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5*.

Influence de la puissance du rayonnement micro-onde :

Il a été montré que l'intensité du signal endogène *BKS* et celle du signal radio-induit *RIS 5* variaient différemment vis-à-vis de la puissance micro-onde [Marciniak et al., 2016, Choi et al., 2014, Trompier et al., 2014]. Ce résultat est très intéressant et Choi et al., (2014) ont tenté d'utiliser cette particularité à des fins dosimétriques. Leur protocole est rappelé en annexe (« 1.5.3 Saturation du signal radio-induit *RIS 5* avec la puissance micro-onde »). En résumé, la première étape consiste à déshydrater les échantillons d'ongles en les chauffant 72 heures à 70 °C. La seconde consiste à réaliser un ensemble d'acquisitions spectrales à différentes puissances de rayonnement micro-onde. À partir des courbes de saturation en puissance micro-onde, il est possible d'extraire un coefficient mathématique, le « coefficient de courbure »⁷ et il semblerait qu'entre 0 et 3 Gy, il varie linéairement avec la dose absorbée. D'après leurs résultats, les incertitudes relatives associées aux coefficients de courbure sont de 33,48 % pour une dose de 0 Gy, 18,10 % pour 1 Gy, 14,61 % pour 2 Gy et enfin 13,38 % pour 3 Gy. L'inconvénient de ce protocole est que les échantillons sont chauffés pendant 72 heures à 70 °C avant d'être mesurés en spectroscopie RPE ce qui génère un intense signal endogène. En effet, nous avons montré dans la partie « 2.2.6 L'effet de la température sur le signal endogène » que les traitements thermiques à une température supérieure à 40 °C engendrent une hausse considérable de l'intensité du signal endogène. De plus, nous avons expliqué précédemment que l'intensité du signal radio-induit stable *RIS 5* est très faible par rapport à celle du *BKS* et qu'une solution efficace pour observer la hausse en intensité du *RIS 5* était de minimiser l'intensité du *BKS*. Pour ce faire, les échantillons d'ongles sont immergés dans de l'eau distillée pendant 1 heure puis séchés sous vide pendant 16 heures. Dans ces conditions d'expérience, les intensités de ces deux signaux sont du même ordre de grandeur et il est alors possible de discerner toute hausse, même légère, du signal radio-induit stable. Ainsi, on comprend que chauffer les échantillons d'ongles pour obtenir une intensité maximale du signal endogène ne permet pas de discerner les hausses en intensité du signal radio-induit *RIS 5*. Il serait donc plus judicieux de travailler sur des échantillons d'ongles

⁷ Choi et al., (2014) modélisent l'évolution de l'intensité des signaux RPE (notée y) en fonction du logarithme de la puissance micro-onde (notée x) telle que $y = e^{a+b \cdot x + c \cdot x^2}$. Ainsi le

coefficient de courbe K au point d'inflexion est donné par $K = |2c e(a - \frac{b^2}{4c})|$.

préalablement traités dans l'eau pour, d'une part, éliminer les signaux instables et d'autre part, minimiser l'intensité du signal endogène. En effet, si Choi et al., (2014) obtiennent des résultats intéressants malgré un intense signal endogène, il est probable que notre protocole expérimental, qui est plus rapide à mettre en place, permette également d'obtenir des résultats prometteurs.

Afin de vérifier ce dernier point, nous avons récupéré un ensemble d'échantillons provenant d'un même donneur et les avons séparés en plusieurs aliquotes de masse similaire (environ 15 mg). Chacun des aliquotes a été irradié à 0, 1, 2 et 3 Gy à l'instar de l'étude menée par Choi et al., (2014), puis traité dans de l'eau distillée avant de sécher sous vide pendant 16 heures. Pour des raisons pratiques, les mesures ont été effectuées en bande X et les résultats sont présentés dans la figure 87 a et b. Les spectres RPE ont été normalisés par les masses respectives de chaque échantillon.

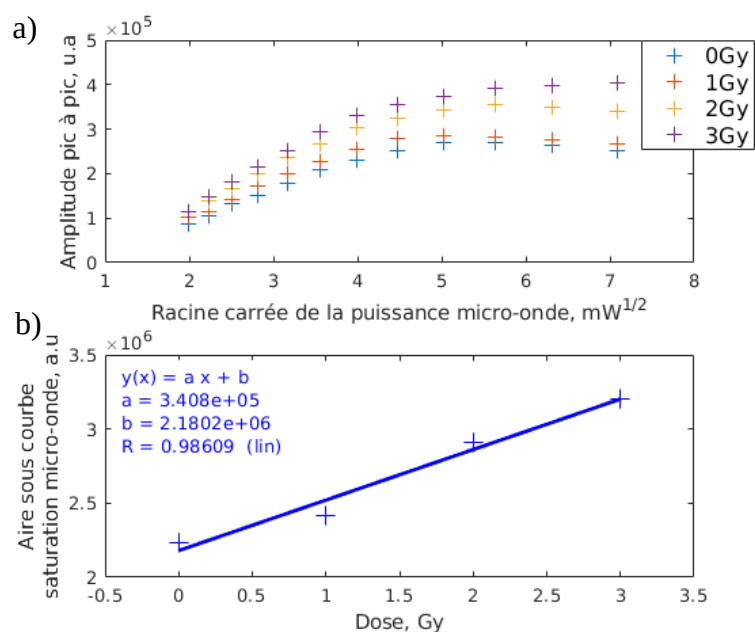


Figure 87 : a) Variation des amplitudes du RIS 5 pour différentes doses en fonction de la racine carrée de la puissance du rayonnement micro-onde comparée à celle du BKS. b) Variation de l'aire sous les courbes (a) en fonction de la dose.

On constate que les courbes de saturation en puissance micro-onde sont différentes selon la dose de rayonnements ionisants absorbée par l'échantillon ce qui est en accord avec

les observations de Choi et al., (2014) et de Trompier et al., (2014) (figure 87 a). A fortiori, le *BKS* et le *RIS 5* possèdent la même origine radicalaire, à savoir des radicaux o-semiquinones anioniques. Cependant, ces derniers sont créés lors de l'irradiation et peuvent, a priori, être générés dans l'ensemble du volume de l'ongle. Ainsi, il est probable que l'environnement chimique de ces radicaux radio-induits soit différent de celui des radicaux endogènes ce qui expliquerait ces différences de comportement avec la puissance du rayonnement micro-onde. On déduit de ces graphes que plus l'échantillon aura été irradié, plus les temps de relaxation associés aux centres paramagnétiques seront faibles. Il est également important de souligner que les aires sous les courbes de saturation en puissance micro-onde varient linéairement avec la dose absorbée comme le montre la figure 87 b. Si les résultats obtenus à l'aide de cette méthode sur un grand nombre d'échantillons confirment cette tendance, alors nous aurons un moyen rapide d'estimer, au moins qualitativement, si un individu a été irradié ou non. Il suffira de comparer l'évolution de l'intensité du signal RPE d'un ongle non irradié (de pied par exemple) avec celle des échantillons d'ongles provenant des mains potentiellement irradiées pour différentes puissances du rayonnement micro-onde.

Au bilan, il semblerait qu'il soit possible de discriminer le signal endogène *BKS* du signal radio-induit *RIS 5* à l'aide des courbes de saturation en puissance micro-onde. Ce résultat pourrait constituer l'essence même d'un protocole de dosimétrie des faibles doses. Toutefois, il est nécessaire de réitérer l'expérience sur un plus grand nombre d'échantillons afin de caractériser d'éventuelles variabilités inter-individus.

3.4 Discussion sur le protocole de dosimétrie RPE des ongles développé par l'IRSN en 2014

En 2014, l'IRSN a développé un protocole de dosimétrie RPE original basé sur la dose de saturation du signal radio-induit *RIS 5* (voir annexe « 1.5.1 Saturation du signal radio-induit *RIS 5* avec la dose ») [Trompier et al., 2014]. Pour rappel, ce protocole est basé sur une succession d'ajouts dosés sur les ongles de la victimes (non irradiés et irradiés) afin de générer les courbes de réponse en dose de chaque échantillon. L'objectif est de déterminer la dose à partir de laquelle l'intensité du *RIS 5* sature. La différence entre la dose de saturation

de l'échantillon sain et celle de l'échantillon pré-irradié est égale à la dose reçue lors de l'accident (illustration dans la figure 88). Ce protocole est d'autant plus long à mettre en œuvre que les doses à estimer sont faibles et donc que la dose de saturation est élevée. Ainsi, il n'est pas rare d'estimer une dose en plusieurs semaines et compte tenu de la nécessité de fournir les estimations de dose au plus vite, on comprend l'intérêt de chercher à optimiser ce protocole pour le rendre plus performant.

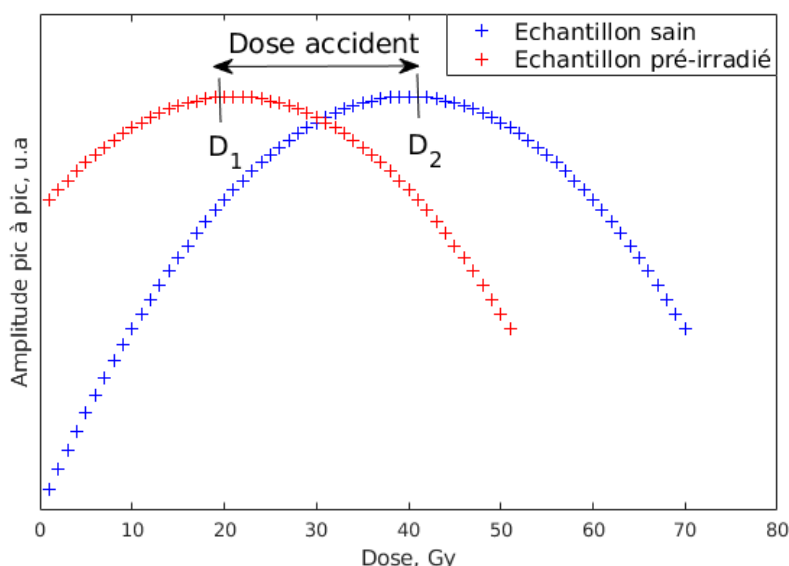


Figure 88 : Illustration de courbes de saturation en dose pour un échantillon d'ongle sain et un échantillon pré-irradié. La différence de dose de saturation ($D_2 - D_1$) entre ces deux échantillons permet d'estimer la dose reçue lors de l'accident radiologique.

Il a été remarqué que les doses de saturation peuvent être différentes d'un individu à l'autre [Marciniak et al., 2016] ce qui rend inenvisageable l'utilisation d'une courbe de saturation du *RIS 5* universelle. Dès lors, **comment expliquer ces différences ?**

D'une part, nous avons montré dans la partie « 2.2.7 L'impact du rayonnement UV sur le signal endogène BKS » qu'il existait un signal UV-induit *UVIS 5* analogue au signal radio-induit *RIS 5*. D'après les résultats obtenus sur ce signal, plus un individu aura été exposé longtemps aux rayonnements UV, plus la concentration en radicaux o-semiquinones anioniques UV-induits sera importante dans ses ongles. Ainsi, l'intense signal *UVIS 5* peut

être assimilé à une pré-dose au même titre qu'une dose de rayonnements ionisants accidentelle comme le montre la figure 89. Nous l'appellerons « pré-dose UV ».

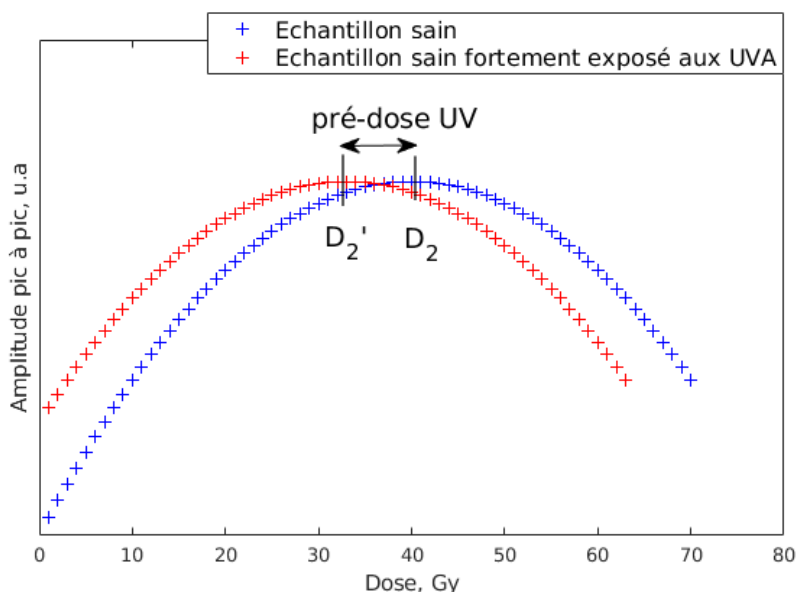


Figure 89 : Illustration des courbes de saturation en dose pour un même échantillon d'ongle sain, l'un non exposé à la lumière du jour (bleu) et l'autre fortement exposé aux rayonnements UVA. L'intensité du signal *UVIS 5* agit comme une pré-dose gamma à l'instar d'un échantillon pré-irradié.

Cette pré-dose UV peut être en partie responsable de la variabilité constatée dans les doses de saturation du *RIS 5*. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de réaliser cette investigation au cours de ce travail de thèse. Toujours est-il, il est indispensable de mener cette étude complémentaire car les résultats sont primordiaux.

D'une part, il est très probable que la concentration en impuretés métalliques (Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) diffère entre les différents individus. Plus leur concentration sera importante, plus la quantité de radicaux o-semiquinones anioniques radio-induits stabilisable par interaction coulombienne le sera a priori également. Toutefois, le nombre de sites stabilisables par interaction coulombienne dans les ongles étant, a fortiori, limité, plus la quantité de radicaux UV-induit stables sera importante, moins il sera possible de générer du *RIS 5*. La figure 90 permet d'illustrer ces propos en image.

△ molécule DOPA

○ radical o-semiquinone anionique

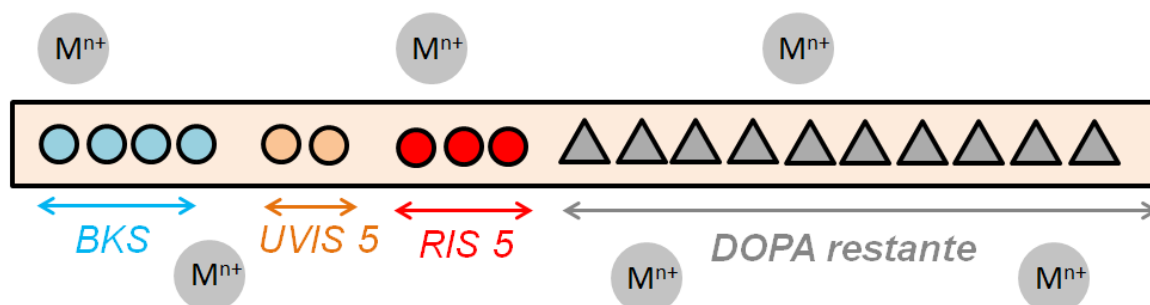


Figure 90 : Schéma explicatif de la stabilité des radicaux endogènes (bleus), UV-induits (oranges) et radio-induits (rouges). Ces radicaux stabilisés par interaction coulombienne avec les impuretés métalliques (M^{n+}) seront observables après traitement dans l'eau. La quantité d'impuretés métalliques présente dans les ongles est a fortiori limitée ce qui explique le phénomène de saturation observé concernant l'*UVIS 5* et le *RIS 5*.

Ce dernier point expliquerait ainsi la différence observée dans les hausses en intensités du *RIS 5* entre les différents donneurs, comme nous l'avons mentionné précédemment, la quantité de radicaux UV-induits peut être différentes car l'exposition à la lumière du jour peut varier d'un individu à l'autre.

Au bilan, il est très probable qu'une exposition des échantillons d'ongles aux rayonnements UV impacte le comportement du signal radio-induit *RIS 5* avec la dose absorbée. Autrement dit, une pré-dose UV devrait engendrer une dose de saturation gamma plus faible. Nous n'avons pas eu le temps de mener entièrement cette investigation au cours de ce travail de thèse mais cette étude le sera prochainement car ces résultats sont capitaux.

3.5 Conclusion sur les signaux radio-induits

Nous avons montré au cours de ce travail que les signaux radio-induits stables (*RIS 5*) et instables (*RIS 2*) ont pour origine des radicaux de type o-semiquinone anionique. À ce titre, les simulations spectrales permettent de reproduire fidèlement les spectres expérimentaux des ongles irradiés que ce soit directement après irradiation (*RIS 2*) ou après irradiation suivie d'un traitement dans l'eau (*RIS 5*). Ces radicaux o-semiquinones anioniques sont générés par dégradation des molécules DOPA par interaction rayonnement-matière (rayons X, γ).

Nous avons également proposé deux approches pour discriminer un individu sain d'un individu irradié. La première se base sur le comportement du signal radio-induit stable avec la puissance du rayonnement micro-onde. En effet, plus l'échantillon est irradié, plus les temps de relaxation des radicaux radio-induits sont courts. Nous avons donc montré qu'il était envisageable d'utiliser cette propriété pour, au moins, effectuer une dosimétrie RPE qualitative (faire le tri entre un individu irradié ou non). Afin de valider ce protocole de dosimétrie RPE, il sera nécessaire d'étudier la variabilité inter-individu des courbes de saturation en puissance micro-onde car les résultats présentés ici sont très prometteurs.

La seconde approche, plutôt originale, consiste à régénérer l'information dosimétrique initiale (signal radio-induit *RIS 2*) à l'aide d'un traitement chimique oxydant. Cependant, les résultats obtenus sont disparates et nous ne sommes pas actuellement en mesure de régénérer systématiquement ce signal radio-induit. Il est fondamental de poursuivre les investigations car, dans le cas où nous parviendrons à régénérer de manière fiable et systématique le *RIS 2*, il sera alors possible d'élaborer un protocole de dosimétrie simple, rapide et robuste pour l'estimation des doses entre 0 et 10 Gy notamment.

Dans le cas où un tel protocole serait développé, il pourrait être intéressant d'utiliser une courbe de réponse en dose universelle. Ainsi, il suffirait de régénérer le *RIS 2* pour estimer la dose absorbée par l'échantillon. Pour vérifier la faisabilité de cette approche, nous avons mené une étude de variabilité concernant la radio-sensibilité d'un même individu selon l'extrémité de prélèvement (mains, pieds) mais également inter-individus.

D'une part, nous avons montré que cette radio-sensibilité pour un même individu est similaire pour les ongles de mains et de pieds avec une légère différence de 8 %. Cette différence peut s'expliquer par une pré-dose UV plus importante dans les ongles de mains que dans les pieds comme nous l'avons discuté. Ainsi, plus l'échantillon aura été exposé aux rayonnements UV, plus la concentration en radicaux o-semiquinones anioniques sera importante et par conséquent, plus le rendement de création de radicaux radio-induits sera faible (car la quantité de molécules DOPA est limitée). Il est toutefois envisageable de générer une courbe de réponse en dose individu-spécifique en utilisant les ongles de pieds par exemple car l'intensité du signal *RIS 2* est nettement supérieure à celle du *BKS*.

D'autre part, nous avons également constaté une variabilité de radio-sensibilité des ongles inter-individus à hauteur de 11 %. Aussi, pour une même dose, la différence en intensité spectrale peut atteindre 47 %. On comprend dès lors qu'il ne sera pas possible de générer une courbe de réponse en dose universelle du *RIS 2*.

4 Synthèse des résultats et perspectives pour la dosimétrie RPE des ongles

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre soutiennent l'hypothèse que le signal endogène et les signaux radio-induits ont pour origine des radicaux o-semiquinones anioniques. Le processus de formation du signal endogène reste encore inconnu, toutefois il est fort probable que ces radicaux sont générés lors de la genèse de l'ongle. Nous avons également mis en évidence deux signaux UV-induits : l'*UVIS 2* et l'*UVIS 5*. Ce dernier n'avait jamais été identifié auparavant et, à l'instar du signal radio-induit stable *RIS 5*, il sature avec la dose de rayonnement UV. Les radicaux UV et radio-induits sont générés à partir des molécules de DOPA présentes dans les ongles.

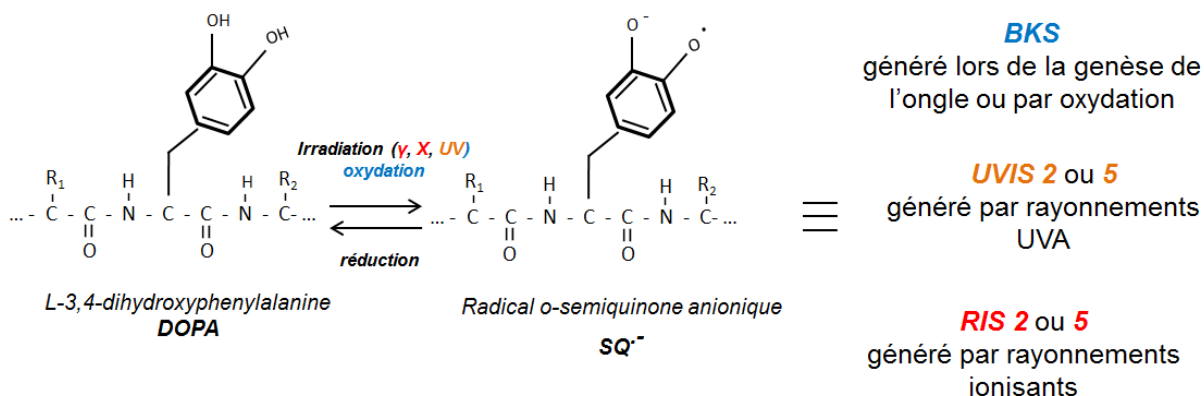


Figure 91 : Mécanisme de formation des radicaux o-semiquinones anioniques à partir des molécules de DOPA.

Les molécules de DOPA proviennent de l'oxydation partielle de la tyrosine, acide aminé naturellement présent dans la kératine des ongles. Les ongles contiennent également un certain nombre d'ions chargés positivement tels que Al^{3+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} . Ces derniers permettent de stabiliser une partie des radicaux o-semiquinones anioniques par interaction coulombienne. La détermination des concentrations et de la nature de ces impuretés métalliques est fondamentale et constitue dès lors une perspective à considérer pour soutenir ce travail. La proximité d'impuretés cationiques permet d'expliquer l'existence de deux populations de radicaux o-semiquinones anioniques (figure 92) :

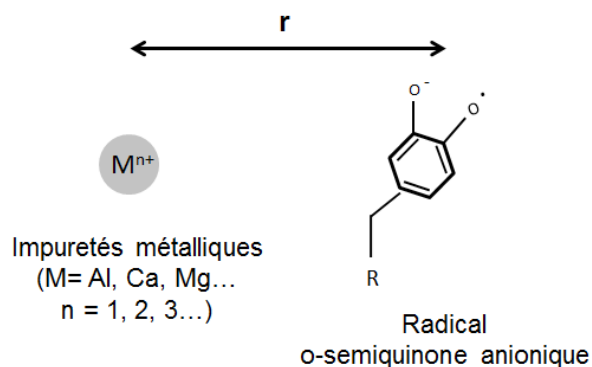


Figure 92 : Schéma explicatif de la stabilité des radicaux o-semiquinones anioniques par interaction coulombienne avec les impuretés métalliques présentes intrinsèquement dans les ongles.

Ceux qui seront stabilisés par les charges positives voisines (éléments traces Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} ...) seront à l'origine des signaux endogène *BKS*, radio-induit *RIS 5* et UV-induit *UVIS 5* observés après humidification des échantillons. En revanche, ceux qui sont localisés à trop grande distance de ces charges, et qui a fortiori sont plus nombreux du fait de la faible concentration en cations intrinsèques, sont responsables des intenses signaux endogènes *BKS* (après oxydation de certaines molécules DOPA en contact avec le dioxygène ambiant), radio-induit *RIS 2* et UV-induit *UVIS 2*. Il est alors possible de dresser une hiérarchie de la stabilité de ces différents signaux, qu'ils soient endogènes, radio-induits ou UV-induits (figure 93). De plus, un schéma explicatif est présenté en figure 94.

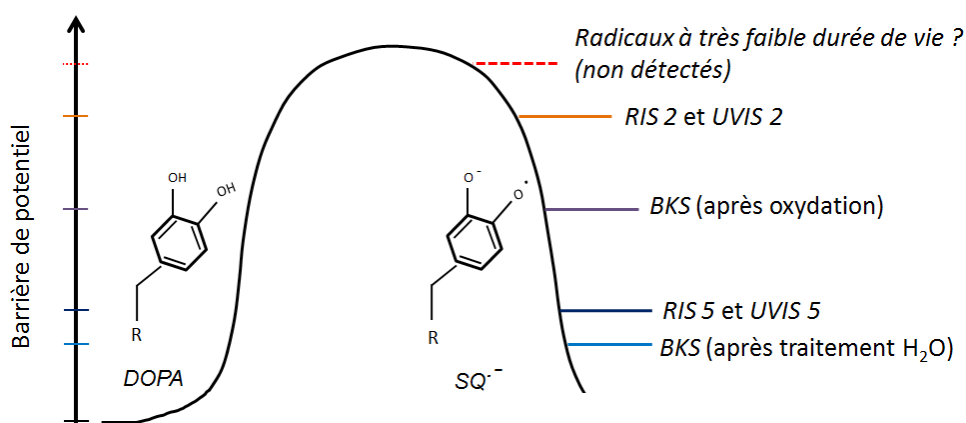


Figure 93 : Schéma qualitatif de la stabilité des signaux ayant pour origine des radicaux o-semiquinones anioniques. Il est possible que d'autres radicaux soient générés au cours de l'irradiation mais ayant une durée de vie ultra courte ce qui ne permet pas de les observer. Le signal endogène *BKS*, radio-induit *RIS 5* et UV-induit *UVIS 5* sont stabilisés par interaction coulombienne avec les impuretés métalliques (Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...).

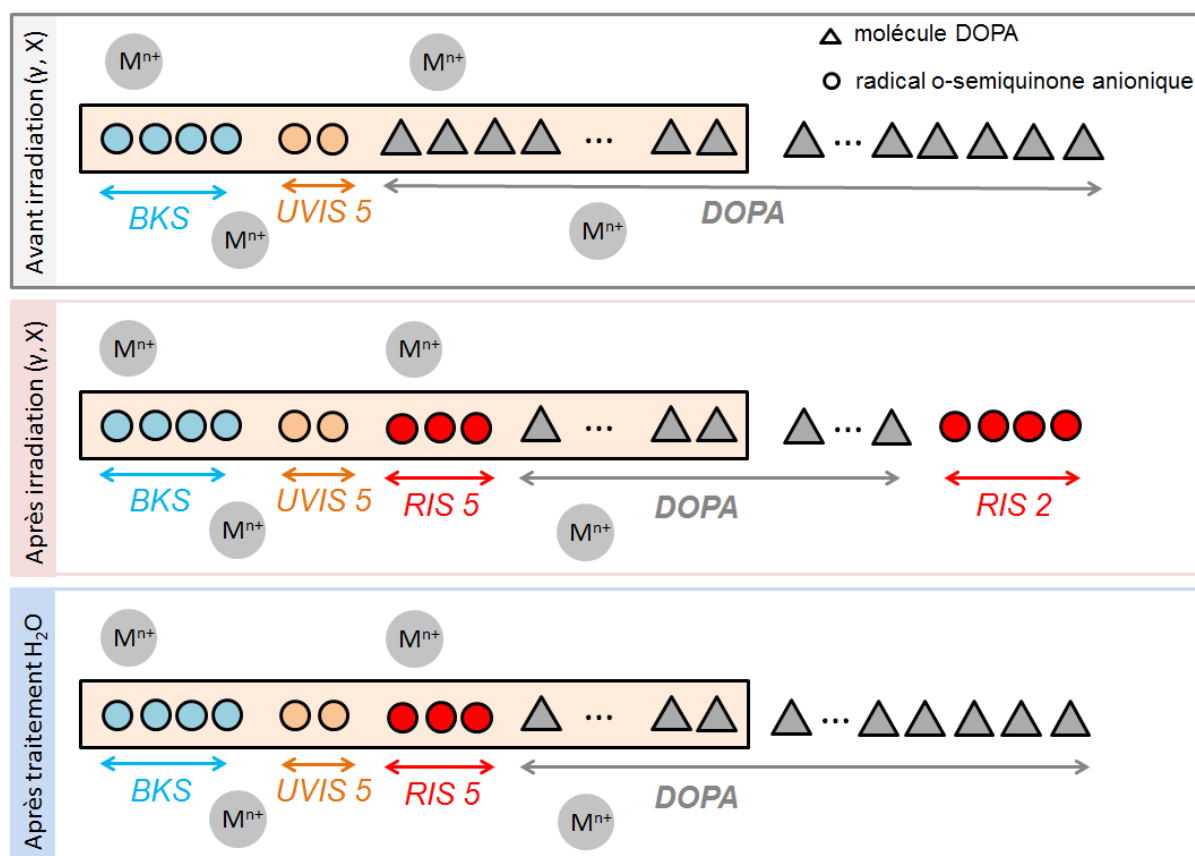


Figure 94 : Schéma explicatif des signaux *BKS*, *UVIS* et *RIS* observables dans les ongles et ayant pour origine des radicaux o-semiquinones anioniques. Les radicaux stabilisés par interaction coulombienne sont à l'origine des signaux *BKS*, *UVIS 5* et *RIS 5*. A contrario, les radicaux non stabilisés seront éliminés par humidification.

Considérons une quantité finie de molécules DOPA ainsi qu'un ensemble également fini de charges positives (Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...) dans les ongles. Avant irradiation, seuls les radicaux o-semiquinones anioniques stabilisés par ces charges positives seront observables des ongles (*BKS* et *UVIS 5*). Lors de l'irradiation, des radicaux o-semiquinones anioniques seront générés à partir des molécules de DOPA conduisant aux signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5*. Après humidification puis séchage des ongles irradiés, les radicaux radio-induits et stabilisés par les charges positives voisines vont s'ajouter au signal endogène *BKS* et UV-induit *UVIS 5*. La quantité de radicaux radio-induits stables (*RIS 5*) dépend du nombre d'impuretés métalliques intrinsèques à l'échantillon d'ongle ce qui explique le phénomène de saturation de ce signal avec la dose absorbée [Trompier et al., 2014]. Enfin la variabilité inter-

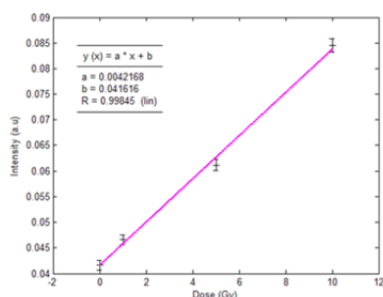
individu de la concentration de ces cations est cohérente avec la variabilité inter-individus constatée des signaux stables.

Nous avons également mené une étude sur la variabilité des signaux endogènes et radio-induits. Nous avons montré que la variabilité inter-individus en intensité du signal endogène pouvait atteindre 350 %. Une telle variabilité pourrait être expliquée par les différences en concentration d'impuretés métalliques intrinsèques entre les donneurs (alimentation, génétique, pathologies...). La différence en intensité du *BKS* peut également varier pour un même individu selon l'extrémité prélevée (mains, pieds) à hauteur de 51 %, et tout au long de l'année avec une dispersion relative maximale constatée de 18 % qui s'explique par la quantité de radicaux UV-induits stables (*UVIS 5*). Concernant les signaux radio-induits, nous avons montré que la radio-sensibilité pour un même individu semble être similaire pour les ongles de mains et de pieds avec une légère différence de 8 %. Cette radio-sensibilité ne diffère qu'à hauteur de 11 % entre les individus. Toutefois, pour une même dose de rayonnements ionisants, la différence en intensité spectrale peut atteindre 47 % rendant toute courbe de réponse en dose universelle inenvisageable.

Avant le début de ce travail de thèse, il existait deux protocoles de dosimétrie RPE sur les ongles qui sont présentés dans la figure 95.

Dosimétrie RPE sur les ongles Protocoles existants et publiés

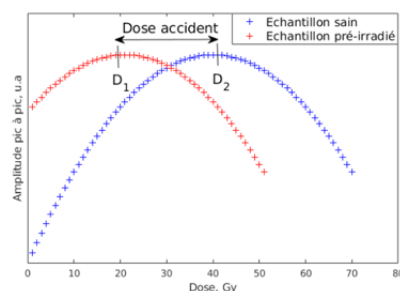
Courbe de réponse en dose RIS 2



+ : intensité RIS 2 importante
+ : variation linéaire avec la dose

- : décroissance intensité très rapide (sensibilité à l'humidité)
- : variabilité inter-individu RIS 2

Courbe de réponse en dose RIS 5



+ : composante radio-induite stable
+ : efficace en condition réelle d'accident

- : délais expertise longs
- : estimation faibles doses très délicate

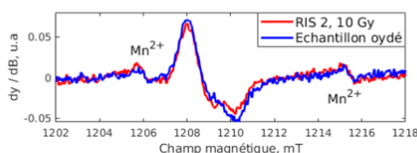
Figure 95 : Illustration des protocoles existants de dosimétrie RPE sur les ongles (détaillés en annexe). Le premier se base sur le signal radio-induit RIS 2, et le second sur le signal radio-induit stable RIS 5.

Le premier protocole [Romanyukha et al., 2014] se base sur la relation linéaire entre l'intensité du signal radio-induit RIS 2 et la dose de rayonnements ionisants. Toutefois, étant donné qu'une simple humidification des ongles suffit à éliminer ce signal, on comprend qu'il est inenvisageable de l'utiliser en cas réel d'accident radiologique. Le second protocole a été développé à l'IRSN en 2014 [Trompier, 2014]. Il se base sur le phénomène de saturation du signal radio-induit stable RIS 5 avec la dose. Bien que ce protocole ait permis d'estimer les doses reçues par trois victimes d'accident [Trompier et al., 2014], les délais d'expertise sont relativement importants et il n'est pas possible de quantifier des doses comprises entre 0 et 10 Gy à cause de l'importante variabilité du BKS mais également au-delà de la dose de saturation.

Dans l'optique de dépasser ces difficultés, nous avons donc proposé deux approches complémentaires pour discriminer les individus sains de ceux irradiés et sont présentées dans la figure 96.

Dosimétrie RPE sur les ongles
Protocoles proposés dans cette thèse

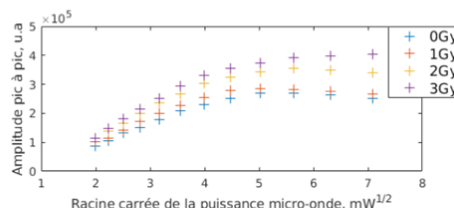
Régénération du signal RIS 2



+ : estimation des faibles doses possible
+ : décroissance du RIS 2 ne pose plus de problème

- : régénération systématique du RIS 2 non maîtrisée
- : courbe réponse en dose universelle impossible

Saturation du signal RIS 5 avec la puissance du rayonnement micro-onde



+ : discrimination des échantillons irradiés et sains possible
+ : protocole rapide

- : données sur la variabilité inter-individus manquantes
- : nécessité de travailler en spectroscopie bande Q si peu d'échantillons

Figure 96 : Illustration des protocoles de dosimétrie RPE sur les ongles proposés dans le cadre de ce travail. Le premier se base sur la régénération du signal radio-induit RIS 2 après son élimination totale, et le second sur les courbes de saturation en puissance micro-onde des radicaux radio-induits stables.

Le premier protocole, plutôt original, consiste à régénérer le signal dosimétrique RIS 2 après son élimination totale ou partielle à l'aide d'un traitement chimique oxydant. Il est fondamental de poursuivre les investigations car, bien que les résultats soient prometteurs, nous ne sommes pas actuellement en mesure de régénérer de manière systématique ce signal radio-induit. La seconde approche se base sur le comportement du signal radio-induit stable RIS 5 avec la puissance du rayonnement micro-onde. Plus l'échantillon aura été irradié, plus les temps de relaxation des radicaux radio-induits seront faibles et plus le signal sature à forte puissance micro-onde. En mesurant l'aire sous la courbe de saturation, proportionnelle à la dose reçue, il est ainsi possible de discriminer, au moins qualitativement, un individu sain d'un individu irradié en analysant les ongles des mains potentiellement irradiées aux ongles des pieds (dans le cas d'une préhension de source radioactive par exemple). Cette dernière approche est prometteuse et il est nécessaire de continuer ce travail en étudiant la variabilité des courbes de saturation en puissance micro-onde intra et inter-individu. Dans le cas où la variabilité inter-individu serait faible, nous disposerions d'une méthode de dosimétrie RPE sur les ongles à la fois simple et rapide.

*V. Développement d'un nouveau protocole pour le
traitement numérique des spectres RPE*

Chapitre V

Développement d'un nouveau protocole pour le traitement numérique des spectres RPE.....185

1 Introduction.....	187
2 Étude du bruit généré par le spectromètre RPE.....	189
2.1 Caractérisation théorique du bruit.....	189
2.2 Caractérisation expérimentale du bruit.....	194
3 Méthodes de réduction du bruit.....	203
3.1 Filtre passe-bas automatisé.....	205
3.2 Lissage polynomial.....	208
3.3 Réduction du degré polynomial.....	210
3.4 Comparaison des méthodes de débruitage.....	213
4 Processus d'extraction des variables d'intérêt.....	219
4.1 Étapes du traitement numérique.....	219
4.2 Évaluation de la pertinence du protocole numérique.....	222
4.3 Application sur un exemple concret d'étude dosimétrique.....	226
5 Conclusions et perspectives.....	229

1 Introduction

À chaque observable mesurée, une incertitude de mesure lui est associée et la technique de spectroscopie RPE ne déroge pas à la règle. Lors de l'acquisition d'un spectre RPE « brut », c'est-à-dire sans post-traitement numérique, l'utilisateur récupère un signal d'absorption en fonction du champ magnétique. Le bruit généré par le spectromètre RPE perturbe alors le signal d'intérêt. Plus l'intensité du signal est faible et proche de celle du bruit, plus il est compliqué d'extraire une information exploitable. Les variables d'intérêt que l'opérateur souhaite récupérer sont affectées par le bruit ce qui contribue aux incertitudes de mesures associées. Préalablement à l'étude comparative des techniques de débruitage, il est nécessaire de **caractériser le bruit** afin de s'en affranchir autant que possible par la suite.

Une fois cette étude préliminaire réalisée, il nous sera possible d'**évaluer différentes techniques de débruitage**. En ce sens, il existe un certain nombre de techniques et d'outils numériques pour réduire le bruit superposé aux signaux d'intérêt. L'objectif est de trouver la technique la plus appropriée et de l'**automatiser** afin de réduire la dépendance de l'opérateur.

Enfin, l'extraction des variables d'intérêt en spectroscopie RPE (comme les intensités des raies ou bien les caractéristiques spectrales par exemple) se fait généralement manuellement via une interface graphique du logiciel du spectromètre (Xepr de Bruker nous concernant) à l'aide de différents curseurs ou de fonctions « boîtes noires ». Ces traitements de données discrètes sont systématiquement opérateur-dépendants ce qui est très problématique quand on souhaite obtenir des résultats standardisés et reproductibles ce qui est fondamental pour les analyses quantitatives comme dans le domaine de la dosimétrie des rayonnements ionisants. Comme mentionné dans la partie « 4.2 Les difficultés liées à l'analyse des spectres RPE des ongles », l'analyse de données discrètes peut s'avérer complexe et constitue une source de variabilité supplémentaire (erreur humaine, subjectivité d'analyse) d'autant plus significative que les spectres RPE sont bruités. Afin d'**extraire automatiquement et en toute objectivité les variables RPE d'intérêt**, une solution est de passer d'une représentation discrète des données RPE « brutes » à une représentation

continue. En effet, le traitement d'une fonction mathématique (dérivation, intégration, détermination d'extrêma...) est à la fois simple, rapide et ne dépend aucunement de l'opérateur. Pour répondre à ce besoin, nous utilisons l'outil *Chebfun* présenté dans la partie « 6.2 L'outil de traitement numérique Chebfun ». Nous avons montré qu'il était possible de réduire considérablement le nombre de points échantillonnés afin de représenter de manière robuste un spectre RPE sous forme continue (une centaine de points suffit en pratique contre 2000 habituellement). Ainsi, en réduisant ce paramètre en routine, les durées d'acquisition peuvent être significativement réduites ce qui présente un avantage certain lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être mesuré dans des délais courts comme c'est le cas des situations d'urgence en dosimétrie radiologique.

L'objectif final de ce travail de thèse est de développer un protocole numérique opérationnel capable de traiter tout type de spectre RPE de manière fiable, reproductible, rapide et surtout, non-opérateur dépendant. Deux avantages majeurs à ce type d'outil numérique peuvent être évoqués :

- D'une part, il permettra une harmonisation des résultats au sein d'un même laboratoire, voire à une échelle plus importante dans le cas d'une diffusion sous forme de logiciel libre. Par exemple, dans le cas d'un accident radiologique de grande ampleur où il faudrait estimer rapidement les doses reçues par un grand nombre de victimes, il est tout à fait possible d'envisager un réseau exceptionnel de mesures via le réseau RPE français « ARPE ». Chaque laboratoire aurait à sa disposition un ensemble d'échantillons à mesurer (ongles, émail dentaire, os...) selon des paramètres d'acquisition spécifiques et le traitement des données serait automatisé par le protocole numérique proposé dans le cadre de ce travail de thèse ;
- D'autre part, la représentation sous forme de polynômes de Tchebychev des spectres RPE permettrait l'élaboration d'une base de données universelle. Autrement dit, chaque spectre RPE associé à une entité paramagnétique serait stocké sous forme d'une seule et unique fonction polynomiale et il serait possible d'interroger la base de donnée pour identifier, par exemple, un système paramagnétique inconnu.

2 Étude du bruit généré par le spectromètre RPE

2.1 Caractérisation théorique du bruit

2.1.1 La loi de probabilité binomiale

La première étape fondamentale pour caractériser le bruit du spectromètre RPE est la compréhension physique de son origine. Commençons donc par rappeler ce qu'est une expérience de spectroscopie RPE en utilisant une terminologie mathématique simple qui nous permettra de mieux appréhender cette étude préliminaire.

Lors d'une expérience de spectroscopie RPE, un flux de photons est constamment envoyé sur un système paramagnétique soumis à un intense champ magnétique. Certains photons seront absorbés par l'entité paramagnétique et les autres seront réfléchis par celle-ci puis détectés avec une certaine probabilité par un détecteur synchrone. L'absorption des photons par le système paramagnétique est régie par une loi physique qui dépend de l'entité radicalaire, de son environnement chimique et des conditions d'expérience. Cet aspect théorique a d'ores et déjà été abordé dans la partie « 3.1 Les bases théoriques de la spectroscopie RPE ». Une mesure de spectroscopie RPE consiste à comparer le flux de photons incidents au flux de photons absorbés par le détecteur synchrone. Notons p la probabilité qu'a le détecteur synchrone de détecter ces photons. Enfin, je fais également l'hypothèse que **la source de bruit principale provient de ce comptage de photons**, et que le bruit généré par les composants électroniques et l'environnement n'est pas dominant.

Considérons maintenant l'expérience simple qui consiste à envoyer un unique photon au détecteur synchrone. L'univers $\Omega = \{A, B\}$ relatif à cette expérience est constitué de deux éventualités :

- A lorsque le photon est détecté ;
- B lorsqu'il ne l'est pas.

Soit X la variable aléatoire discrète correspondant au nombre de succès, i.e de détection du photon au cours de l'expérience. On définit cette variable aléatoire par :

- $X = 1$ si l'évènement A est réalisé ;
- $X = 0$ si l'évènement B est réalisé.

La loi de probabilité associée à la variable aléatoire X est la loi de Bernoulli $\mathcal{B}(1,p)$ telle que $P(X=1)=p$ et $P(X=0)=(1-p)$. Calculons l'espérance $E(X)$ et la variance $V(X)$ de cette variable aléatoire X :

$$E(X) = \sum_{i=1}^2 p_i x_i = 0 \cdot (1-p) + 1 \cdot p = p \quad (27)$$

$$V(X) = E(X^2) - E(X)^2 = \left(\sum_{i=1}^2 p_i x_i^2 \right) - p^2 = (1-p) \cdot (0^2) + p \cdot 1^2 - p^2 = p(1-p) \quad (28)$$

Or, la probabilité de détecter un unique photon expérimentalement en spectroscopie RPE est très faible [Barr et al., 2008], soit $p \ll 1$, alors la variance de la variable aléatoire X peut être approximée par :

$$V(X) = p(1-p) \simeq p = E(X) \quad (29)$$

Si on considère maintenant la variable aléatoire Y_n associée au nombre de détections du photon par le détecteur lors de n expériences de spectroscopie RPE identiques et indépendantes, alors chaque expérience ne peut donner que deux résultats possibles, à savoir, le photon est détecté ou ne l'est pas. La somme des n variables aléatoires X_i suit la loi de probabilité binomiale $\mathcal{B}(n,p)$ telle que :

$$\begin{aligned} Y_n : \Omega^n &\rightarrow \mathbb{R}^n \\ Y_n = \sum_{i=1}^n X_i &\rightarrow \mathfrak{B}(n, p) \end{aligned} \quad (30)$$

Là encore, calculons l'espérance et la variance de la nouvelle variable aléatoire Y_n en sachant que les variables aléatoires X_i sont indépendantes et identiquement distribuées :

$$E(X_1 + X_2 + \dots + X_n) = \sum_{i=1}^n E(X_i) = n \cdot p \quad (31)$$

$$V(X_1 + X_2 + \dots + X_n) = \sum_{i=1}^n V(X_i) + 2 \sum_{1 \leq i < j \leq n} \text{cov}(X_i, X_j)$$

La covariance des variables aléatoires X_i et X_j se calcule ainsi :

$$\text{cov}(X_i, X_j) = E[(X_i - E(X_i))(X_j - E(X_j))]$$

Or les variables aléatoires sont indépendantes et identiquement distribuées :

$$E[(X_i - E(X_i))(X_j - E(X_j))] = E[X_i X_j - X_i E(X_j) + E(X_i) X_j - E(X_i) E(X_j)] \quad (32)$$

$$\text{cov}(X_i, X_j) = E(X_i) E(X_j) - E(X_i) E(X_j) + E(X_i) E(X_j) - E(X_i) E(X_j) = 0$$

Par conséquent, elles ne sont pas corrélées. Ainsi,

$$V(X_1 + X_2 + \dots + X_n) = \sum_{i=1}^n V(X_i) = n \cdot p(1-p) \simeq n \cdot p$$

La variable aléatoire Y_n suit la loi binomiale $\mathcal{B}(n, p)$ et $E(Y_n) \approx V(Y_n) = np$.

2.1.2 La densité de probabilité normale

Considérons la même variable aléatoire Y_n de l'expérience décrite précédemment. Lorsque le nombre n de photons détectés est suffisamment grand, que la probabilité de détection d'un photon est suffisamment faible [Barr et al., 2008] et si la quantité $(n \cdot p)$ est finie, alors la loi de probabilité binomiale $\mathcal{B}(n, p)$ peut être approximée par une loi de probabilité normale par le théorème central limite [DasGupta, 2010] telle que :

$$Y_n = \sum_{i=1}^n X_i \rightarrow N(np, \sqrt{np(1-p)}) \quad (33)$$

Quand la probabilité p de détection d'un photon est faible, alors

$$Y_n \rightarrow N(np, \sqrt{np})$$

Il existe une infinité de distributions de probabilités gaussiennes. Or, nous montrons ici qu'il s'agit d'une distribution très particulière, à savoir une **distribution de probabilité gaussienne** de type **Poisson** où la variance est égale à l'espérance.

La variable aléatoire Y_n qui représente le nombre de photons détectés lors d'une expérience de spectroscopie RPE suit la loi binomiale $Y_n \rightarrow \mathfrak{B}(n, p)$ qui peut être approximée par une loi normale de type Poisson $Y_n \rightarrow N(np, \sqrt{np})$.

Voyons maintenant comment utiliser ce résultat afin de caractériser expérimentalement le bruit généré par le spectromètre RPE.

Afin d'apporter des éléments de réponse, rappelons qu'un spectre RPE est composé d'un ensemble de couples de coordonnées $\{x_i, y_i\}$. À chaque abscisse x , i.e valeur de champ magnétique, est associée une ordonnée y , i.e valeur d'absorption. En réalité, nous obtenons la 1^{ère} dérivée du spectre d'absorption à cause du détecteur synchrone et de la modulation du champ magnétique (« 3.2 Les principaux éléments d'un spectromètre RPE »). Les valeurs que peuvent prendre les ordonnées $\{y_i\}$ ne relèvent pas du hasard. D'une part, il y a une loi physique, que l'on note f , qui régit l'absorption du rayonnement micro-onde par le système paramagnétique. D'autre part, nous avons vu que les variables aléatoires Y_n suivent une loi de probabilité normale $Y_n \rightarrow N(np, \sqrt{np})$. Posons maintenant la variable aléatoire $Y_{i,n}$ associée au nombre de photons détectés en considérant l' i -ième abscisse x_i et la n -ième acquisition spectrale. En effet, il est très fréquent de réaliser plusieurs acquisitions d'un même échantillon (n fois) afin de d'augmenter le rapport signal sur bruit qui varie en $\sqrt{n}$ (« 3.3.3 Le nombre d'acquisitions »). Plus l'opérateur réalisera d'acquisitions (n mesures identiques et indépendantes), plus la valeur d'absorption mesurée y_i sera proche de l'espérance mathématique $E(Y_{i,n})$.

Ainsi, comme le montre la figure 97, les valeurs d'absorption mesurées lors d'une expérience RPE sont distribuées aléatoirement selon une densité de probabilité normale de type Poisson.

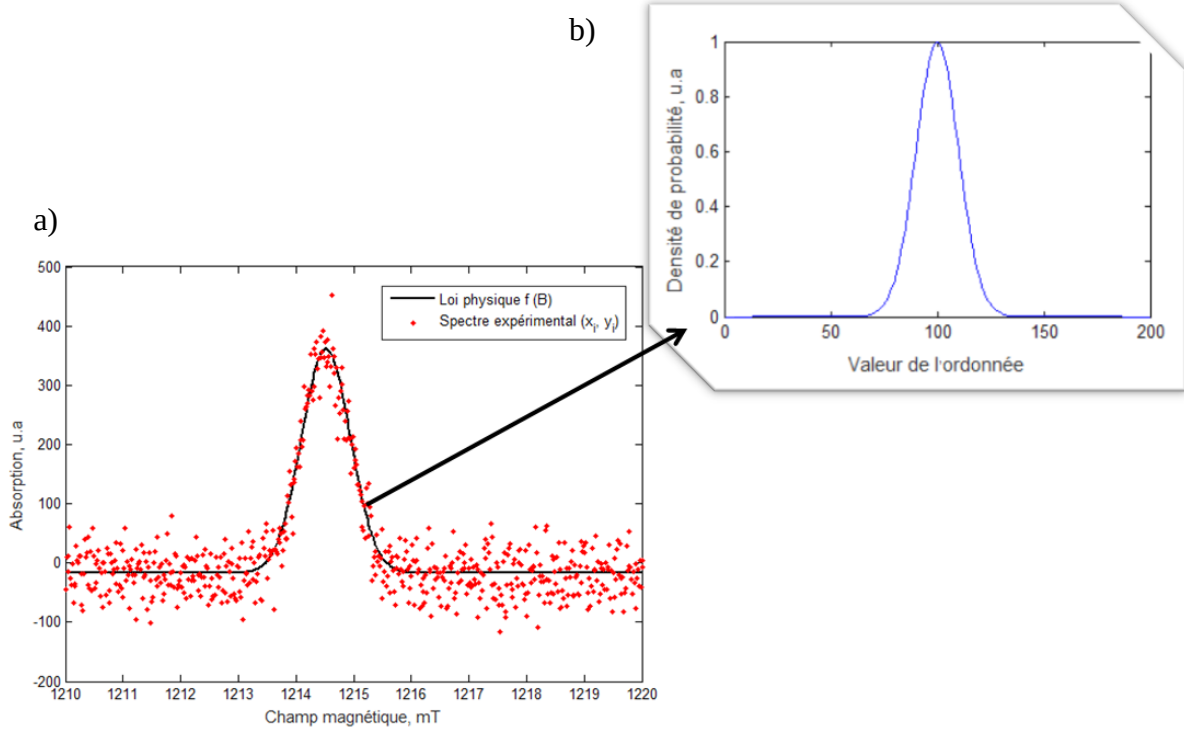


Figure 97 : Simulation d'un spectre d'absorption quelconque (a) : en noir il s'agit de la loi physique qui régit l'absorption du rayonnement micro-onde par l'entité paramagnétique soumise à un champ magnétique variable. En rouge sont représentés les valeurs d'absorption tirées aléatoirement dans la distribution de probabilité normale de type Poisson (b).

Un dernier point important à aborder est la potentielle corrélation des variables aléatoires entre elles. On pourrait penser que, puisqu'il existe une loi physique f qui relie le champ magnétique aux valeurs d'absorption, alors les variables aléatoires Y_i sont corrélées entre elles, ce qui revient à dire que la covariance des variables aléatoires Y_i est non nulle. En réalité, ce n'est pas le cas comme nous allons le montrer :

Soient $Y_i = f(x_i) + R_i$ la variable aléatoire associée à la détection du photon par le détecteur, $f(x_i) = E(Y_i) = \mu_i$ la loi physique qui relie l'absorption du rayonnement micro-onde par l'entité paramagnétique et $R_i \rightarrow N(0, \sqrt{E(Y_i)})$ la variable aléatoire associée au bruit généré par le spectromètre RPE. La covariance de Y_1 et Y_2 se calcule ainsi : $cov(Y_1, Y_2) = E[(Y_1 - \mu_1)(Y_2 - \mu_2)]$ soit $cov(Y_1, Y_2) = E[R_1 R_2] = E(R_1) \cdot E(R_2) = 0$ car

$E(R_1)=E(R_2)=0$. Ainsi, la covariance des variables aléatoires Y_i étant nulle, on en déduit qu'elles ne sont donc pas corrélées.

2.2 Caractérisation expérimentale du bruit

Maintenant que nous avons décrit de manière théorique l'origine physique du bruit généré en spectroscopie RPE, vérifions si expérimentalement notre hypothèse est juste. Dans un premier temps, pour vérifier si les variables aléatoires $Y_{i,n}$ suivent une loi de probabilité normale, nous avons réalisé dans les mêmes conditions expérimentales 2000 acquisitions RPE successives et indépendantes d'un tube en quartz vide. Au préalable, nous avons vérifié que nous ne mesurons que du bruit. Chaque spectre RPE est composé d'un ensemble de 2000 points ou couples de coordonnées $\{x_{i,n}, y_{i,n}\}$ avec n correspondant à la n -ième acquisition, $n \in [1; 2000]$, et i à l' i -ième abscisse, $i \in [1; 2000]$ (formule 34).

$$\begin{bmatrix} y_{1,1} & y_{1,2} & \cdots & y_{1,n} \\ y_{2,1} & & & y_{2,n} \\ \vdots & & & \vdots \\ y_{i,1} & y_{i,2} & \cdots & y_{i,n} \end{bmatrix} \text{ Avec } i \in [1; 2000] \text{ et } n \in [1; 2000] \quad (34)$$

Par exemple, l'ordonnée $y_{3,4}$ correspond à l'ordonnée de la 3e abscisse lors de la 4e acquisition spectrale. Ainsi, pour chaque abscisse x du spectre RPE, nous disposons d'un ensemble de 2000 ordonnées. La figure 98 récapitule en image ces propos.

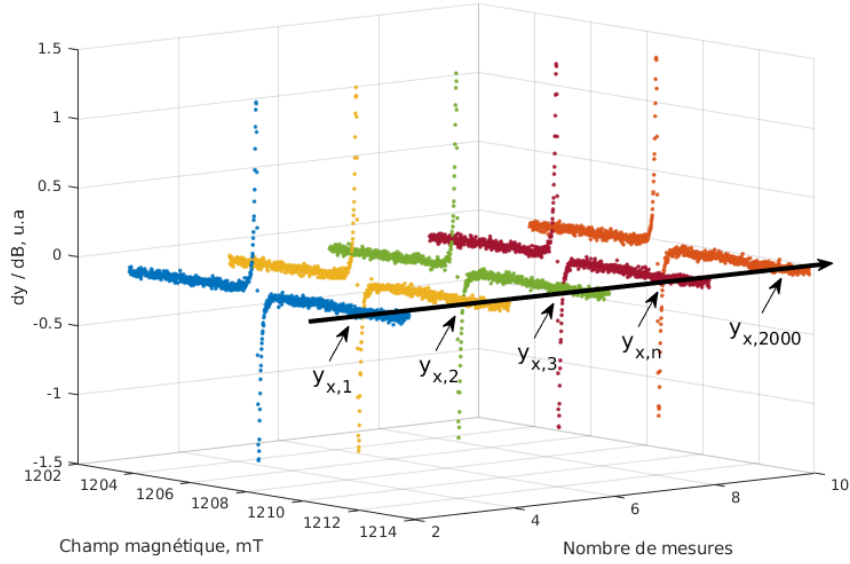


Figure 98 : Schéma explicatif de la démarche pour caractériser le bruit du spectromètre RPE. On réalise 2000 mesures du même spectre et, pour chaque abscisse x , on analyse les 2000 ordonnées $\{y_{i,n}\}$.

La méthode employée pour caractériser la densité de probabilité suivie par les variables aléatoires $Y_{i,n}$ est la suivante :

1. Pour les 2000 valeurs $\{y_{i,n}\}$ de chaque abscisse x_i , on calcule les moyennes et écart-types au carré $\{\mu_i, \sigma_i^2\}$ qui constituent de bons estimateurs des espérances et des variances ainsi que les coefficients d'acuité (appelé *kurtosis*) $E[(Y_{i,n} - \mu_i)^4]$ et d'asymétrie $E[(\frac{Y_{i,n} - \mu_i}{\sigma_i})^3]$;
2. Pour chaque couple (μ_i, σ_i) , on génère la fonction gaussienne associée

$$f_i(z) = \frac{a}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}(\frac{z - \mu_i}{\sigma_i})^2} \text{ avec } a \text{ un facteur de normalisation. En effet, une condition}$$

$$\text{obligatoire est } \int_{-\infty}^{+\infty} f_i(z) dz = 1 ;$$

3. On génère les 2000 histogrammes des $\{y_{i,n}\}$ ordonnées de chaque abscisse x_i et on vérifie si les distributions des valeurs sont compatibles avec les 2000 densités de probabilité gaussiennes f_i (annexe « 1.10.4 Méthode de comparaison des densités de probabilité »);
4. On génère le diagramme Quantile – Quantile (Q-Q plot) qui est un outil graphique permettant d'évaluer visuellement la pertinence de l'ajustement des distributions des valeurs $\{y_{i,n}\}$ par rapport à une distribution normale centrée ;
5. On effectue le test de Shapiro-Wilk [Ghasemi & Zahediasl, 2012] qui est un test statistique non paramétrique très performant et couramment utilisé qui permet de tester l'hypothèse H_0 selon laquelle l'échantillon étudié est normalement distribué avec un niveau de risque associé à 5 %.

Ainsi, si les variables aléatoires $Y_{i,n}$ suivent une loi de probabilité normale, alors :

- Les coefficients d'acuité calculés doivent être égaux à 0 [Field, 2000 & 2009] ;
- Les coefficients d'asymétrie calculés doivent être égaux à 3 [Field, 2000 & 2009] ;
- Les distributions des valeurs $\{y_{i,n}\}$ doivent être compatibles à 68 % avec les distributions de probabilité gaussiennes f_i associées (explication en annexe « 1.10.4 Méthode de comparaison des densités de probabilité ») ;
- Les courbes représentant les diagrammes Quantiles – Quantiles doivent être linéaires [Goldfarb et Pardoux, 2005] ;
- Les hypothèses H_0 du test de Shapiro-Wilk doivent être vérifiées avec un niveau de risque $\alpha = 5 \%$ (probabilité de rejeter l'hypothèse alors qu'elle est vraie) [Ghasemi & Zahediasl, 2012].

Les résultats de la caractérisation expérimentale du bruit sont présentés dans le tableau 12 et un exemple est présenté en figure 99.

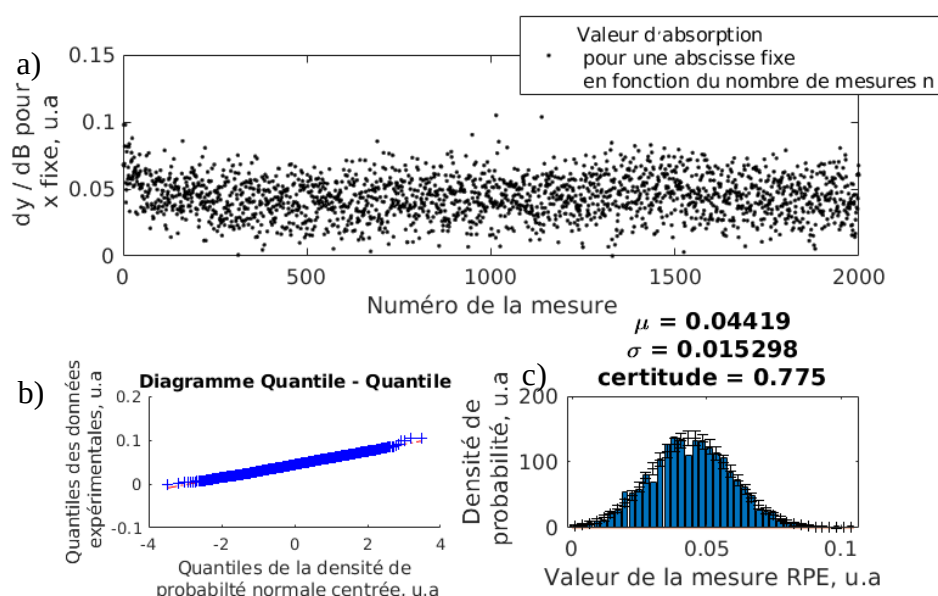


Figure 99 : a) Spectre RPE caractéristique du bruit généré par le spectromètre.

b) Diagramme Quantile-Quantile permettant d'évaluer la pertinence de l'ajustement des distributions des valeurs $\{y_{i,n}\}$ au modèle gaussien théorique. c) Exemple de compatibilité de la distribution des valeurs $\{y_{x,n}\}$ avec la densité de probabilité gaussienne f_i de paramètres (μ_i, σ_i) . La compatibilité est estimée à 77,50 %.

Tableau 12 : Résultats obtenus pour la caractérisation expérimentale du bruit généré par le spectromètre RPE. L'étude porte sur l'ensemble des 2000 ordonnées $\{y_{n,j}\}$ associées à chaque abscisse x_i .

Zone d'étude du bruit	Coefficient d'acuité moyen	Coefficient d'asymétrie moyen	Compatibilité moyenne des densités de probabilité	Couple (μ, σ^2)
$\{\{y_{i,n}\}_{n \rightarrow 1 \text{ à } 2000}\}_{i \rightarrow 1 \text{ à } 2000}$	3,0469	0,0401	68,00 %	$(3,33 \cdot 10^{-2}, 2,16 \cdot 10^{-4})$

On constate d'une part que le bruit est distribué aléatoirement autour d'une valeur moyenne de $3,33 \cdot 10^{-2}$ u.a d'écart-type égal à $2,16 \cdot 10^{-4}$ u.a. De plus, le diagramme Quantile-Quantile est linéaire ce qui conforte l'hypothèse d'une distribution gaussienne des valeurs $\{y_{i,n}\}$ (figure 99 b). D'autre part, les coefficients d'acuité et d'asymétrie sont respectivement égaux à 3,0469 et à 0,0401 (tableau 12) avec des valeurs maximales respectives de 3.8509 et de 0.2461 ce qui est compatible avec l'hypothèse d'une densité de probabilité gaussienne [Field, 2000 & 2009, Trochim & Donnelly, 2006, Gravetter & Wallnau 2014]. De plus, on constate qu'en moyenne, la compatibilité de la distribution des valeurs $\{y_{i,n}\}$ avec les

distributions de probabilité gaussiennes f_i est évaluée à $68,0 \% \pm 7,2 \%$. Enfin, le test de Shapiro-Wilk montre que plus de 96 % des données expérimentales sont normalement distribuées avec un risque α de rejeter l'hypothèse à 5 % [Ghasemi & Zahediasl, 2012] ce qui soutient l'hypothèse formulée H_0 d'une distribution normale ($p < 0.05$).

L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse formulée au préalable : les mesures brutes en spectroscopie RPE suivent une loi de densité de probabilité normale.

Maintenant, reste à savoir si notre première hypothèse (le bruit est majoritairement lié au comptage de photon dans une expérience RPE) est elle aussi confortée. Pour ce faire, vérifions si l'espérance $E(Y_{i,n})$ des variables aléatoires $Y_{i,n}$ est égale à sa variance $V(Y_{i,n})$ (figure 100). La moyenne μ_i constitue un bon estimateur de l'espérance et le carré de l'écart-type σ_i^2 un bon estimateur de la variance.

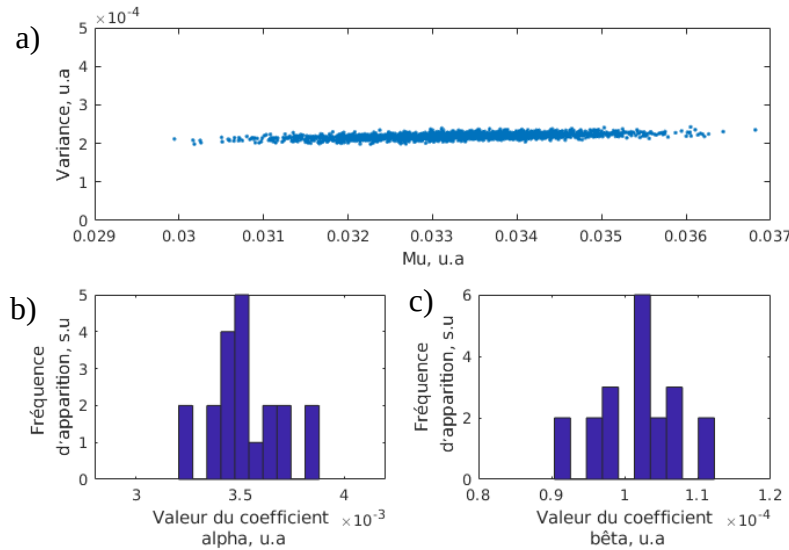


Figure 100 : a) Figure représentant la variation de l'estimateur de l'espérance μ_i en fonction du carré de l'estimateur de l'écart-type σ_i^2 . b) et c) Histogrammes des coefficients α_i et β_i obtenus par régression linéaire.

On constate que la moyenne μ_i varie linéairement avec la variance σ_i^2 . Cependant, afin de vérifier notre hypothèse de départ, nous avons effectué une régression linéaire entre ces deux paramètres : $\sigma_i^2 = \alpha_i \cdot \mu_i + \beta_i$. Si notre hypothèse est juste, nous devrions obtenir $\alpha_i = 1$ et

$\beta_i=0$ pour l'ensemble des couples (μ_i, σ_i^2) testés. Les histogrammes représentant les coefficients α_i et β_i sont centrés autour d'une valeur moyenne et suivent une distribution campaniforme (figure 100 b et c). Concernant l'expérience menée, on obtient les coefficients suivants : $\langle \alpha_i \rangle = 3,53 \cdot 10^{-3} \pm 0,18 \cdot 10^{-3} u.a$ et $\langle \beta_i \rangle = 1,02 \cdot 10^{-4} \pm 0,06 \cdot 10^{-4} u.a$

Cependant, on constate que la variance s'exprime comme une combinaison linéaire de l'espérance, $V(Y_{i,n}) = \langle \alpha_i \rangle E(Y_{i,n}) + \langle \beta_i \rangle$, contrairement à notre hypothèse initiale où ces deux paramètres étaient égaux. Il semblerait qu'il y ait une source de bruit supplémentaire, a fortiori généré par les composants électroniques (diode, interférences électriques) ou bien par l'environnement. À l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer l'origine de ce phénomène, toutefois on remarque que le coefficient multiplicatif α_i agit comme un gain sur les mesures RPE effectuées. Concernant le coefficient β_i , il pourrait éventuellement s'agir d'une correction automatique de la ligne de base. Il pourrait être intéressant de mener une investigation complémentaire par la suite.

Le bruit généré par le spectromètre RPE est caractérisé par une densité de probabilité gaussienne $N(\mu, \sqrt{\alpha \cdot \mu + \beta})$ différente de celle à laquelle nous nous attendions, à savoir une densité de probabilité gaussienne de type Poisson $N(\mu, \sqrt{\mu})$.

2.2.1 L'hypothèse ergodique du bruit

Cette étude préliminaire a permis de comprendre en partie l'origine du bruit mesuré lors d'une expérience de spectroscopie RPE. Si des zones d'ombre subsistent, nous avons néanmoins montré que le bruit RPE est caractérisé par une densité de probabilité gaussienne $N(\mu, \sqrt{\alpha \cdot \mu + \beta})$ et ce résultat nous servira pour l'élaboration des méthodes de débruitage.

L'objet de ce paragraphe est de montrer comment obtenir une caractérisation du bruit de même qualité que l'étude précédente mais avec seulement une acquisition spectrale ce qui permettrait à tout un chacun de caractériser le bruit de son spectromètre RPE rapidement. L'hypothèse ergodique, reformulée dans le cadre spécifique de notre travail, consiste à

affirmer que les mesures d'un signal aléatoire au cours du temps apportent la même information que des mesures simultanées de signaux aléatoires issus du même processus. Dans le cas de l'expérience précédente, cela revient à dire qu'étudier le bruit en manipulant les $n=2000$ ordonnées $y_{i,n}$ d'une abscisse x_i revient au même qu'à étudier la distribution des ordonnées sur une zone plate du spectre comme le montre la figure 101. Cela peut paraître évident mais tout système physique n'est pas nécessairement ergodique et c'est la raison pour laquelle nous avons mené cette étude.

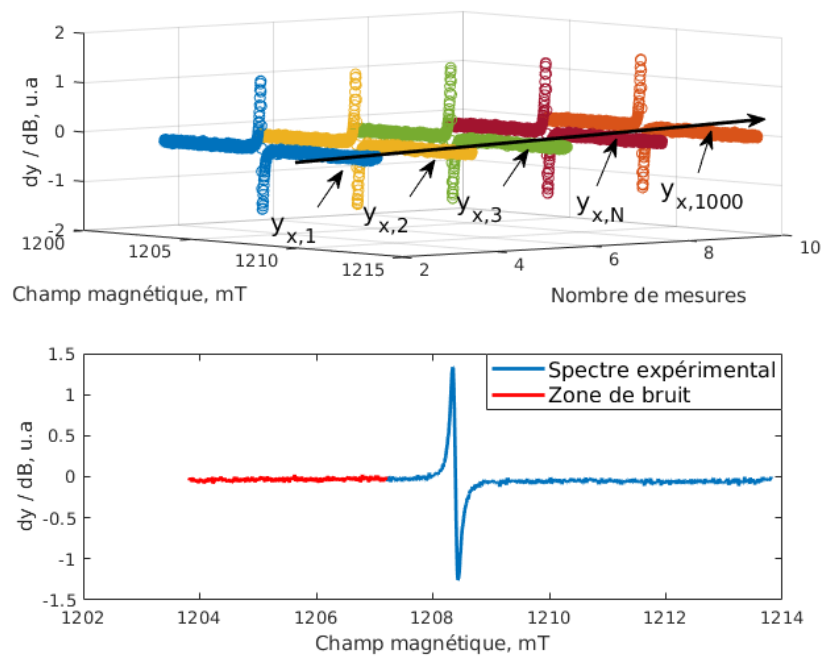


Figure 101 : Schéma explicatif de l'hypothèse ergodique du bruit : pour caractériser le bruit du spectromètre, selon l'hypothèse ergodique, il est équivalent d'étudier la dispersion des ordonnées pour une abscisse donnée pour un ensemble n mesures (a) que d'étudier une zone plate bruitée d'une seule acquisition spectrale (b).

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai donc repris les données précédentes et, plutôt que de traiter l'ensemble des 2000 ordonnées pour chaque abscisse donnée, j'ai traité l'ensemble des 2000 ordonnées de chacun des 2000 spectres. Les résultats sont présentés dans le tableau 13 et un exemple est traité en figure 102.

Tableau 13 : Synthèse des résultats obtenus pour la caractérisation expérimentale du bruit généré par le spectromètre RPE. La première étude porte sur l'ensemble des 2000 ordonnées $\{y_n\}$ associées à chaque abscisse x_i . La seconde porte sur l'ensemble des 2000 ordonnées $\{y_{ij}\}$ associées à chaque acquisition spectrale n .

Zone d'étude du bruit	Coefficient d'acuité moyen	Coefficient d'asymétrie moyen	Compatibilité moyenne des densités de probabilité	Couples (μ, σ^2)
$\{\{y_{x,n}\}_{n \rightarrow 1 \text{ à } 2000}\}_{x \rightarrow 1 \text{ à } 2000}$	3,0469	0,0401	68,00 %	$(3,33 \cdot 10^{-2}, 2,16 \cdot 10^{-4})$
$\{\{y_{x,n}\}_{x \rightarrow 1 \text{ à } 2000}\}_{n \rightarrow 1 \text{ à } 2000}$	2,9959	0,0021	68,33 %	$(3,31 \cdot 10^{-2}, 2,17 \cdot 10^{-4})$

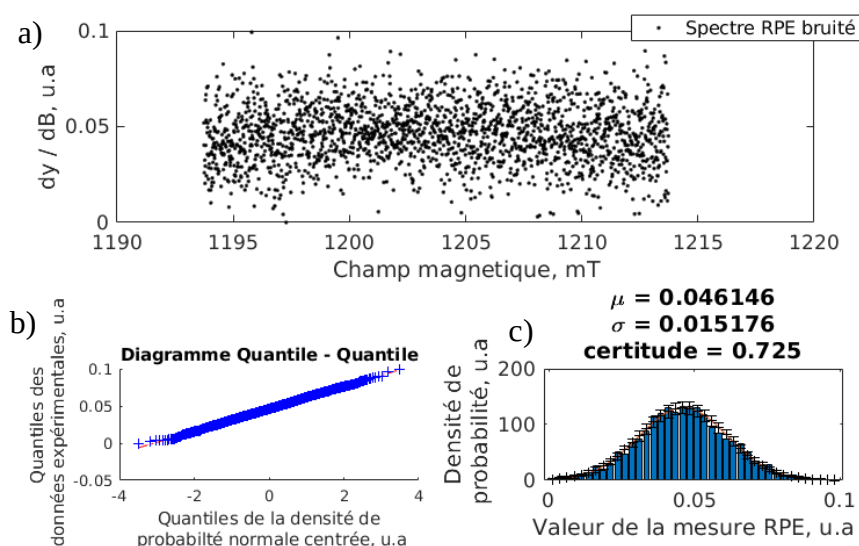


Figure 102 : a) Spectre RPE caractéristique du bruit généré par le spectromètre. b) Diagramme Quantile-Quantile permettant d'évaluer la pertinence de l'ajustement des distributions des 2000 valeurs $\{y_x\}$ de chaque spectre au modèle gaussien théorique. c) exemple de compatibilité de la distribution des valeurs $\{y_{x,nj}\}$ avec la densité de probabilité gaussienne f_n de paramètres (μ_n, σ_n) . Cette compatibilité est estimée à 72,50 %.

Nous obtenons des résultats similaires à l'expérience précédente. En effet, on constate que la distribution des valeurs $\{y_{i,n}\}$ suit une densité de probabilité, a fortiori, gaussienne comme le montre, par exemple, la linéarité du diagramme quantile–quantile. Ce résultat est également conforté par l'étude de la compatibilité des valeurs $\{y_{x,n}\}$ avec la densité de probabilité gaussienne de paramètres (μ_n, σ_n) : cette compatibilité est estimée à plus de 68 % qui, comme montré en annexe « 1.10.4 Méthode de comparaison des densités de probabilité », conforte l'origine d'une densité de probabilité gaussienne. Le test statistique de Shapiro-Wilk soutient également l'hypothèse H_0 (données distribuées normalement) pour 93,43 % des données expérimentales avec un niveau de risque α de 5 % (risque de rejeter l'hypothèse H_0 alors qu'elle est vraie) [Ghasemi & Zahediasl, 2012] ($p < 0.05$). De plus, les coefficients d'acuité et d'asymétrie sont respectivement égaux à 2,9959 et à 0,0021 ce qui est compatible avec l'hypothèse d'une densité de probabilité gaussienne [Field, 2000 & 2009, Trochim & Donnelly, 2006, Gravetter & Wallnau 2014] au même titre que les résultats obtenus dans la partie précédente. Enfin, on remarque que les couples (μ, σ^2) des deux expériences ne diffèrent qu'à hauteur de 0,6 % et de 0,4 % ce qui conforte l'hypothèse ergodique formulée en début de paragraphe.

3 Méthodes de réduction du bruit

Dans le domaine du traitement des signaux, le bruit généré expérimentalement s'ajoute aux signaux discrets mesurés et constitue dès lors une source de confusion pour l'opérateur. La partie « 2 Étude du bruit généré par le spectromètre RPE » a permis la compréhension puis la caractérisation du bruit généré par le spectromètre RPE utilisé au cours de ce travail. Afin d'obtenir l'information la plus « pure » possible, il est nécessaire de s'affranchir autant que possible de ce bruit parasite.

Pour cela, il existe un certain nombre de techniques et d'outils numériques pour réduire le bruit superposé aux signaux d'intérêt. Ces techniques s'articulent autour de traitements numériques, plus ou moins complexes tels que :

- Les **transformées de Fourier** discrètes puis l'application de filtres dans le domaine de Fourier [Blanchet & Charbit, 1998, Boite & Leich, 1990, Bellanger, 1987, Kunt, 1981]. En fonction des fréquences caractéristiques du bruit, l'opérateur pourra utiliser un filtre passe-bas, passe-haut, passe-bande ou coupe-bande qui coupe respectivement les hautes, basses ou des intervalles de fréquences.
- La décomposition des signaux sur des bases d'**ondelettes** discrètes. Le traitement des signaux par ondelettes fait partie des méthodes standards d'analyse et de débruitage de données discrètes [Chaux et al., 2005, Rivet, 2003, Mallat, 1999, Donoho et al., 1995, Mallat, 1989]. Deux méthodes de débruitage par ondelettes sont actuellement couramment utilisées, à savoir le débruitage par seuillage et le débruitage par projection.
- Les **algorithmes de lissage** qui vont remplacer chaque valeur mesurée par une moyenne pondérée d'un certain ensemble de valeurs adjacentes [Chen et al., 2004, Swets et al., 1999, Simonoff et al., 1998]. Par exemple, pour un ensemble de 5 points :

$$y_i^{\text{lissé}} = \frac{(a \cdot y_{i-2} + b \cdot y_{i-1} + c \cdot y_i + d \cdot y_{i+1} + e \cdot y_{i+2})}{a+b+c+d+e} .$$
 Il existe plusieurs types de lissages

tels que, par exemple, la moyenne glissante ($a=b=c=d=e$), le lissage polynomial où les coefficients sont égaux aux coefficients de Pascal $\binom{n}{k}$ pour $k \in [0; n]$ ou encore le lissage rectangulaire où $a=e=1$, $b=d=2$ et $c=3$.

À ce titre, le logiciel Xenon de Bruker utilise le filtre linéaire passe-bas et le lissage polynomial comme traitements numériques automatiques pour réduire le bruit des spectres RPE. Cependant, le débruitage des spectres RPE expérimentaux se fait de manière subjective car l'opérateur choisit arbitrairement la fréquence de coupure (filtre passe-bas) parmi un ensemble proposé et le nombre de points pour le lissage polynomial. De plus, ces deux méthodes ne sont pas optimisées. Il est important de souligner que ces deux types de filtrage peuvent être réalisés simultanément (le lissage polynomial intervenant après le filtrage passe-bas). Ainsi, la **première étape fondamentale** a donc été de **désactiver** ces **post-traitements numériques** dans le spectromètre RPE afin d'acquérir des données expérimentales brutes.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes donc intéressés à ces deux méthodes conventionnelles. Notre travail a consisté à **développer** des scripts de débruitage (**filtre linéaire passe-bas** par transformées de Fourier et **lissage polynomial**) sous Matlab, de les **optimiser** puis de les **automatiser** dans le but de réduire la dépendance de l'opérateur dans les traitements des spectres RPE. Nous avons également tenté d'utiliser la **technologie Tchebychev** à des fins de débruitage ce qui n'a, à notre connaissance, jamais été réalisé à ce jour en spectroscopie RPE conventionnelle. Les méthodes fondées sur les ondelettes se basent sur une méthodologie qui ne dispose pas d'un écosystème informatique et logiciel aussi complet que celui de *Chebfun*. Toutefois, il existe des niches où les ondelettes sont utilisées. Ces utilisations nécessitent une expertise qui n'est pas réaliste dans le cadre d'une utilisation et d'une diffusion très large de l'outil numérique que nous voudrions développer. Cependant, cette démarche pourrait être entreprise au sein de l'IRSN par la suite à des fins d'amélioration de l'outil numérique.

3.1 Filtre passe-bas automatisé

Lorsque nous analysons un signal temporel (figure 103 a) et que nous nous intéressons à ses composantes fréquentielles, il est nettement plus commode de travailler dans l'espace des fréquences, aussi appelé « Espace de Fourier » (figure 103 b). Étant donné que le bruit RPE est caractérisé par des hautes fréquences (figure 103 b), une méthode simple pour le réduire consiste à appliquer un filtre passe-bas. Le rôle de ce filtre linéaire est d'atténuer les hautes fréquences (bruit) tout en conservant intactes les basses fréquences (signal). La distinction entre les « basses » et les « hautes » fréquences est rendue possible en les comparant à une fréquence « témoin » ou fréquence de coupure. Les fréquences supérieures à la fréquence de coupure seront donc atténuées et celles inférieures seront conservées telles quelles.

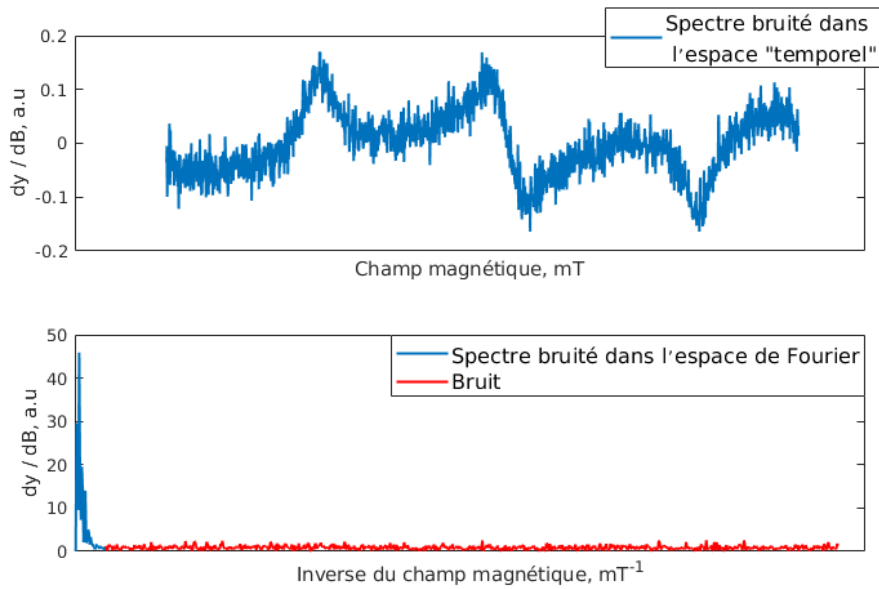


Figure 103 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ dans l'espace « temporel » (a), et dans l'espace des fréquences (b). Dans l'espace de Fourier, le bruit est tracé en rouge et on constate que le signal RPE se situe uniquement aux basses fréquences.

La première étape consiste donc à représenter le spectre RPE dans l'espace des fréquences. Il

s'agit d'une simple transformée de Fourier discrète
$$Y(k) = \sum_{x=1}^N y(x) e^{-2i\pi(k-1)\frac{x-1}{N}}, k \in [1; N]$$

des ordonnées $y(x)$ représentant le spectre RPE expérimental. Il existe plusieurs façons d'atténuer le bruit dans l'espace des fréquences (filtres Butterworth, Tchebychev de type I et II, Elliptique [Kunt, 1981, Bellanger, 1987, Boite & Leich, 1990, Blanchet & Charbit, 1998]). Nous avons cependant opté pour un filtre passe-bas idéal, simple mais radical qui consiste à fixer à 0 toutes les ordonnées de la zone de bruit (en rouge sur la figure 103 b). Quand on effectue ce type de filtrage, il est nécessaire de trouver la fréquence de coupure adéquate à partir de laquelle les signaux seront atténués. Si le choix de la fréquence de coupure n'est pas optimal, on risque d'atténuer une partie du signal et de générer des signaux « artefacts » non désirés qui perturberont l'analyse spectrale.

Le code développé au cours de cette thèse de doctorat est présenté en annexe (« 1.10 Codes développés au cours de la thèse »). Il permet de repérer automatiquement la fréquence de coupure adéquate. Appelons sp_{CN} le spectre RPE bruité, et sp_{CD} le spectre RPE débruité. Le principe du filtre passe-bas ainsi développé est le suivant :

1. Parcourir l'ensemble des fréquences de coupures possibles, appliquer le filtre passe-bas et effectuer une transformée de Fourier discrète inverse. On obtient ainsi un ensemble de spectres RPE débruités $\{sp_{CD}\}$ dans l'espace « temporel » ;
2. Calculer numériquement les résidus entre le spectre initial bruité sp_{CN} et le spectre débruité sp_{CD} . On obtient un N -ensemble de résidus $\{R\}_N$, N étant le nombre de fréquences de coupures parcourues ;
3. Comparer la distribution des résidus $\{R\}_N$ avec la distribution du bruit (« 1.10.4 Méthode de comparaison des densités de probabilité »). Les fréquences de coupures retenues sont celles qui offrent une compatibilité entre les deux distributions à 68 % minimum. Cette condition constitue notre **critère n°1** ;

Nous obtenons ainsi un ensemble de spectres RPE débruités validant le critère n°1. Reste à savoir quel spectre débruité choisir parmi l'ensemble retenu. Pour ce faire, nous avons développé un deuxième code qui choisit la fréquence de coupure optimale parmi celles retenues. Le principe est le suivant :

1. Générer une fonction gaussienne f_0 ayant une amplitude de l'ordre de grandeur de celle du signal d'intérêt du spectre RPE bruité spc_N (voir note ci-après). Cette fonction, nommée spc_0 , constitue notre référence ;
2. Ajouter du bruit sur f_0 de la même nature que celui caractérisé expérimentalement. Pour ce faire, on génère la densité de probabilité $N(\mu, \sigma)$, on effectue un tirage aléatoire de la variable aléatoire Y_i et la valeur y_i ainsi obtenue est ajoutée à $f_0(x)$. On obtient ainsi une fonction gaussienne f_N qui n'est autre que f_0 bruitée ;
3. Appliquer le filtre passe-bas défini précédemment sur f_N en utilisant seulement les fréquences de coupures retenues. Par conséquent, on obtient un ensemble de fonctions gaussiennes débruitées f_D . Ensuite, on calcule $g(x) = f_0(x) - f_D(x)$ pour chaque fonction f_D ainsi que $\|g\|_p = (|g(x_1)|^p + \dots + |g(x_N)|^p)^{\frac{1}{p}} = \max(g(x_1), \dots, g(x_N))$ avec $p \rightarrow \infty$, aussi appelée « norme infinie » ;
4. La fréquence de coupure optimale retenue est celle qui minimise la norme infinie. Cette condition constitue notre **critère n°2** ;

Le choix de la fonction gaussienne s'est révélé le plus pertinent au vu des résultats obtenus. D'une part, les signaux RPE des ongles (irradiés ou sains) ressemblent qualitativement à une fonction gaussienne (largeurs et amplitudes de raies). Le signal distribué en fréquence dans l'espace de Fourier permet une distinction claire des zones de bruit des zones de signal. De manière purement pragmatique, ce choix s'est donc révélé le plus performant. Nous avons tout de même testé d'autres types de fonctions. Pour ne citer qu'elle, nous avons également travaillé sur un modèle linéaire : on ajoutait le bruit expérimental sur une simple droite ($y = a$, avec a une constante) pour ensuite réduire le bruit dans l'espace de Fourier en trouvant la fréquence de coupure optimale. Or, la transformée de Fourier d'une droite est un dirac centré en 0. Ainsi, la fréquence de coupure optimale était systématiquement la plus faible fréquence de coupure validant le critère n°1. Elle n'était donc pas véritablement la plus optimale.

À titre d'exemple, voici à quoi ressemble le spectre de la figure 103 débruité :

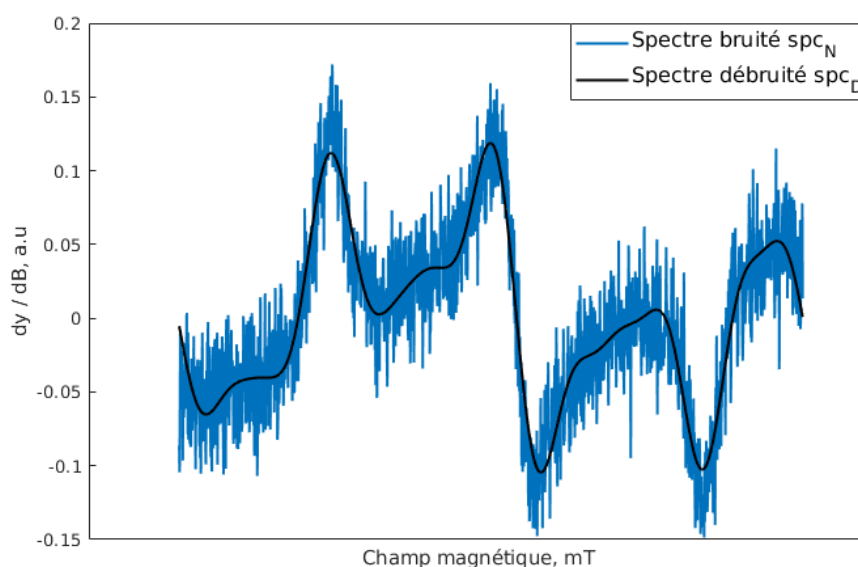


Figure 104 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ avant et après application du filtre passe-bas développé au cours de ce travail.

Le filtre passe-bas permet d'obtenir des spectres RPE débruités vérifiant les critères n°1 et 2. Le nombre d'étapes nécessaires pourrait sembler important, cependant cet outil numérique n'est composé que d'une dizaine de lignes de code et ne nécessite que quelques secondes pour débruiter un ensemble de spectres RPE. Il est cependant tout à fait possible d'optimiser ce code.

3.2 Lissage polynomial

Une approche pour réduire le bruit et augmenter le rapport signal sur bruit est l'utilisation de techniques de filtrage numérique telle que le lissage polynomial qui est intégré dans le logiciel Xenon de Bruker. Avant d'explicitier le principe, il est important de noter que, **par défaut, le mode de filtrage numérique est automatique dans la plupart des spectromètres commercialisés par Bruker.** Un spectre RPE acquis dans cette configuration ne permet pas d'obtenir les données brutes. L'objet de ce paragraphe est d'expliquer en quoi consiste le lissage polynomial d'un ensemble de données discrètes et donc pourquoi on ne doit pas l'activer quand on veut accéder aux données brutes dans le cadre d'une caractérisation expérimentale du bruit.

Considérons un spectre RPE quelconque défini par un ensemble de couples de coordonnées $\{x, y\}$ et un nombre k pair tel que $k \in \mathbb{N}$. Considérons maintenant l' i -ème ordonnée y_i du spectre. Le lissage polynomial consiste à pondérer l'ensemble des ordonnées à l'aide des coefficients polynomiaux ou coefficients de Pascal définis par $(1+x)^k$. Ces coefficients sont particulièrement adaptés aux lissages polynomiaux de fonctions gaussiennes (ou de leurs dérivées) [Aubury, 1995]. Pour $k=5$ par exemple, le lissage polynomial de y_i donnera :

$$y_i^{\text{lissé}} = \frac{(1 \cdot y_{i-2} + 4 \cdot y_{i-1} + 6 \cdot y_i + 4 \cdot y_{i+1} + 1 \cdot y_{i+2})}{1+4+6+4+1} \quad (35)$$

Ce type de lissage polynomial engendre une corrélation entre les variables aléatoires. En effet, la valeur de chaque ordonnée dépendra nécessairement des valeurs des ordonnées voisines. C'est précisément pour cette raison qu'il faut désactiver ce post-traitement numérique dans les spectromètres Bruker lorsqu'on veut caractériser le bruit expérimental. De plus, l'hypothèse ergodique n'est plus vérifiée. Pour illustrer ce fait, le couple (μ, σ^2) calculé après lissage polynomial (avec $k = 44$ comme le propose automatiquement le logiciel Xenon avec nos paramètres de mesure) dans le cadre de l'expérience décrite en « 2.2.1 L'hypothèse ergodique du bruit » vaut $(4,20 \cdot 10^{-3}, 6,56 \cdot 10^{-6})$ ou $(8,70 \cdot 10^{-3}, 1,51 \cdot 10^{-5})$ selon si l'analyse est faite pour l'ensemble des ordonnées de chaque abscisse ou pour l'ensemble des ordonnées d'un spectre donné. On perd ainsi toute l'information sur le bruit lorsqu'un tel traitement numérique est appliqué aux données brutes.

Dans le logiciel Xenon développé par Bruker, le choix du paramètre k est automatisé et est donné par le nombre de points par amplitude de modulation (il dépend donc des paramètres de mesures). Toutefois, il est possible de le changer manuellement si l'opérateur décide de quitter le mode automatique. Cette approche de lissage polynomial automatique a également été codée sous Matlab au cours de cette thèse. Cependant, le choix du paramètre k a été optimisé et il doit désormais vérifier les critères n°1 et 2 explicités dans la partie précédente (« 3.1 Filtre passe-bas automatisé »). La figure 105 est un exemple d'un lissage polynomial réalisé sur le spectre présenté en figure 103 :

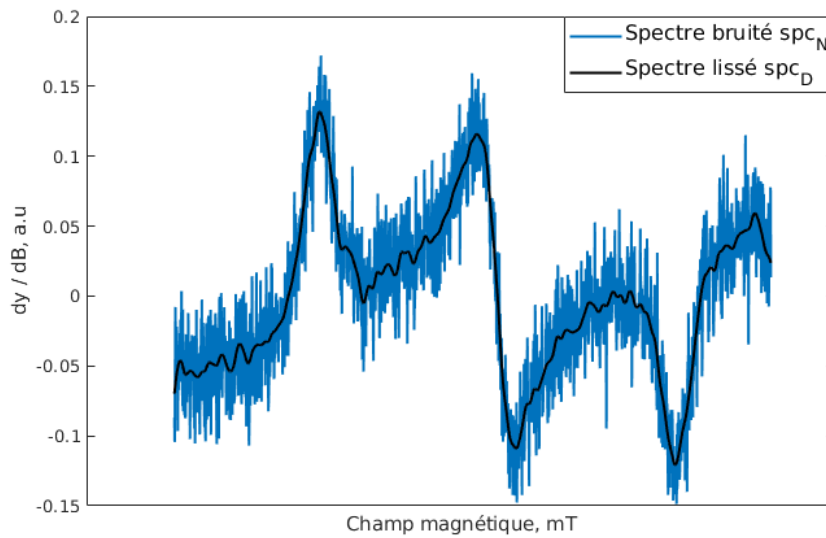


Figure 105 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ avant et après application du lissage polynomial développé au cours de ce travail.

Le lissage polynomial est intéressant car il permet, à l'instar du filtre linéaire passe-bas, d'atténuer le bruit des spectres RPE. Cependant, ce type de traitement a tendance à écrêter les signaux comme nous le verrons par la suite, ce qui est nuisible quant à l'extraction de certaines variables d'intérêt.

3.3 Réduction du degré polynomial

Nous avons vu dans la partie « 6.2.2 Les polynômes de Tchebychev « uniformes » » qu'il était possible de représenter un ensemble de données discrètes par un seul et unique polynôme dit « polynôme de Tchebychev » et ce, même s'il est échantillonné uniformément comme c'est systématiquement le cas en pratique. La fonction ainsi obtenue est un polynôme de degré N . Intuitivement, nous pourrions imaginer que la réduction du degré polynomial pourrait constituer une méthode de débruitage originale et fonctionnelle. En effet, considérons une simple droite $y=x+100$ qui constitue notre signal, et ajoutons du bruit gaussien tel qu'il a été caractérisé dans la partie « 2.1 Caractérisation théorique du bruit ». Si nous transformons ces deux spectres en polynômes de Tchebychev, alors d'une part, la droite est représentée par un polynôme de degré 1 et d'autre part, la droite bruitée est représentée par un polynôme de degré 100 dans le cas présenté sur la figure 106.

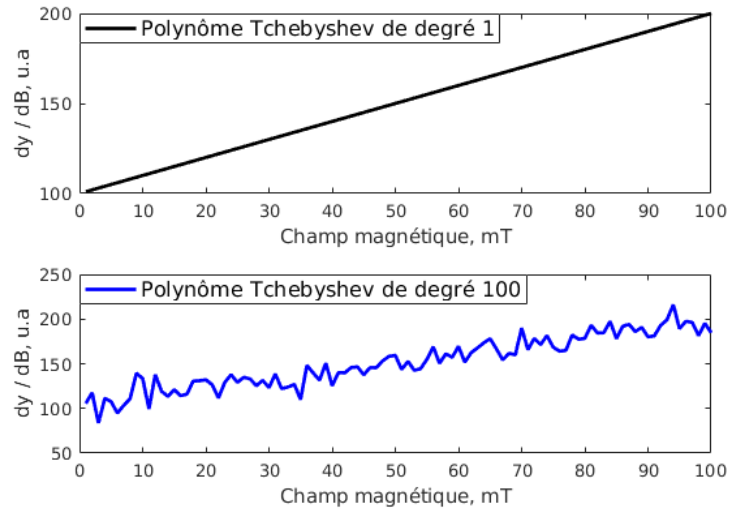


Figure 106 : Représentation d'une droite bruitée et non bruitée sous forme de polynôme de Tchebychev. Le polynôme associé à la droite non bruitée a un degré 1 tandis que celui de la droite bruitée a un degré de 100.

On comprend intuitivement que baisser le degré de ce dernier permettrait de se rapprocher du signal d'origine. C'est cette méthode originale que nous avons voulue développer au cours de ce travail de thèse et que je présente ici.

Considérons le même spectre bruité spc_N défini précédemment (figure 103). Le principe de débruitage par les polynômes de Tchebychev est le suivant :

1. Générer la fonction polynomiale de Tchebychev p_N représentative du spectre original bruité ;
2. Générer les polynômes $p_{N'}$ qui ne sont autres que p_N de degré inférieur tel que $N' < N$;
3. Calculer numériquement les résidus entre le spectre initial bruité spc_N et chacun des spectres débruités $spc_{D,N'}$. On obtient ainsi un $N-I$ -ensemble de résidus $\{R\}_{N'}$ pour chacun des degrés polynomiaux étudiés ;
4. Comparer la distribution des résidus $\{R\}_{N'}$ avec la distribution du bruit. Le polynôme « débruité » optimal est celui qui, d'une part, offre une compatibilité entre les deux distributions à 68 % minimum et d'autre part, possède le degré polynomial le plus faible.

Un exemple de ce débruitage original basé sur la diminution du degré polynomial des polynômes de Tchebychev est présenté dans la figure 107.

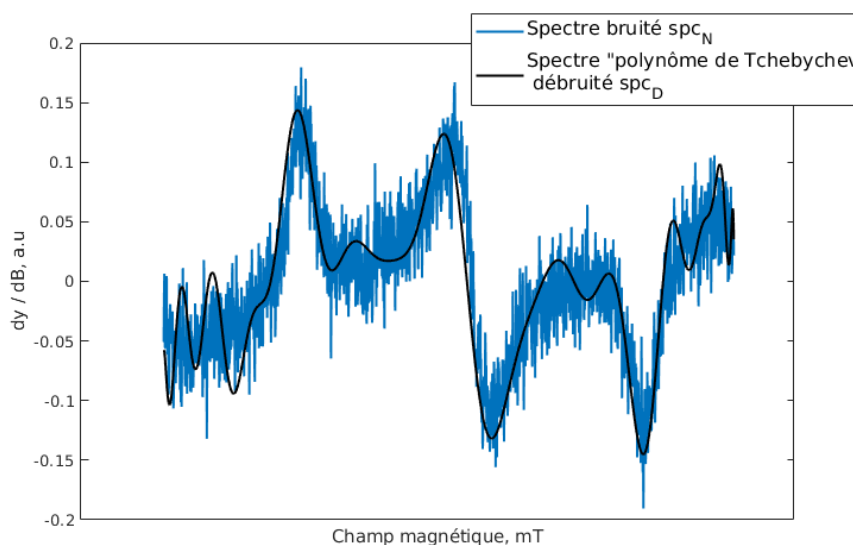


Figure 107 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ avant et après application du débruitage « Réduction degré polynomial » automatique développé au cours de ce travail.

Le polynôme de Tchebychev représentant le spectre original est un polynôme de degré 1760 et le spectre débruité est de degré 79. Si des résultats prometteurs ont d'ores et déjà été obtenus (figure 107), il est tout à fait possible d'améliorer cette méthode de débruitage originale développée en collaboration avec l'IRCP de Chimie-ParisTech. En effet, certaines pistes d'amélioration n'ont pas pu être entièrement développées dans le temps imparti (optimisation du degré du polynôme, critère d'auto-corrélation des résidus...). Nous restons toutefois optimistes quant à une amélioration prochaine de cette méthode de débruitage en spectroscopie RPE.

Les trois techniques de débruitage que sont le filtrage linéaire passe-bas, le lissage polynomial et la réduction du degré du polynôme de Tchebychev présentées ci-dessus peuvent s'appliquer aux spectres RPE. Maintenant reste à savoir laquelle de ces techniques est la plus avantageuse dans le cadre de la dosimétrie RPE. L'objectif est de s'affranchir autant que possible du bruit sans perdre l'information spécifique au signal RPE afin de pouvoir extraire les variables d'intérêt en dosimétrie RPE qui soient les plus fiables possibles.

3.4 Comparaison des méthodes de débruitage

3.4.1 Impact du débruitage sur les simulations spectrales

Lorsque nous voulons tester une hypothèse sur l'origine de l'espèce paramagnétique du spectre expérimental, nous avons recours à des simulations spectrales numériques. Dans le cadre de cette étude, c'est la boîte à outil *Easyspin* qui a été utilisée puisque, comme rappelé dans la partie « 6.1.2 Easyspin », cet outil a largement fait ses preuves dans la communauté RPE. L'objet de ce paragraphe est de comparer l'efficacité des trois méthodes de débruitage présentées dans ce chapitre quant à l'extraction des caractéristiques spectrales d'un spectre donné.

Dans un premier temps, un spectre RPE de basse symétrie, absolument quelconque, défini par les facteurs g suivants, $g_1 = 1,9950$, $g_2 = 2,0120$ et $g_3 = 2,0440$, présentant des couplages hyperfins tels que $a_1 = 0 \text{ MHz}$, $a_2 = 119,6665 \text{ MHz}$ et $a_3 = 31,3746 \text{ MHz}$ et une largeur de raie de 1 mT a été simulé. Sur la base des résultats précédents (« 2 Étude du bruit généré par le spectromètre RPE »), du bruit similaire au bruit généré par le spectromètre RPE a ensuite été ajouté sur ce spectre (figure 108).

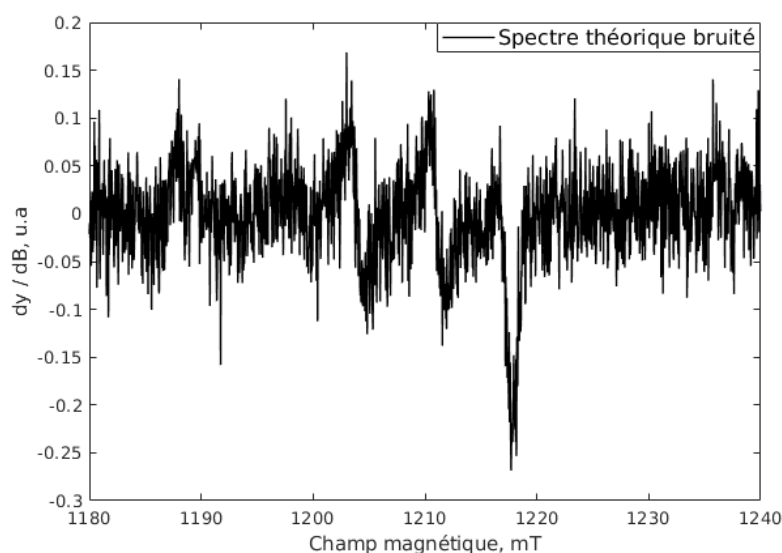


Figure 108 : Spectre RPE théorique bruité défini par $g_1 = 1,9950$, $g_2 = 2,0120$, $g_3 = 2,0440$, et présentant des couplages hyperfins tels que $a_1 = 0 \text{ mT}$, $a_2 = 7,25 \text{ mT}$ et $a_3 = 1,55 \text{ mT}$.

L'ensemble des scripts de débruitage (filtre linéaire passe-bas, lissage polynomial et réduction du degré des polynômes de Tchebychev) ont ensuite été appliqués afin d'obtenir trois spectres débruités. La figure 109 représente ces spectres ainsi que le modèle théorique.

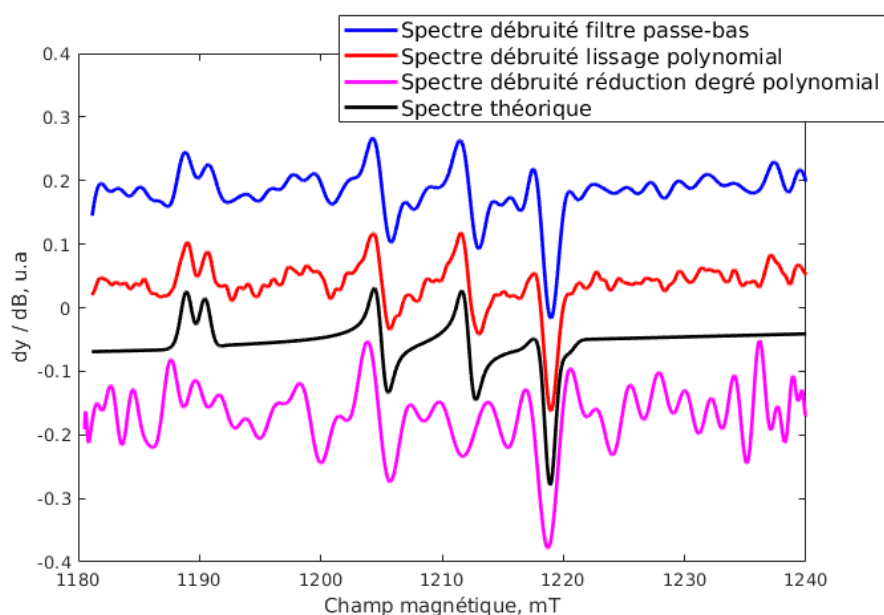


Figure 109 : Représentation des spectres RPE théorique (en noir) et débruités par la filtre linéaire passe-bas (en bleu), par le lissage polynomial (en rouge) et par la méthode de réduction du degré polynomial des polynômes de Tchebychev (en violet).

Lorsqu'on compare l'allure des spectres RPE débruités au modèle théorique (en noir dans la figure 109), on constate une différence d'efficacité des trois méthodes de débruitage. En effet, les méthodes de débruitage par transformée de Fourier (en bleu) et par lissage polynomial (en rouge) permettent d'obtenir des spectres débruités qualitativement similaires au modèle théorique (en noir). En revanche, la méthode originale de débruitage en réduisant le degré des polynômes de Tchebychev s'avère moins efficace. Le spectre résultant reste considérablement bruité ce qui complique amplement l'analyse spectrale. La réduction du degré polynomial impacte tout autant le bruit que le signal RPE et nous n'avons pas réussi à trouver de bons compromis à l'heure actuelle. L'écart maximal relatif (ou norme infinie, cf « 3.1 Filtre passe-bas automatisé ») entre les spectres débruités et le spectre théorique est de 6,0 % pour le filtrage linéaire passe-bas, 5,8 % pour le lissage polynomial et 14,66 % pour la méthode de réduction du degré du polynôme de Tchebychev. Dès lors, le filtrage linéaire passe-bas et le lissage polynomial semblent les plus efficaces.

Afin de vérifier si les méthodes de débruitage impactaient l'analyse spectrale (détermination des facteurs g , constantes de couplage hyperfin et largeurs des raies), des simulations spectrales ont été effectuées en testant différents paramètres spectraux tirés aléatoirement dans un intervalle de valeurs. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Synthèse des résultats sur l'analyse spectrale des spectres débruités.

	Valeurs originales	Méthode débruitage	Intervalle des paramètres spectraux testé	Valeurs obtenues avec simulation	Écart relatif
Facteur g (sans unité)	1,995	Polynôme	[1,985, 2,005]	Non exploitable	-
	2,012	FFT	[2,002, 2,022]	(1,995 ; 2,012 ; 2,044)	0 %
	2,044	Lissage	[2,034, 2,054]	(1,995 ; 2,012 ; 2,044)	0 %
Constant de couplage hyperfin (mT)	0	Polynôme	[0, 0,5] mT	Non exploitable	-
	7,25	FFT	[4,25, 10,25] mT	(0 ; 7,24 ; 1,78)	(0 % ; 0.1 % ; 15 %)
	1,55	Lissage	[0,55, 1,55] mT	(0 ; 7,24 ; 1,75)	(0 % ; 0.1 % ; 13 %)
Largeur des raies (mT)	1.00 mT (gaussienne)	Polynôme	[0, 2,00] mT	Non exploitable	-
		FFT		1,12	12 %
		Lissage		1,14	14 %

On constate que les techniques de débruitage par transformée de Fourier et par lissage polynomial permettent d'obtenir des paramètres spectraux similaires à ceux du modèle théorique. Cependant, le spectre débruité par la méthode originale de débruitage basée sur la réduction du degré des polynômes de Tchebychev n'a pas permis d'estimer correctement ces paramètres car le spectre résultant était bien trop bruité. Les spectres débruités par le filtre passe-bas et le lissage polynomial ont permis de retrouver exactement les facteurs g . Concernant les constantes de couplage hyperfin, le filtrage linéaire passe-bas et le lissage polynomial permettent d'obtenir des résultats similaires, soit à 15 % près du modèle théorique au maximum. Enfin, concernant les largeurs de raies, les résultats pour ces deux techniques de débruitage sont également similaires et elles permettent d'estimer les largeurs de raies originales à 14 % près au maximum. Dès lors, aucune de ces deux méthodes ne semble

vraiment se démarquer l'une de l'autre. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu étudier l'efficacité de ces deux méthodes en fonction du rapport signal sur bruit d'un spectre RPE.

3.4.2 Évaluation du rapport signal sur bruit le plus faible détectable

Nous avons montré dans le chapitre « IV Étude et caractérisation du signal endogène et des signaux radio-induits » que les intensités spectrales des signaux endogène *BKS* et radio-induit *RIS 5* dans les ongles étaient faibles ce qui complique l'extraction de l'information dosimétrique. Ainsi, l'objet de cette étude est de déterminer la limite de détection d'un signal RPE du même type que le *RIS 5* en bande Q à l'aide des deux moyens de débruitage retenus à savoir le filtre linéaire passe-bas et le lissage polynomial. La méthode de débruitage la plus efficace sera conservée dans l'optique de développer un protocole opérationnel de traitement de spectres RPE d'ongles irradiés.

Dans un premier temps, nous avons simulé un spectre RPE de semiquinone (« 3.1 Le signal radio-induit *RIS 2* ») nommé spc_0 . Sur la base des résultats de l'étude « 2 Étude du bruit généré par le spectromètre RPE », nous avons ajouté du bruit au spectre théorique et le spectre résultant est nommé spc_N . La procédure employée pour déterminer la limite de détection du signal d'intérêt a été la suivante :

1. Calculer le rapport signal sur bruit (*RSB*) du spectre spc_N (le *RSB* est défini comme le rapport entre l'amplitude du signal et l'écart-type de la distribution de l'amplitude du bruit) ;
2. Débruiter le spectre à l'aide du script *Filtre passe-bas* ou *Lissage Polynomial*. On obtient ainsi deux types de spectres débruités, spc_D , selon la méthode utilisée ;
3. Calculer les écarts relatifs en amplitudes, largeur de raie et en intensité entre le spectre débruité spc_D , et le spectre théorique spc_0 dans la zone du signal d'intérêt ;
4. Diminuer l'intensité du signal du spectre original spc_0 en conservant exactement les mêmes valeurs de bruit et recommencer l'étape 1 jusqu'à ce que le signal soit confondu dans le bruit ($RSB=1$).

La figure 110 récapitule l'ensemble de ces étapes :

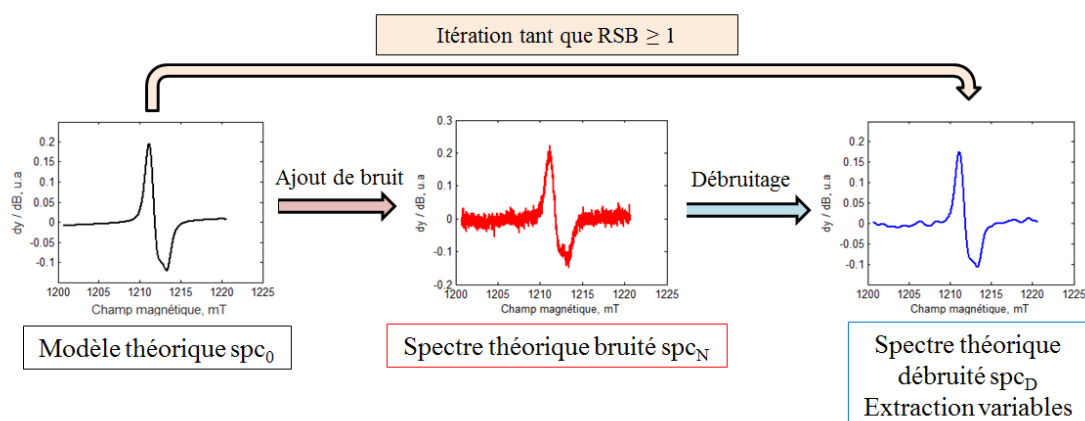


Figure 110 : Schéma explicatif de l'étude du plus faible rapport signal sur bruit détectable avec les deux procédures de débruitage présentées et développées au cours de ce travail.

Les résultats pour le filtrage linéaire passe-bas et le lissage polynomial sont présentés dans la figure 111.

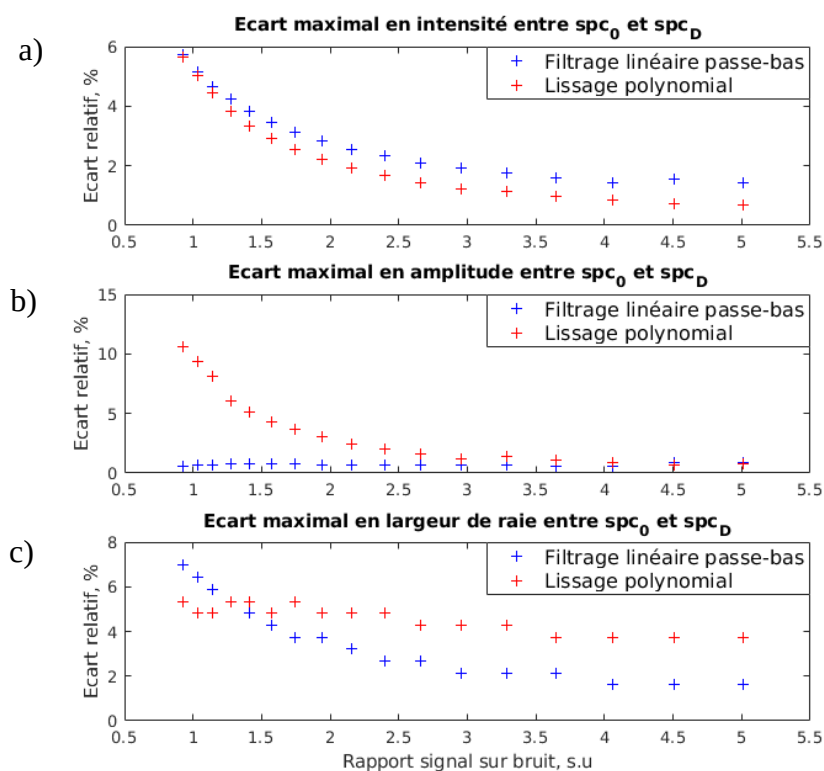


Figure 111 : Étude de la limite de détection des deux méthodes de débruitage : écart maximal relatif en fonction du rapport signal sur bruit pour l'intensité (a), pour l'amplitude (b) et pour la largeur de raie (c).

Plus le rapport signal sur bruit est faible, plus il est compliqué d'extraire correctement la variable d'intérêt (amplitude pic à pic, largeur de raie ou intensité). Ce résultat est intuitif puisque dans le cas où les intensités des signaux RPE sont du même ordre de grandeur que le bruit, il devient compliqué de les distinguer. Concernant l'estimation de l'intensité spectrale du signal RPE, le débruitage par transformée de Fourier et par lissage polynomial sont aussi performantes : pour un rapport signal sur bruit de 1, ces deux techniques permettent d'estimer une intensité spectrale à 6 % près de celle théorique. En revanche, concernant les amplitudes du signal RPE, on constate que le filtrage linéaire passe-bas est significativement plus efficace que le lissage polynomial. En effet, les algorithmes de lissage agissent en remplaçant chaque valeur mesurée par une moyenne pondérée par les valeurs adjacentes. On assiste ainsi à un phénomène d'écrtage clairement visible dans la figure 111 b. Pour un RSB de 1, l'écart relatif en amplitude entre le modèle théorique et le spectre lissé est supérieur à 10 % après lissage polynomial contre 0,6 % pour le filtrage passe-bas. Enfin, concernant la largeur de raie, l'écrtage du signal RPE engendre systématiquement un léger élargissement de la raie à hauteur de 4 à 5 % par rapport au modèle théorique.

L'ensemble de ces résultats montre que la méthode de débruitage la plus efficace dans le cadre de notre étude est le filtrage linéaire passe-bas par transformée de Fourier. Il nous est possible d'extraire une intensité spectrale, une largeur d'une raie ou une amplitude pic à pic à 5 % près du spectre théorique dès lors que le rapport signal sur bruit est supérieur à 1,3. Le problème majeur du lissage polynomial réside dans l'écrtage des signaux conduisant à une sous-estimation des amplitudes pic à pic ou des largeurs de raies.

Le filtrage linéaire passe-bas par transformée de Fourier est donc la méthode de débruitage qui sera implémenté dans le protocole numérique puisqu'elle s'est révélée la plus efficace pour extraire les intensités, les amplitudes et les largeurs de raies.

4 Processus d'extraction des variables d'intérêt

Dans les parties précédentes, nous avons présenté les différentes méthodes de débruitage développées et automatisées dans le cadre de ce travail. La transformation de données discrètes en fonctions continues a également été abordée et permet une extraction immédiate et juste des variables d'intérêt en spectroscopie RPE. Dans le cadre de la collaboration menée avec l'IRCP de Chimie-ParisTech, et notamment avec Yann Le Du et Mariem El Afrit, un ensemble de scripts ont été développés et permettent de traiter tout type de spectre RPE pour la dosimétrie de rayonnement ionisants. Les différentes étapes du traitement numérique seront explicitées dans une première partie, puis une évaluation de la reproductibilité d'extraction des variables sera également présentée. Enfin, un exemple d'étude dosimétrique appliquée à la dosimétrie RPE sur les ongles permettra de juger de l'efficacité de l'outil.

4.1 Étapes du traitement numérique

Afin d'illustrer les différentes étapes du traitement numérique, il me semble plus judicieux de les présenter en les appliquant sur un spectre RPE réel d'ongle. En ce sens, la figure 112 représente un spectre expérimental d'un ongle non irradié. En effet, plus l'ongle aura été soumis à des rayonnements ionisants, plus la quantité de radicaux libres radio-induits sera importante, et plus le rapport signal sur bruit sera important. Ainsi, l'étude d'un ongle sain semble le plus intéressant pour juger de la pertinence du débruitage.

La première étape consiste, tout simplement, à faire l'acquisition spectrale en prenant garde de désactiver tout traitement numérique automatique du spectromètre. Il serait effectivement mal venu de débruiter un spectre ayant préalablement subi un quelconque traitement de débruitage sous-jacent. Il n'est pas non plus nécessaire d'accumuler le nombre d'acquisitions étant donné que le spectre sera débruité par la suite. Pour rappel (« 3.3 Les paramètres d'acquisition ») plus le nombre d'acquisitions est élevé, plus le spectre est lisse et plus le délai nécessaire pour obtenir le spectre est long ; or, en dosimétrie des rayonnements ionisants en cas d'accident radiologique, nous voulons aller le plus rapidement possible.

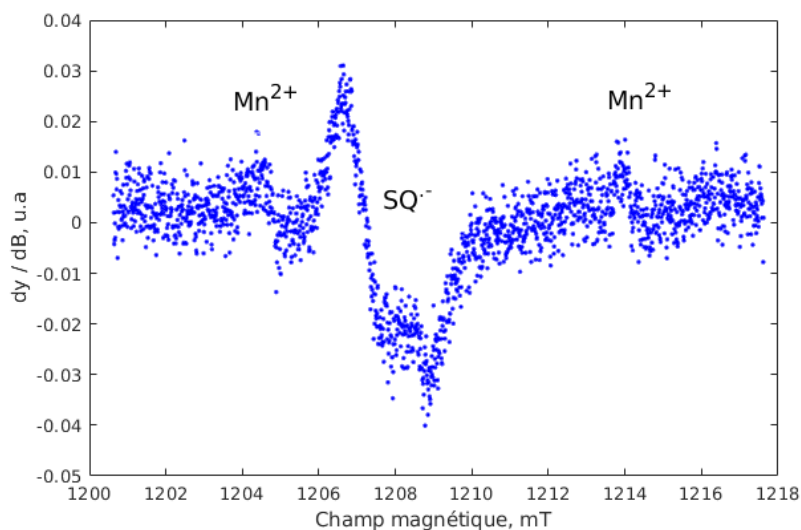


Figure 112 : Spectre RPE expérimental d'un ongle sain. On retrouve le signal d'intérêt de type semiquinone anionique SQ^- ainsi que le signal parasite manganèse Mn^{2+} .

Nous avons vu dans la partie précédente que dans le cadre de notre étude, le filtre linéaire passe-bas constitue la méthode de débruitage la plus efficace. L'automatisation de ce traitement permet de rechercher la fréquence de coupure la plus optimale pour un spectre donné et ce, à la fois rapidement et non-opérateur dépendant. Après un tel traitement, nous obtenons le spectre initial débruité comme présenté en figure 113.

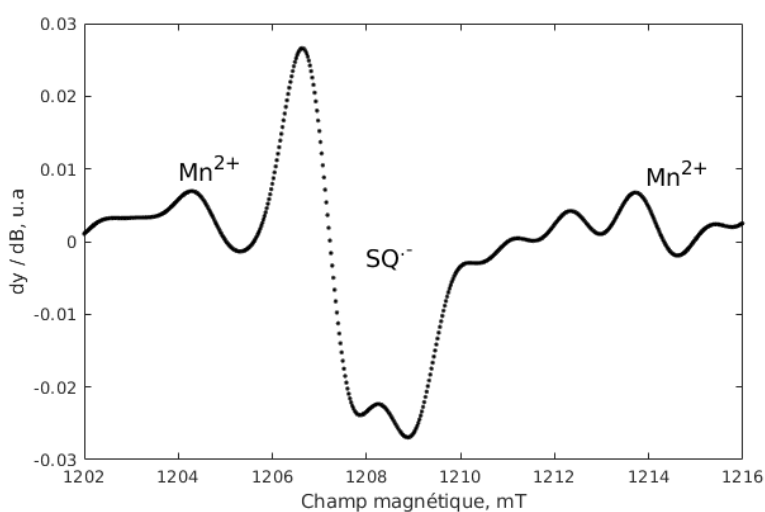


Figure 113 : Spectre RPE débruité par filtre linéaire passe bas du spectre RPE brut d'un ongle sain. On retrouve toujours le signal d'intérêt de type semiquinone anionique SQ^- ainsi que le signal parasite manganèse Mn^{2+} .

Vient ensuite l'étape de la transformation des données discrètes représentant le spectre RPE débruité en fonctions polynomiales dites de Tchebychev. Nous utilisons donc la boîte à outil *Chebfun* de Matlab et plus particulièrement l'algorithme d'interpolation d'Hormann-Floater implémenté par Georges Klein en 2011 (« 6.2.2 Les polynômes de Tchebychev « uniformes »). Pour rappel, cette option permet de générer les polynômes de Tchebychev uniques à partir d'ensembles de données discrètes échantillonnées uniformément comme le montre la figure 114 tout en préservant l'information initiale à la précision machine près.

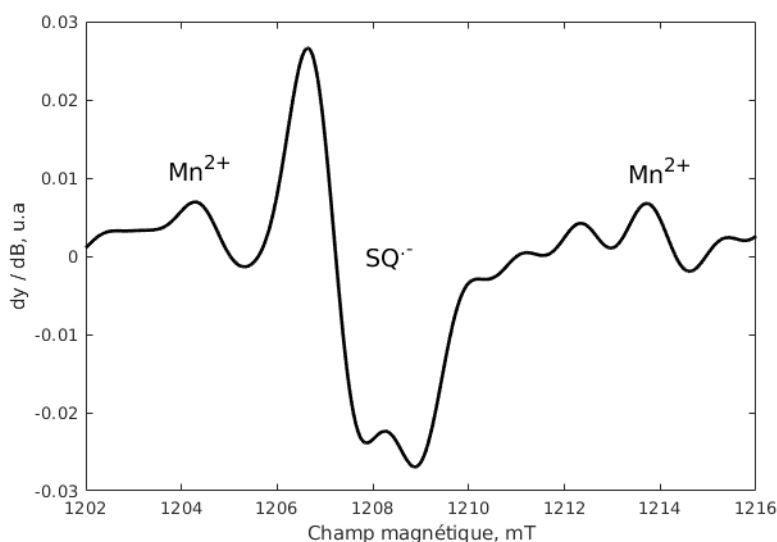


Figure 114 : Polynôme de Tchebychev représentant le spectre RPE débruité présenté dans la figure 113.

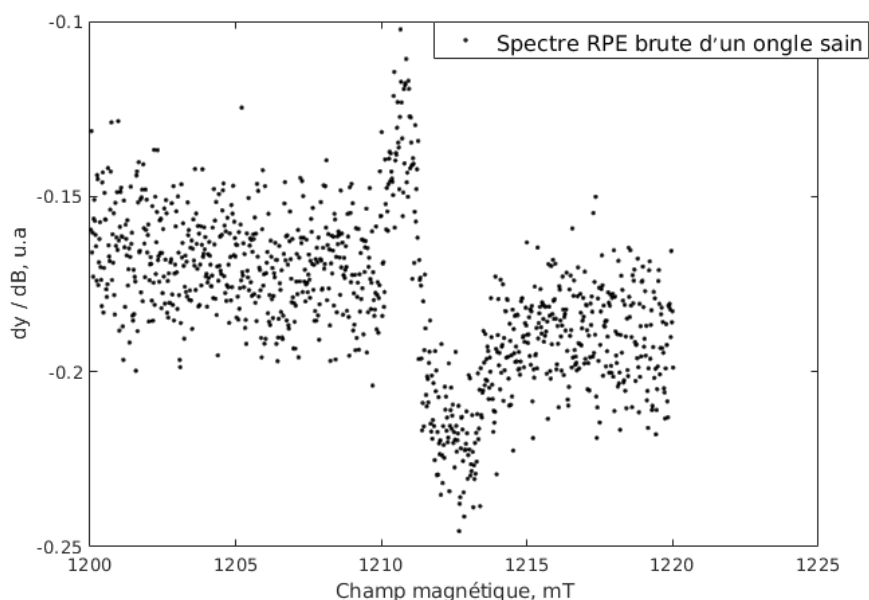
Enfin, les scripts Matlab permettant de manipuler les polynômes de Tchebychev développés au cours de cette thèse sont présentés en annexe (« 1.10 Codes développés au cours de la thèse »). Il nous est alors possible de récupérer rapidement les caractéristiques spectrales souhaitées. En ce qui nous concerne, l'objectif est de relier la quantité d'entités paramagnétiques radio-induites à la dose absorbée. En ce sens, les variables d'intérêt sont les amplitudes des signaux radio-induits ainsi que leurs intensités spectrales respectives, i.e les aires sous les courbes d'absorption.

4.2 Évaluation de la pertinence du protocole numérique

En dosimétrie RPE sur les ongles, il est généralement nécessaire d'accumuler un ensemble de 8 à 15 acquisitions d'un même spectre pour atténuer le bruit (« 3.3.3 Le nombre d'acquisitions »). Le spectre RPE moyenné ainsi obtenu rend possible l'extraction manuelle des amplitudes et intensités des signaux radio-induits indispensables à l'élaboration des courbes de réponse en dose. Notons que l'estimation des intensités spectrales (aires sous les courbes d'absorption) reste cependant très rare car ce processus manuel nécessite à la fois une certaine maîtrise du logiciel du spectromètre mais est également relativement long. Le temps est effectivement un paramètre crucial dans le domaine de la dosimétrie d'accident : tout l'enjeu réside dans la détermination de la dose reçue par un individu qui soit le plus fiable et le plus rapidement possible afin d'administrer le traitement médical adéquat et ce, dans les plus brefs délais.

Restons dans le cas de domaine la dosimétrie RPE des ongles. Une acquisition spectrale dure en moyenne entre 30 secondes et 1 minute. Ainsi, l'acquisition d'un spectre RPE exploitable manuellement requière une durée comprise entre 4 et 15 minutes pour 8 à 15 acquisitions spectrales (bien sûr, tout dépend du rapport signal sur bruit du spectre expérimental). La démarche proposée ici est de ne réaliser qu'une seule et unique acquisition de 40 secondes et d'appliquer le protocole de débruitage et d'extraction des variables d'intérêt, en l'occurrence les amplitudes des raies et les intensités spectrales.

Avant d'appliquer le traitement numérique automatique développé dans le cadre de ce travail sur un exemple concret de dosimétrie RPE, vérifions la répétabilité d'extraction des variables d'intérêt sur 12 spectres RPE successifs et indépendants d'un même ongle sain. Il est plus pertinent de s'intéresser à un ongle sain ici plutôt qu'à un ongle irradié car le rapport signal sur bruit d'un ongle non irradié est bien plus faible et permettra de « challenger » le protocole numérique développé au cours de ce travail. La figure 115 représente donc le spectre RPE d'un échantillon d'ongle obtenu à la suite d'une seule et unique acquisition de 40 secondes en désactivant au préalable tout pré-traitement numérique du spectromètre (dans le but de récupérer uniquement les données brutes).



Le protocole développé dans le cadre de ce travail et présenté dans la partie précédente (« 4.1 Étapes du traitement numérique ») a ensuite été appliqué à l'ensemble des 12 spectres. Les résultats sont présentés dans la figure 116 et le tableau 15.

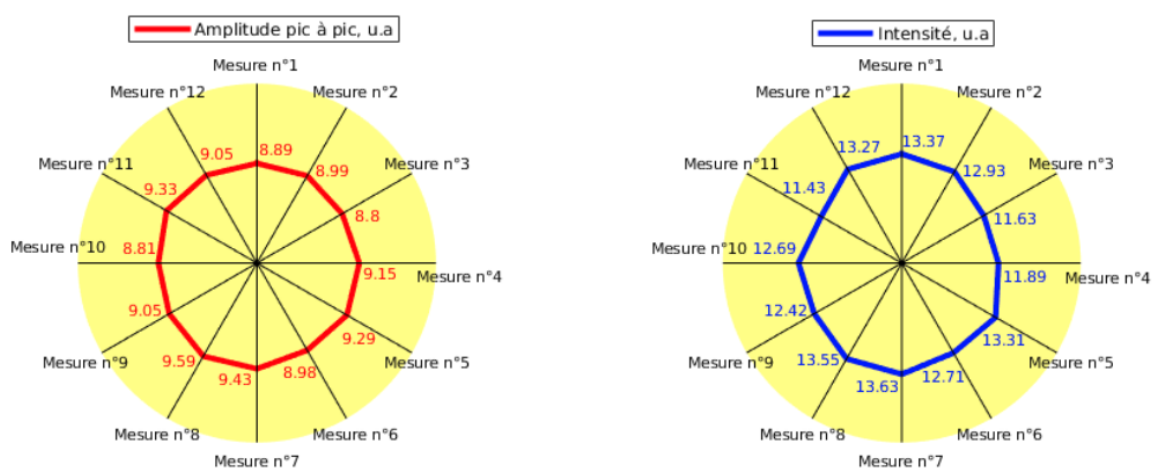


Figure 116 : Représentation des variables d'intérêt (amplitude pic à pic en rouge, intensité en bleu) sous forme de diagramme « araignée ». Les amplitudes du signal et les intensités sont calculées automatiquement à l'aide du protocole numérique développé au cours de ce travail de thèse.

Tableau 15 : Estimation des amplitudes et des intensités du signal d'intérêt de 12 spectres RPE bruts, successifs et indépendants. Les variables considérées ont été calculées automatiquement à l'aide du protocole numérique développé au cours de ce travail de recherche.

Observable	Valeur moyenne et écart-type associé (u.a)
Amplitude pic à pic, H	$\langle H \rangle = 0,0911$ et $\sigma_H = 0,0030$
Intensité du signal, I	$\langle I \rangle = 0,1274$ et $\sigma_I = 0,0076$

Le diagramme de la figure 116 représente les amplitudes et les intensités du signal d'intérêt des 12 spectres RPE bruts. La valeur moyenne et l'écart-type associés à ces mesures sont présentés dans le tableau 15. Calculons l'incertitude de répétabilité associée à la valeur moyenne de l'amplitude et de l'intensité (équation 36). Le nombre de mesures étant limité, il est nécessaire d'introduire un facteur d'élargissement, noté k (et également appelé coefficient de Student défini en annexe « 1.11 Facteur de Student k »). Ce coefficient dépend du nombre de mesures, ici $n = 12$, et de l'intervalle de confiance choisi (ici 95 %). Dans ces conditions, le coefficient de Student vaut $k = 1,782$.

$$\sigma_{\text{rép}} = k \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (36)$$

Avec k le coefficient de Student, σ l'écart-type associé au résultat et

n le nombre de mesures

On obtient ainsi une incertitude élargie de répétabilité de 2,96 % pour l'estimation des amplitudes et de 5,44 % pour les intensités spectrales. Ce résultat est prometteur. En effet, à l'aide d'une seule et unique acquisition spectrale, nous sommes en mesure d'estimer les variables d'intérêt avec une incertitude de répétabilité d'environ 5 % ce qui n'est pas envisageable lors d'un traitement manuel d'un spectre aussi bruité que celui de la figure 115.

Considérons maintenant la problématique du temps d'analyse. La durée nécessaire pour traiter entièrement chacun des spectres à l'aide de l'outil numérique est d'environ 15 secondes et ce, en utilisant un ordinateur portable quelconque. L'utilisation de serveurs de calculs performants permettrait de les estimer encore plus rapidement. Admettons maintenant que nous voudrions traiter manuellement ces 12 spectres et obtenir les intensités et les amplitudes du signal radio-induit. Il serait nécessaire d'effectuer pour chacun d'entre eux 10 acquisitions de 40 secondes soit une durée d'environ 7 minutes. Pour l'ensemble des 12 spectres, la durée totale d'acquisition est estimée à 1 heure et 20 minutes. La détermination

manuelle de l'amplitude pic à pic du signal, bien qu'opérateur-dépendante, est très rapide : environ une dizaine de secondes. En revanche, la transformation du spectre RPE en sa primitive (spectre d'absorption) et le calcul de l'aire sous la courbe nécessite un peu plus de temps, environ 1 minute pour un utilisateur rapide et expérimenté. Ainsi, le temps nécessaire pour l'extraction des 24 variables (intensités et amplitudes) serait approximativement de 15 minutes. Au total, la durée nécessaire pour analyser manuellement ces 12 spectres serait d'environ 1 heure et 30 minutes. En revanche, si on acquiert les spectres RPE avec seulement une seule et unique acquisition de 40 secondes, il faudrait 8 minutes pour tous les acquérir. Le traitement numérique des spectres et l'extraction des 24 variables au total nécessiterait seulement 3 minutes. L'approche proposée ici pour l'analyse spectrale dans le domaine de la dosimétrie RPE permettrait donc un gain de temps considérable (facteur 7 à 8) qui pourrait être réinvesti ailleurs.

Ce protocole numérique peut toutefois être optimisé et la possibilité d'y intégrer des routines différentes selon les besoins (calculs des facteurs g , constantes de couplage hyperfin, spectre d'absorption...) est tout à fait envisageable. Une fois implémenté à l'IRSN, ce protocole permettra un gain de temps considérable dans l'évaluation des faibles doses avec l'alanine pour la dosimétrie de criticité mais également un gain certain dans la limite de détection. Il pourra également être utilisé pour les calculs de doses en dosimétrie RPE sur les os, les dents et les verres dans le cas d'accidents radiologiques de grande ampleur pour le tri de population. En effet il est fondamental d'être à la fois rapide et performant d'un point de vue opérationnel.

Le protocole numérique développé au cours de cette thèse de doctorat permet d'extraire rapidement les variables nécessaires à l'élaboration de courbes de réponse en dose, et ce de manière non-opérateur dépendant. Il est également possible d'obtenir les intensités spectrales qui, en règle générale, ne sont pas calculées par faute de temps.

Le protocole numérique de traitement des spectres RPE développé ici permet d'augmenter les capacités de mesure et de performance opérationnelles du laboratoire en dosimétrie RPE.
--

4.3 Application sur un exemple concret d'étude dosimétrique

Nous venons de voir que le nouveau protocole pour le traitement numérique des spectres RPE permet une extraction reproductible des variables d'intérêt en dosimétrie RPE. Ce processus est à la fois rapide, fiable et non-opérateur dépendant. L'objet de cette dernière partie est d'illustrer l'intérêt de ce protocole par rapport à un traitement manuel sur un cas beaucoup plus concret : générer les courbes représentant la variation des amplitudes du signal UV-induit *UVIS 5* (« 2.2.7 L'impact du rayonnement UV sur le signal endogène BKS ») avec le temps d'exposition aux rayonnements UVA. Le traitement manuel des spectres a été réalisé directement via l'interface graphique du logiciel Bruker (XEPR) directement sur les spectres bruts.

La génération du signal *UVIS 5* nécessite d'exposer l'échantillon d'ongle à un rayonnement UVA, et ce pour différentes durées. Une lampe UV qui génère des ondes électromagnétiques de 365 nm à 1,2 mW.cm⁻² a été utilisée pour cette expérience. Les intensités et amplitudes du signal *UVIS 5* ont été normalisées par celles du signal endogène afin de rendre compte de l'augmentation du signal UV-induit. Les paramètres d'acquisition sont répertoriées dans le tableau 17 de l'annexe « 1.12 Paramètres d'acquisition des spectres RPE pour l'élaboration des courbes de réponse en dose UV ». Enfin, les résultats concernant l'évolution du signal UV-induit avec la durée d'exposition sont présentés dans le tableau 16 et la figure 117

Tableau 16: Modèle théorique représentant l'évolution du signal *UVIS 5* avec le temps d'exposition aux UVA selon le mode de traitement spectral (manuel ou automatique).

Traitement	Modèle : $f(t) = a(1 - \exp^{-\frac{t}{b}}) + c$ avec t le temps d'exposition aux UVA et $f(t)$ l'amplitude pic à pic du signal <i>UVIS 5</i>			
	a	b	c	R^2
Manuel 1	1.032 ± 0.271	15.693 ± 11.181	0.923 ± 0.188	0.786
Manuel 2	1.241 ± 0.313	17.515 ± 11.997	0.979 ± 0.204	0.812
Automatique	0.889 ± 0.082	17.687 ± 4.428	0.984 ± 0.053	0.973

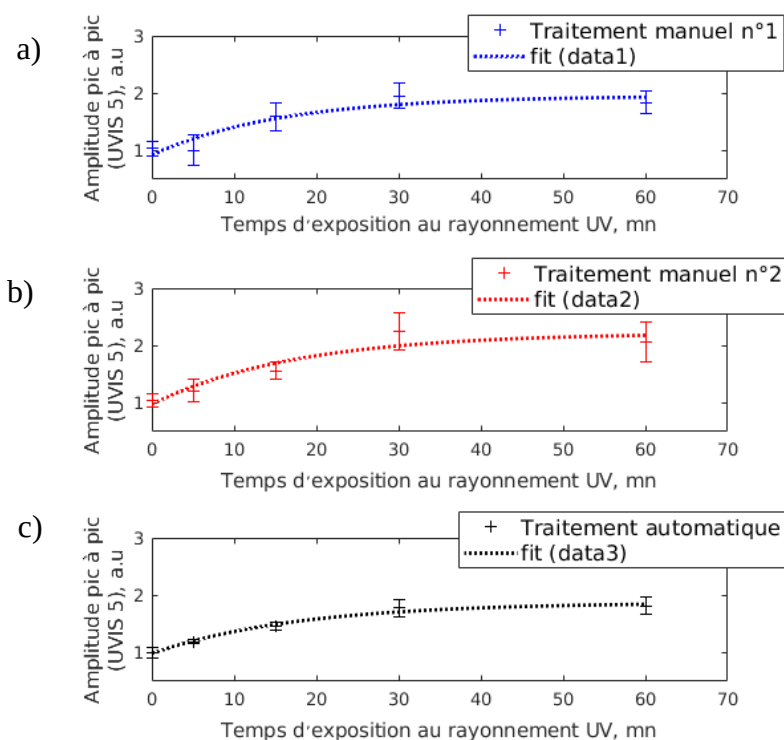


Figure 117 : Evolution de l'amplitude pic à pic du signal UV-induit stable, l'UVIS 5, avec la durée d'exposition aux UVA artificiels. a) et b) Traitements manuels via l'interface graphique du logiciel XEPR de Bruker. c) Traitement automatique via l'outil numérique développé au cours de ce travail de thèse. Les amplitudes ont été normalisées par celles du signal endogène.

L'amplitude pic à pic du signal *UVIS 5* augmente avec le temps d'exposition aux rayonnements UVA comme nous l'avons montré dans la partie « 2.2.7 L'impact du rayonnement UV sur le signal endogène BKS ». Nous remarquons également que les incertitudes relatives de mesure sont significativement plus importantes lors du traitement manuel (environ 15 % pour les deux opérateurs) qu'avec l'outil numérique (environ 7 %). En effet, le spectre RPE résultant d'une unique acquisition est très bruité ce qui complique l'extraction manuelle de l'amplitude du signal. Ainsi, le processus de débruitage implémenté dans l'outil numérique permet d'atténuer considérablement le bruit et donc les incertitudes de mesures associées aux variables d'intérêt. Sans ce processus, il faudrait réaliser davantage d'acquisitions d'un même échantillon pour améliorer le rapport signal sur bruit. Cela augmenterait également considérablement la durée nécessaire à l'élaboration de ces courbes de réponse en temps d'exposition UVA. De plus, le modèle théorique de type

$f(t) = a(1 - \exp^{-\frac{t}{b}}) + c$ reproduit fidèlement l'allure de l'évolution de l'amplitude du

signal *UVIS 5* avec le temps d'exposition aux rayonnements UVA. Le coefficient de détermination R^2 qui permet une estimation de la qualité du modèle théorique à reproduire les données expérimentales est estimé à 0,786 et 0,812 pour les traitements manuels contre 0,973 pour le traitement automatisé. En ce sens, le traitement automatique est plus performant que le traitement manuel des spectres RPE.

Enfin, la transformation des données discrètes en fonctions polynomiales (polynômes de Tchebychev) permet une estimation objective de ces variables. Au bilan, il est possible d'harmoniser les résultats. L'analyse globale de l'ensemble des spectres RPE est réalisée en seulement quelques minutes (environ 5 minutes à l'aide d'un ordinateur portable quelconque) et ne nécessite qu'une seule et unique acquisition spectrale. Comme nous l'avons souligné dans la partie précédente (« 4.2 Évaluation de la pertinence du protocole numérique »), ce protocole numérique permet un gain de temps non négligeable pour l'opérateur mais également une harmonisation des résultats.

L'exemple traité dans cette partie a permis d'illustrer l'utilité du protocole de traitement numérique des spectres RPE dans le cadre de la dosimétrie des rayonnements ionisants. L'avantage majeur de ce protocole par rapport à un traitement manuel ou d'algorithmes faits maison repose sur l'utilisation des polynômes de Tchebychev qui permettent de générer une seule et unique fonction polynomiale à partir de données discrètes. L'analyse de telles fonctions est élémentaire et surtout non-opérateur dépendante. On pourrait imaginer un partage de cet outil à l'échelle nationale afin d'harmoniser les résultats d'analyses dosimétriques RPE. Les études d'inter-comparaison en dosimétrie ne seraient plus affectées par l'analyse des données mais seulement par les mesures expérimentales.

5 Conclusions et perspectives

L'objectif de ce chapitre était de présenter une nouvelle approche, à la fois plus rapide, plus fiable et non-opérateur dépendante, pour traiter les spectres RPE, notamment dans le cadre de la dosimétrie des rayonnements ionisants.

La première étape consistait à passer d'une représentation discrète des spectres RPE à une représentation continue. Pour ce faire, nous avons montré que l'outil *Chebfun* permet de représenter un ensemble de données discrètes par une unique fonction polynomiale si l'échantillonnage a été effectué sur les nœuds de Tchebychev. En règle générale, l'échantillonnage étant uniforme, il est possible de générer ces fonctions soit à l'aide du « Relativistic Sampling Principle » [Le Du, 2018], soit de l'algorithme d'Hormann-Floater [Floater & Hormann, 2007]. Il est plus avantageux de travailler sur des fonctions mathématiques plutôt que sur des données discrètes car leur manipulation (dérivation, intégration, détermination d'extrêma...) est à la fois simple, rapide et ne dépend aucunement de l'opérateur. De plus, l'utilisation des polynômes de Tchebychev ne nécessite que quelques centaines de points échantillonnés pour représenter de manière robuste le spectre RPE expérimental. Afin d'avoir un spectre expérimental de qualité similaire, il serait nécessaire de réaliser une acquisition spectrale de plusieurs milliers de points. Or, en réduisant ce paramètre en routine, la durée nécessaire aux acquisitions spectrales est amoindrie.

La seconde étape consistait à étudier et comprendre l'origine du bruit généré par le spectromètre RPE. Nous avons montré que théoriquement, si le bruit RPE était principalement dû au comptage des photons par le détecteur synchrone, alors la variable aléatoire Y_n qui représente le nombre de photons détectés lors d'une expérience de spectroscopie RPE devrait suivre une densité de probabilité binomiale $Y_n \rightarrow \mathfrak{B}(n, p)$ approximable par une loi normale de type Poisson $Y_n \rightarrow N(np, \sqrt{np})$ (pour rappel, n est le nombre de photons, et p la probabilité qu'ils soient détectés). Nous avons montré expérimentalement que les mesures brutes en spectroscopie RPE suivent une densité de

probabilité normale $N(\mu, \sqrt{\alpha \cdot \mu + \beta})$ différente de celle attendue. Il semblerait qu'il y ait une source de bruit supplémentaire, a fortiori généré par les composants électroniques (diode, interférences électriques) ou bien par l'environnement. À l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer l'origine de ce phénomène, toutefois on remarque que le coefficient multiplicatif α agit comme un gain sur les mesures RPE effectuées. Concernant le coefficient β , il pourrait s'agir d'une correction automatique de la ligne de base. Toutefois, nous avons également montré une méthode simple et rapide pour extraire les composantes (μ, σ) du bruit généré par le spectromètre basé sur le principe ergodique : il suffit d'isoler une zone plate et bruitée du spectre expérimental et de calculer la moyenne des ordonnées et l'écart-type associé. Ce résultat a permis d'élaborer et de valider trois techniques de débruitage.

La troisième étape a consisté à programmer, optimiser et automatiser trois techniques de débruitage : deux conventionnelles, le filtre linéaire passe-bas et le lissage polynomial, et une originale basée sur la réduction du degré polynomial des polynômes de Tchebychev. Après avoir développé et automatisé ces techniques, un comparatif des méthodes a été réalisé sur des spectres RPE bruités avec différents rapports « signal sur bruit ». Dans notre cas particulier en dosimétrie RPE, le filtrage linéaire passe-bas s'est révélé le plus efficace. Il est possible d'extraire l'intensité d'un signal, la largeur d'une raie ou une amplitude pic à pic à 5 % près du modèle théorique dès lors que le rapport signal sur bruit est supérieur à 1,3. D'autres méthodes telles que le débruitage par ondelettes par exemple n'ont pas été développées et constituent d'intéressantes perspectives pour éventuellement améliorer le protocole présenté. Il serait également intéressant de poursuivre l'étude sur le débruitage par les polynômes de Tchebychev car certaines pistes n'ont pas pu être explorées dans le temps imparti.

Enfin, la quatrième et dernière étape consistait à proposer une nouvelle approche de traitement numérique des spectres RPE afin d'extraire rapidement les variables nécessaires à l'élaboration de courbes de réponse en dose et ce, de manière non-opérateur dépendante. Nous avons montré qu'il est possible d'obtenir les intensités spectrales qui, en règle générale, ne sont pas calculées par faute de temps. Cet outil devrait permettre un gain de temps précieux

aux dosimétristes RPE. Un exemple concret a également été traité pour montrer l'utilité du protocole de traitement numérique des spectres RPE dans le cadre de la dosimétrie des rayonnements ionisants. Le fruit de ce travail de thèse verra sans doute une application directe à l'IRSN dans le cadre de la dosimétrie en criticité pour estimer les doses neutrons en spectroscopie RPE. Les spectres RPE d'alanine pour de faibles doses (quelques mGy) sont très bruités et les résultats dosimétriques doivent rapidement être obtenus. D'une part, les méthodes de débruitage permettront d'extraire les signaux radio-induits de ces spectres. D'autre part, les traitements des données seront automatisés en utilisant le protocole basé sur les polynômes de Tchebychev afin de fiabiliser les résultats. Le gain de temps sera également considérable puisque les spectres RPE pourront être acquis avec un nombre de points échantillonnés plus faible et un nombre d'acquisitions également moins important.

Dans le cas d'un accident radiologique de grande ampleur qui générerait un grand nombre de victimes, il est tout à fait possible d'envisager une collaboration exceptionnelle nationale à l'aide du réseau de spectroscopie RPE française, l'ARPE. Chaque laboratoire doté de spectromètres RPE recevrait un ensemble d'échantillons (ongles, émail dentaire, os) à mesurer selon les recommandations de l'IRSN et le traitement des données serait automatisé à l'aide du protocole numérique développé au cours de ce travail de thèse. Cela permettrait d'harmoniser les résultats dosimétriques obtenus. La parallélisation des mesures et la réduction du nombre de points échantillonnés et d'acquisition spectrale permettrait un gain de temps considérable. En effet, rappelons que dans ce type d'accidents, tout l'enjeu réside dans la détermination des doses reçues par les victimes le plus rapidement et le plus fiable possible afin qu'elles reçoivent le traitement médical le plus adapté.

Enfin, concernant l'élaboration d'une base de donnée universelle où seraient stockés les spectres RPE de différents systèmes paramagnétiques, il est également important de souligner que l'utilisation des polynômes de Tchebychev s'avérera pratique. En effet, il est plus commode de stocker des fonctions plutôt que des ensembles de données discrètes notamment en raison de leurs tailles allouées. De plus, la comparaison des fonctions entre elles permettra l'identification des spectres RPE obtenus expérimentalement. Ce projet exploratoire est actuellement mené en collaboration avec l'IRCP de Chimie ParisTech.

V9. Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail de thèse qui a été présenté ici s'inscrit dans le cadre de la gestion de situations d'urgence liées à une exposition fortuite et localisée aux extrémités (mains, pieds) à des rayonnements ionisants. Lorsqu'un accident de ce type survient, la difficulté réside dans l'estimation des doses de rayonnements ionisants avant l'apparition des premiers signes cliniques afin de mettre en œuvre les stratégies thérapeutiques les mieux adaptées aux victimes. À ce titre, la dosimétrie par spectroscopie RPE s'avère être une technique efficace et a déjà fait ses preuves à maintes reprises. En effet, la dosimétrie RPE sur les os est reconnue comme l'une des principales techniques de dosimétrie accidentelle rétrospective mais son caractère invasif (amputation) constitue une véritable limite concernant son utilisation systématique. Les ongles constituent ainsi une alternative très intéressante. D'une part, ce matériau a la faculté de conserver une information dosimétrique stable et ce, sur plusieurs mois. D'autre part, ils sont facilement récupérables et l'utilisation de la RPE en bande Q ne nécessite seulement que quelques milligrammes d'échantillons. Il est alors envisageable d'obtenir une cartographie de la dose aux extrémités de la victime, car chaque petit prélèvement réalisé sur chaque doigt peut être analysé séparément. En ce sens, de récents travaux ont permis d'estimer les fortes doses reçues par plusieurs victimes d'accidents radiologiques [Trompier et al., 2014, Romanyukha et al., 2014].

L'analyse des spectres RPE d'un ongle irradié reste néanmoins une tâche relativement complexe à réaliser. En effet, plusieurs signaux de diverses origines (endogènes, stress mécanique, irradiation) se superposent les uns aux autres. Par chance, la plupart de ces signaux sont instables et sont facilement éliminables par traitement chimique. Après leur élimination totale, seuls le signal endogène (*BKS*) et le signal radio-induit stable (*RIS* 5) persistent. Toutefois, le problème réside dans le fait que ces signaux possèdent les mêmes caractéristiques spectrales et qu'ils sont indiscernables l'un de l'autre. S'il a été possible d'élaborer un protocole de dosimétrie pour les fortes doses ($>10\text{Gy}$), aucun ne permet une estimation correcte des plus faibles ($<10\text{Gy}$). De plus, les délais d'expertise du protocole d'estimation des fortes doses sont trop importantes ce qui ne permet pas une applicabilité au tri de population dans le cas d'un accident radiologique de grande ampleur. Ainsi, dans l'optique de répondre à ces besoins, il a été nécessaire de mener une investigation concernant l'origine et les paramètres influant sur ces différents signaux.

Dans un premier temps, nous avons donc mené une étude complète sur les signaux endogènes et radio-induits. Nous avons montré par l'intermédiaire de simulations spectrales et différents traitements chimiques (traitements acido-basiques, oxydation et réduction) que le signal endogène *BKS* et les signaux radio-induits *RIS 2* et *RIS 5* avaient pour origine des radicaux o-semiquinones anioniques. Cette hypothèse avait déjà été avancée par le passé mais le mécanisme réactionnel faisait intervenir la mélanine. Or, les ongles en sont dépourvus (sauf dans de rares cas de pathologie) et elle avait été longtemps écartée. Toutefois, nous avons montré que ces radicaux semiquinones sont très probablement formés lors de la genèse de l'ongle (*BKS*) ou à partir des molécules de type quinones (DOPA) par interaction des rayonnements avec la matière. Concernant leur origine, ces molécules DOPA proviennent soit de l'oxydation partielle de la tyrosine qui est un acide aminé naturellement présent dans les ongles, soit de son interaction avec des rayonnements ionisants de type γ ou X. Le mécanisme réactionnel mis en avant est donc cohérent et la mélanine n'intervient pas.

Nous avons également mis en évidence le rôle de l'exposition aux rayonnements UV dans la création de radicaux libres dans les ongles. En ce sens, deux signaux induits par irradiation UVA ont été caractérisés, l'un très intense mais instable, l'*UVIS 2*, et l'autre de faible intensité mais stable, l'*UVIS 5*. Ce dernier n'avait jamais été identifié auparavant et, à l'instar du signal radio-induit stable *RIS 5*, son intensité augmente puis sature avec la dose de rayonnement UV. Nous avons ainsi montré une certaine analogie entre ces signaux UV-induits et ceux induits par les rayonnements ionisants notamment dans le comportement avec la dose absorbée ainsi que leurs stabilités respectives.

Il a été rappelé que les ongles sont principalement constitués de kératine et de lipides, mais également d'un certain nombre d'ions chargés positivement tels que l' Al^{3+} , le Ca^{2+} et le Mg^{2+} . Ces derniers permettent de stabiliser une partie des radicaux o-semiquinones anioniques, qu'ils soient endogènes ou induits par interaction rayonnement matière, en rétablissant l'électro-neutralité locale. Ainsi, seuls les radicaux stabilisés par interaction coulombienne seront observables en spectroscopie RPE après traitement chimique. Selon le mécanisme de formation, on distinguera le signal endogène *BKS* et les signaux UV et radio-induits, respectivement l'*UVIS 5* et le *RIS 5*. On distingue également leurs homologues non

Conclusion générale

stabilisés par interaction dipolaire, à savoir le signal endogène obtenu après traitement oxydatif et les signaux UV et radio-induits *UVIS 2* et *RIS 2*. La quantité de cations qui stabilisent les radicaux o-semiquinones anioniques étant limitée dans les ongles, on comprend alors le phénomène de saturation des signaux UV et radio-induits stables *UVIS 5* et *RIS 5* avec la dose absorbée.

Dans un souci d'extraction de l'information dosimétrique stable dans les ongles, nous avons également mené une étude sur la variabilité des signaux endogènes et radio-induits. Nous avons montré que la différence en intensité du signal endogène pouvait atteindre 350 % entre deux personnes différentes. L'intensité du signal endogène *BKS* peut également varier pour un même individu selon l'extrémité prélevée (mains, pieds) à hauteur de 51 % et tout au long de l'année avec une dispersion relative maximale constatée de 18 %. Ces résultats montrent que toute approche générique qui consisterait à soustraire un signal endogène moyen au signal RPE global constitué du *BKS*, de l'*UVIS 5* et du *RIS 5* pour extraire l'information dosimétrique n'est pas envisageable. Le signal UV-induit stable, l'*UVIS 5*, participe pour sûr à ces variabilités en intensité du signal endogène. L'identification et la caractérisation de ce signal UV-induit constitue un des résultats majeurs de ce travail. Concernant les signaux radio-induits, nous avons montré que la radio-sensibilité pour un même individu semble être similaire pour les ongles de mains et de pieds avec une légère différence de 8 %. L'explication la plus probable pour expliquer cette observation est que la concentration en molécules DOPA intrinsèques aux ongles varie d'un échantillon à l'autre. Plus leur quantité sera importante, plus il sera possible de générer des radicaux semiquinones radio-induits, et plus l'intensité spectrale du *RIS 2* sera importante. Nous avons également étudié la variabilité du *RIS 2* inter-individu. Cette radio-sensibilité ne diffère qu'à hauteur de 10 % entre les individus ce qui est relativement faible. Toutefois, pour une même dose de rayonnements ionisants, la différence en intensité spectrale du *RIS 2* peut atteindre 47 % rendant toute courbe de réponse en dose universelle inenvisageable. Le point positif à retenir est qu'il est possible de réaliser des courbes de réponse en dose individu-spécifique, en utilisant les ongles de mains ou de pieds et de les utiliser de manière conventionnelle pour l'estimation des doses (à chaque intensité du *RIS 2* correspond une unique dose de rayonnements ionisants).

Concernant la problématique des faibles doses, certaines pistes ont été proposées pour discriminer les individus sains de ceux irradiés. La première se base sur le comportement du signal radio-induit stable *RIS 5* avec la puissance du rayonnement micro-onde. Nous avons remarqué que plus l'échantillon a été irradié, plus les temps de relaxation des radicaux radio-induits sont faibles. Il est ainsi envisageable de discriminer les individus sains de ceux irradiés en comparant, par exemple, les aires sous les courbes de saturation en puissance micro-onde. Nous pourrions également simuler un modèle mathématique représentant l'évolution du signal endogène avec la puissance du rayonnement micro-onde et faire de même avec les signaux radio-induits *RIS 5* pour différentes doses. Il suffirait alors de comparer les coefficients de pondération pour voir quel modèle représente le mieux la courbe expérimentale. Cette approche constitue une perspective qui se doit d'être étudiée car les résultats obtenus sont très prometteurs.

La seconde approche, plutôt originale, consiste à régénérer, à l'aide d'un traitement chimique oxydatif, le signal dosimétrique *RIS 2* après son élimination totale ou partielle. Il est fondamental de poursuivre les investigations car, bien que les résultats obtenus soient prometteurs, nous ne sommes pas actuellement en mesure de le régénérer de manière systématique. Si nous parvenons à faire repousser sélectivement ce signal radio-induit par un tel traitement chimique, nous disposerions d'un protocole extrêmement efficace. Rappelons que le protocole d'estimation des fortes doses développé en 2007 par l'IRSN repose sur l'estimation des doses de saturation du signal radio-induit stable *RIS 5*. Or, si l'individu a reçu une dose supérieure à celle de saturation, la méthode des ajouts dosés ne permettra pas son estimation. Pour remédier à ce problème, l'approche suivante est à considérer. Dans un premier temps, il faudrait estimer l'intensité du signal endogène (ongles provenant de la main non-irradiée par exemple), puis réaliser quelques ajouts dosés pour établir la relation linéaire (spécifique à l'individu) qui relie l'intensité du *RIS 2* à la dose absorbée. Ainsi, la régénération du *RIS 2* mesuré dans les ongles de la main irradiée nous permettrait d'estimer ces doses de manière conventionnelle (utilisation de la courbe de réponse en dose) ce qui représenterait un avantage considérable. De plus, une telle approche permettrait également une estimation des faibles doses (entre 0 et 10 Gy) Dans cette gamme de dose, le *RIS 2* est du même ordre de grandeur que le *BKS*. L'approche qui est envisagée et qui constitue une

Conclusion générale

perspective de ce travail est la discrimination des deux signaux par leur comportement vis-à-vis de la puissance du rayonnement micro-onde car le *RIS 2* et le *BKS* ne présentent pas le même comportement. Si nous parvenons à régénérer de manière systématique et fiable le *RIS 2* après son élimination totale, il sera alors possible de discriminer, au moins qualitativement, un individu sain d'un individu irradié pour des doses de 0 à 10 Gy. Toutefois, les délais des expertises étant relativement longs, il ne sera pas possible d'utiliser un tel protocole pour une applicabilité au tri de population dans le cas d'un accident radiologique de grande ampleur.

Au cours d'une collaboration avec l'IRCP de Chimie Paris-Tech, nous avons également souligné le caractère opérateur-dépendant des pratiques d'analyses des spectres RPE. En ce sens, le traitement et le maniement de données discrètes constituent une véritable source de variabilité inter-opérateur (erreur humaine, subjectivité de l'analyse). De plus, l'extraction de données d'intérêt en spectroscopie RPE (amplitudes, largeurs, intensités, paramètres spectraux) se fait généralement manuellement via l'interface graphique du spectromètre. Inévitablement, on assiste à une variabilité inter-opérateur des résultats obtenus qui n'est évidemment pas souhaitable en dosimétrie. Aussi, dans un souci d'harmonisation des résultats dans un même laboratoire et, idéalement, à une échelle plus importante, nous avons proposé une nouvelle approche pour traiter de manière univoque les spectres RPE (ongles, dents, os, verres...). Cette approche repose sur la transformation de données discrètes sous forme continue en utilisant une approche mathématique, les polynômes de Tchebychev, implémentée sous Matlab (outil *Chebfun*). Il est ainsi possible de représenter de manière fiable et robuste tout type de spectre RPE sous forme continue. De plus, nous avons montré que ce type de traitement numérique permet d'obtenir bien plus rapidement et aussi bien, si ce n'est mieux, les résultats qu'on aurait obtenu de manière conventionnelle, c'est-à-dire manuellement.

En règle générale, les spectres RPE des ongles après traitement chimique (nécessaire pour isoler les composantes stables) sont très bruités. Le bruit généré par le spectromètre RPE constitue dès lors une source de confusion pour l'opérateur. Aussi, afin de s'en affranchir autant que possible, la première étape a donc naturellement été de mener une étude à la fois théorique et expérimentale pour le caractériser. Un moyen couramment utilisé en routine pour

augmenter le rapport signal sur bruit des spectres RPE est d'acquérir un ensemble de spectres RPE d'un même échantillon pour obtenir un spectre lissé (ou moyenné). Toutefois, le temps est un paramètre crucial en dosimétrie RPE et nous avons proposé une nouvelle approche afin de réduire les délais des expertises. Notre protocole numérique repose sur une méthode de débruitage simple, efficace et rapide que nous avons intégré sous forme de routines Matlab. Il s'agit d'un filtre passe-bas que nous avons développé et qui repère la fréquence de coupure la plus optimale et ce, de manière objective. On s'affranchit ainsi de la sensibilité de l'opérateur et donc de toute variabilité inter-individu. D'autres techniques de débruitage ont également été testées telles que le lissage polynomial et la réduction du degré des polynômes de Tchebychev mais elles se sont avérées moins efficaces au cours de cette étude.

Un des résultats majeurs de cette thèse est le développement et la validation de ce protocole de traitement numérique des spectres RPE quels qu'ils soient. Si l'utilisation de la dosimétrie RPE sur les ongles des victimes ne semble pas pertinente pour le tri de population, elle l'est en revanche concernant les mini-prélèvements d'émail dentaire mesurés en bande Q. À ce titre, les limites de détection en dose sont de l'ordre de quelques centaines de mGy. Ainsi, le protocole que nous avons développé en collaboration avec l'IRCP de Chimie Paris-Tech permettra de réduire les délais d'expertises dans de tels scénarios. D'une part, il ne sera plus nécessaire de réaliser un important nombre d'acquisitions spectrales car nous pouvons débruiter les spectres RPE de manière fiable, robuste et rapide. Il s'agit donc d'un gain de temps sur les mesures. D'autre part, le traitement automatique et non-opérateur dépendant des spectres RPE permettra également de réduire les durées nécessaires à l'extraction des variables d'intérêt. Les doses reçues par les victimes seront donc plus rapides à obtenir et plus fiables que celles obtenues de manière conventionnelle, c'est-à-dire manuellement.

Enfin, l'utilisation des polynômes de Tchebychev pour représenter les spectres RPE sous forme continue est intéressante pour élaborer une base de données universelle. À chaque entité paramagnétique correspondrait son équation mathématique. Ces bases de données seraient mises en ligne, et il serait alors possible d'interroger le serveur pour identifier et caractériser la nature du radical responsable du spectre expérimental. Ce projet exploratoire est actuellement mené en collaboration avec l'IRCP de Chimie ParisTech.

Références bibliographiques

A :

- **Ainsbury, E. A., et al.** Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 147, n° 4, 573-92, 2011.
- **Alexander, George A., et al.** BiodosEPR-2006 Meeting: Acute Dosimetry Consensus Committee Recommendations on Biodosimetry Applications in Events Involving Uses of Radiation by Terrorists and Radiation Accidents. *Radiation Measurements*, vol. 42, 972-96, 2007.
- **Azorín-Nieto, Juan.** Solid state dosimeters used in medical physics “A review”. *AIP Conference Proceedings*, vol. 1494, n° 1, 82-84, 2012.
- **Afridi HI, Kazi TG, Kazi GH, Jamali MK, Shar GQ.** Essential trace and toxic element distribution in the scalp hair of Pakistani myocardial infarction patients and controls, *Biological Trace Element Research*, Volume 113, Issue 1, pp 19–34, 2006.
- **André, J, Lateur N.** Pigmented Nail Disorders, *Dermatologic Clinics*, vol. 24, Issue 3, 329 – 339, 2006.
- **Aubury, Matthew and Wayne Luk.** Binomial filters. *VLSI Signal Processing* 12, 35-50, 1996.
- **Abragam A, Bleaney B.** *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions.* Oxford : Clarendon Press, 1970.

B :

- **Bank HL, Robson J, Bigelow JB, Morrison J, Spell LH, Kantor R.** Preparation of fingernails for trace element analysis. *Clin Chim Acta.* 116(2) :179-90, 1981.
- **Baffa, Oswaldo, et Angela Kinoshita.** Clinical Applications of Alanine/Electron Spin Resonance Dosimetry. *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 53, n° 2, 233-40, 2014
- **Barr D, Eaton SS, Eaton GR.** Workshop on Quantitative EPR. At the 31st Annual International EPR Symposium, Breckenridge, Colorado, July 27, 2008.

- **Berlin L.** Malpractice issues in radiology: Radiation-induced skin injuries and fluoroscopy. *American Journal of Roentgenology*, 177, 21-25, 2001.
- **Bertho, J. M., et al.** Bio-indicateurs potentiels d'atteinte multi-organe : application au cas des victimes d'irradiation accidentelles. *Médecine Nucléaire*, vol. 33, n° 9, 558-70, 2009.
- **Bertho, J. M.** Le syndrome hématopoïétique induit par une irradiation accidentelle : évaluation et traitements possibles. *Radioprotection*, vol. 41, n° 2, 215-27, 2006.
- **Bertho, J.M, et al.** Initial evaluation and follow-up of acute radiation syndrome in two patients from the Dakar accident. *Biomarkers*, vol. 14, n° 2, 94-102, 2009.
- **Belle, V., Rouger, S., Costanzo, S., Longhi, S. & Fournel, A.** Site-Directed Spin Labeling EPR Spectroscopy. in *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins* (eds. Uversky, V. N. & Longhi, S.) 131–169 (John Wiley & Sons, Inc.), 2010.
- **Bertrand, P.** Molecular Modelling of Proton Transfer Kinetics in Biological Systems. *Reaction Rate Constant Computations: Theories and Applications* 6, 379, 2013.
- **Bertrand P.** La Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique : Fondements, EDP Sciences, « Grenoble Sciences », 2010, 367 pages.
- **Bertrand P.** La spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique - Applications, « Grenoble Sciences », 2014, 413 pages.
- **Binder, K.** Introduction : Theory and “Technical” Aspects of Monte Carlo Simulations. *Monte Carlo Methods in Statistical Physics*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1-45, 1986.
- **Bradshaw, W. W., et al.** The Use of Alanine as a Solid Dosimeter. *Radiation Research*, vol. 17, n° 1, 11-21, 1962.
- **Brady, John M., et al.** In Vivo Dosimetry by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Health Physics*, vol. 15, n° 1, 43, 1968.
- **Black, Paul J., et Steven G. Swarts.** Ex vivo analysis of irradiated fingernails: chemical yields and properties of radiation-induced and mechanically-induced radicals. *Health Physics* 98, no 2, 301-8, 2010.
- **Battles and Trefethen.** An extension of Matlab to continuous functions and operators. *SIAM J. Sci. Comp*, vol 25, No 5, 1743-1770, 2004.

Références bibliographiques

- **Barrett, S.** Commercial hair analysis: Science or scam? JAMA 254:1041-1045, 1985.
- **Brudzynski K. , Maldonado-Alvarez L.** Polyphenol-protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey. A current view and new hypothesis - a review, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Pol. J. Food Nutr. Sci., Vol. 65, No. 2, pp. 71–80, 2015.
- **Bharat R, Suseela B.** Quantitative oxidations by potassium ferricyanure, Talanta. Vol. 3, pp. 261 to 271. Pergamon Press Ltd. Printed in Northern Ireland, 1960.
- **Barba, C., Mendez, S., Mart, M., Parra, J.L., and Coderch, L.** Water content of hair and nails. Thermochim. Acta, 494 : 136–140, 2009.
- **Bellanger M.** Traitement numérique du signal, 3e édition, Masson, Paris, 1987.
- **Boite, R, Leich, H.** Analyse et synthèse des filtres unidimensionnels, 3e édition, Masson, Paris, 1990.
- **Blanchet, G, Charbit, M.** Traitement numérique du signal, Simulation sous Matlab, Hermès, Paris, 1998.
- **Borg D.C.** Transient free radical forms of hormones: EPR spectra from catecholamines and adrenochrome. PNAS 53(3), 633–639, 1965.

C :

- **Coeytaux K, Bey E, Christensen D, Glassman ES, Murdock B, Douce C.** Reported Radiation Overexposure Accidents Worldwide, 1980-2013: A Systematic Review. Plos One. 5; 10:e0118709, 2015.
- **Cole T, Silver A.H.** Production of hydrogen atoms in teeth by X-irradiation, Nature, 200, 700-701, 1963.
- **Chauhan, Sulaxana Kumari, et al.** Detection Methods for Irradiated Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 8, n° 1, 4-16, 2009.
- **Ciesielski, B., J. Kaminska, et al.** Analysis of various modifications in spectra analysis on accuracy of dose reconstructions in EPR dosimetry in tooth enamel. Radiation Measurements, vol. 46, n° 9, 783-88. ScienceDirect, 2011.
- **Ciesielski, B., A. Karaszewska, et al.** Reconstruction of doses absorbed by radiotherapy patients by means of EPR dosimetry in tooth enamel. Radiation Measurements, vol. 42, n° 6, 1021-24, 2007.

- **Ciesielski, Bartłomiej, et al.** The effect of background signal and its representation in deconvolution of epr spectra on accuracy of epr dosimetry in bone. *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 172, n° 1-3, 275-82, 2016.
- **Clairand, Isabelle, et al.** EX vivo ESR measurements associated with Monte Carlo calculations for accident dosimetry: application to the 2001 Georgian accident. *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 119, n° 1-4, 500-05, 2006.
- **Coleman, C. Norman, et al.** Molecular and Cellular Biology of Moderate-Dose (1–10 Gy) Radiation and Potential Mechanisms of Radiation Protection: Report of a Workshop at Bethesda, Maryland, December 17–18, 2001. *Radiation Research*, vol. 159, n° 6, p. 812-34, 2003.
- **Choi, H., B. Park, M. Choi, B. Lee, et C. E. Lee.** An Alternative Method Using Microwave Power Saturate in Fingernail/Electron Paramagnetic Resonance Dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* 159, no 1-4, 164-71, 2014.
- **Chandra, H. and Symons, M.C.** Sulphur radicals formed by cutting alpha-keratin. *Nature*.328: 833–834, 1987.
- **Černá, M.** Chapter 24 - Seaweed Proteins and Amino Acids as Nutraceuticals. *Advances in Food and Nutrition Research*. 64, 297-312, 2011.
- **Chaillol.** Mesure de l'exposition au rayonnement ultraviolet solaire pour les études épidémiologiques, Thèse de doctorat en Santé Publique, sous la direction de JF Doré et de M Boniol, École Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (Lyon), 2011.
- **Chiu WS, Natalie A. Belsey, Natalie L. Garrett, Julian Moger, M. Begoña Delgado-Charro, and Richard H. Guy.** Molecular diffusion in the human nail measured by stimulated Raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (25) 7725-7730, 2015.
- **Chaux C.** Analyse en ondelettes M-bandes en arbre dual ; application à la restauration d'images. Traitement du signal et de l'image. Université de Marne la Vallée, 2006.
- **Chen B and Cherry C, A.** Systematic Comparison of Smoothing Techniques for Sentence-Level BLEU, National Research Council Canada, 2004.

D :

- **Dalgarno, B.G. and McClymont, J.D.** Evaluation of ESR as a radiation accident dosimetry technique. *Appl. Radiat. Isot.*, 40: 1013–1020, 1989.
- **DasGupta A.** Normal Approximations and the Central Limit Theorem. In: *Fundamentals of Probability: A First Course*. Springer Texts in Statistics. Springer, New York, NY, 2010.
- **Duttreix J, Desgrez A, Bok B, Chevalier C,** Physique et biophysique Pcem Tome 4 Bases de l utilisation medicale et biologique des radiations, Paris, Masson et cie, 1973, 234 p.
- **Delafield, H. J., et C. A. Perks.** Neutron Spectrometry and Dosimetry Measurements Made at Nuclear Power Stations with Derived Dosemeter Responses. *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 44, n° 1-4, p. 227-32, 1992.
- **Duling D.R. et al.** Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap EPR Spectra". *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 104, 105-110, 1994.
- **Desrosiers, M. F.** Estimation of the absorbed dose in radiation-processed food—2. Test of the EPR response function by an exponential fitting analysis. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*, vol. 42, n° 7, p. 617-19, 1991.
- **Desrosiers M.** Alanine-EPR High-Dose Radiation Metrology. In: Lund A., Shiotani M. (eds) *Applications of EPR in Radiation Research*. Springer, Cham, 2014
- **Danhier P, Gallez B.** Electron paramagnetic resonance: a powerful tool to support magnetic resonance imaging research, *Contrast Media and Molecular Imaging*, Volume10, Issue4, pp 266-281, 2015.
- **Driscoll T. A, Hale N, and Trefethen LN,** editors, *Chebfun Guide*, Pafnuty Publications, Oxford, 2014.
- **D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T.** UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* Jun 7;14(6):12222-48, 2013.
- **Dittmar M, Dindorf W, Banerjee A.** Organic elemental composition in fingernail plates varies between sexes and changes with increasing age in healthy humans. *Gerontology.* 54(2):100-5, 2008.

- **Donoho DL.** Nonlinear Solution of Linear Inverse Problems by Wavelet–Vaguelette Decomposition. *Applied and Computational Harmonic Analysis*. 2(2), 101-126, 1995.
- **De Revel MC, et al.** Menace terroriste nucléaire : approche médicale. John Libbey Eurotext, 2005.

E :

- **Engström M, Vahtras O, Agren H.** MCSCF and DFT calculations of EPR parameters of sulfur centered radicals. *Chem Phys Lett*. 328:483–491, 2000.
- **El Afrit M, Le Du Y, Del Pino R, Zhang G.** Data merging for the cultural heritage imaging based on Chebfun approach. *Supercomputing Frontiers and Innovations: an International Journal archive Volume 3 Issue 3, Pages 71-83*, 2016.
- **Egawa, M., Ozaki, Y., and Takahashi, M.** In vivo measurement of water content of the fingernail and its seasonal change. *Skin Res. Tech.*, 12 (2): 126–132, 2006.

F :

- **Fliedner, Theodor M., et al.** Medical Management of Radiation Accidents: Manual on the Acute Radiation Syndrome. British Inst of Radiology, 2001.
- **Fattibene, Paola, et Freddy Callens.** EPR dosimetry with tooth enamel: A review. *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 68, n° 11, p. 2033-116, 2010.
- **Fattibene, Paola, et Andrzej Wojcik.** Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation. *Ann Ist Super Sanita*, vol. 45, p. 243–307, 2009.
- **Franck, D., et al.** La dosimétrie à l'IRSN. *Radioprotection*, vol. 41, n° S5, p. S227-52, 2006.
- **Farren L, Shayler S, Ennos AR.** The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *J Exp Biol*, 207, 735-741, 2004.
- **Floater MS and Hormann K.** Barycentric rational interpolation with no poles and high rates of approximation, *Numerische Mathematik* 107, 315–331, 2007.
- **Felix C C, Hyde J S, Sarna T, Sealy R C.** Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals. *J Am Chem Soc*, 100: 3922–3926, 1978.

Références bibliographiques

- **Field, A.** Discovering statistics using spss for windows. London-Thousand Oaks- New Delhi: Sage publications, 2000.
- **Field, A.** Discovering statistics using SPSS. London: SAGE, 2009.

G :

- **Greaves M, Moll JM.** Amino acid composition of human nail, as measured by gas-liquid chromatography. Clinical chemistry. 22, 10, 1608-1613, 1976.
- **Gordy, Walter, et Howard Shields.** Electron Spin Resonance Studies of Radiation Damage to Proteins. Radiation Research, vol. 9, n° 6, p. 611-25, 1958.
- **Goldfarb, B, Pardoux C.** Comment faire les diagrammes Quantile-Quantile et Probabilité-Probabilité ? La Revue MODULAD. INRIA. No 33. 2005.
- **Guo, S., Wharton, W., Moseley, P. & Shi, H.** Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. Cell Stress & Chaperones 12, 245, 2007.
- **Griffith, O. H. & McConnell, H. M.** A nitroxide-maleimide spin label. Proceedings of the National Academy of Sciences 55, 8–11, 1966.
- **Gravetter, F., & Wallnau, L.** Essentials of statistics for the behavioral sciences (8th ed.). Belmont, CA: Wadsworth, 2014.

H :

- **Hull, J. S.** Hair Analysis program. www.hairanalysisprogram.com, 2003.
- **Harrison, John, et al.** Polonium-210 as a Poison. Journal of Radiological Protection, vol. 27, n° 1, p. 17. Institute of Physics, 2007.
- **Huet, C., I. Clairand, F. Trompier, J. F. Bottollier-Depois, et al.** Monte Carlo dose reconstruction in case of a radiological accident: application to the accident in Chile in December 2005. Radioprotection, vol. 42, n° no.4, p. 489-500, 2007.
- **Huet, C., F. Trompier, I. Clairand, F. Queinnec, et J. F. Bottollier-Depois.** Physical dosimetric reconstruction of a radiological accident at Fleurus (Belgium) on 11 March 2006. Radiation Measurements, vol. 43, n° 2, p. 845-48, 2008.
- **Huet, C., I. Clairand, F. Trompier, E. Bey, et al.** Reconstitution de dose par calcul Monte Carlo en cas d'accident radiologique : application à l'accident du Chili de décembre 2005. Radioprotection, vol. 42, n° 4, p. 489-500, 2007.

- **Huet, C., A. Lemosquet, I. Clairand, J. B. Rioual, D. Franck, et al.** Sesame: a software tool for the numerical dosimetric reconstruction of radiological accidents involving external sources and its application to the accident in chile in december 2005. *Health Physics*, vol. 96, n° 1, p. 76, 2009.
- **Hureau C.** Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Science Direct. Coordination Chemistry Reviews. Volume 256, Issues 19–20, Pages 2164-2174, 2012.*
- **Hureau C.** Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with A β sequences. *Science Direct. Coordination Chemistry Reviews. Volume 256, Issues 19–20, Pages 2175-2187, 2012.*
- **Hervé ML, Trompier F, Tikunov DD, Amouroux V, Clairand I.** Study of materials for mixed field dosimetry by EPR spectroscopy. *Radiat Prot Dosimetry*. 120(1-4):205-9, 2006.
- **Horowitz, Y. S.** The Theoretical and Microdosimetric Basis of Thermoluminescence and Applications to Dosimetry. *Physics in Medicine & Biology*, vol. 26, n° 5, p. 765, 1981.
- **Hennig, G. J. & Grün, R.** ESR dating in quaternary geology. *Quaternary Science Reviews* 2, 157–238, 1983.
- **Herve,** Dosimétrie d'accident en champ mixte (neutrons, photons) utilisant la spectrométrie par résonance paramagnétique électronique (RPE), Thèse de doctorat en Physique radiologique et médicale, sous la direction de J Barthe, Faculté de médecine Paris-Sud, Université Paris XI, 2006.
- **He, Xiaoming, et al.** Development and validation of an ex vivo electron paramagnetic resonance fingernail biodosimetric method. *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 159, n° 1-4, p. 172-81, 2014.
- **Hérodin, Francis, et al.** « Short-Term Injection of Antiapoptotic Cytokine Combinations Soon after Lethal γ -Irradiation Promotes Survival ». *Blood*, vol. 101, n° 7, p. 2609-16, 2003.

I :

- **Ikeya Motoji, et al.** « ESR Dosimetry for Atomic Bomb Survivors Using Shell Buttons and Tooth Enamel ». Japanese Journal of Applied Physics, vol. 23, n° 9A, p. L697, 1984.
- **Ikeya Motoji.** New applications of Electron Spin Resonance : Dating, dosimetry and microscopy, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, World Scientific Publishing Co. 1993.
- **Ivannikov AI, Gaillard-Lecanu E, Trompier F, Stepanenko VF, Skvortsov VG, Yermakova N, Tikunov D, Petin DV.** Dose reconstruction by EPR spectroscopy of tooth enamel : application to the population of Zaborie village exposed to high radioactive contamination after Chernobyl accident. Health Physics. 86, 121-134, 2004.
- **International Atomic Energy Agency.** The radiological accident in Nueva Aldea IAEA STI/PUB/P1389, IAEA, Vienna, 2009.
- **International Atomic Energy Agency.** The radiological accident at the irradiation facility in Nesvizh. IAEA STI/PUB/P1010, 1996.
- **IRSN.** Les accidents dus aux rayonnements ionisants // le bilan sur un demi-siècle. Rapport IRSN-2007/79-FR. 2007.
- **IAEA.** The 1988 Joint Protocol Relating to the Application of the Vienna Convention and the Paris Convention — Explanatory Text, 2013.
- **IAEA** Annual Report for 2001. 2 novembre 2014.
- **IAEA** Annual Report for 2009. 2 juillet 2014.
- **IAEA, éditeur.** The Radiological accident in Goiânia. International Atomic Energy Agency ; UNIPUB, distributor], 1988.
- **IAEA, éditeur.** The Radiological Accident in Nueva Aldea. International Atomic Energy Agency, Vienna Austrai, 2009.
- **Ignatiev EA, Romanyukha AA, Koshta AA, Wieser A.** Selective saturation method for EPR dosimetry with tooth enamel. Applied Radiation and Isotopes. 47(3), 333-337, 1996.

- **Internationale Atomenergie-Organisation**, éditeur. Quality assurance for safety in nuclear power plants and other nuclear installations: code and safety guides Q1 - Q14. 1996. éditeur. Radiation Protection and Safety of Radiation Sources: International Basic Safety Standards ; General Safety Requirements. Interim ed, International Atomic Energy Agency, 2011.
- **Ingram D J E**. Biological and Biochemical Applications of Electron Spin Resonance. London: Anad Hilger Ltd, 1969.

J :

- **Johansson L**. Trace Element Levels in Scalp Hair from Adolescents in Río Negro, Argentina: Link to Environmental and Dietary Factors. Lannaeus University, 2011.
- **Jeschke G**. EPR techniques for studying radical enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. Volume 1707, Issue 1, 25, Pages 91-102, 2005.
- **Jain R, Freund HG, Budzinsky E, Sharma M**. Radiation-induced formation of 3,4-dihydroxyphenylalanine in tyrosine-containing peptides and proteins as a function of X-irradiation dose. Bioconjugate Chemistry. 8(2), 173-178, 1997.

K :

- **Koenig, Titus R., et al**. Skin Injuries from Fluoroscopically Guided Procedures. American Journal of Roentgenology, vol. 177, n° 1, p. 3-11, 2001.
- **Kramer, R., et al**. All about MAX: A Male Adult Voxel Phantom for Monte Carlo Calculations in Radiation Protection Dosimetry. Physics in Medicine & Biology, vol. 48, n° 10, p. 1239, 2003.
- **Komusinski, J & Stoch, L & Dubiel, S**. Application of electron paramagnetic resonance and Mossbauer spectroscopy in the investigation of kaolinite-group minerals. Clays and Clay Minerals. 29. 23-30, 1981.
- **Kerber, Leonardo, et al**. Electron Spin Resonance dating of the southern Brazilian Pleistocene mammals from Touro Passo Formation, and remarks on the geochronology, fauna and palaeoenvironments. Quaternary International, vol. 245, n° 2, p. 201-08, 2011.
- **Keen, C.L, Ensunsa, J. L and Watson, M. H**. Nutritional aspects of manganese from Experimental studies. Neurotoxicol, 20:213 – 23, 1999.

Références bibliographiques

- **Kaladharan, P.** Amino acids in the seaweeds as an alternate source of protein for animal feed. *Journal of the Marine Biological Association of India* 40, January - June 2007. 49. 35-40, 2007.
- **Kalyanaraman B, Premovic PI, Sealy RC.** Semiquinone anion radicals from addition of amino acids, peptides, and proteins to quinones derived from oxidation of catechols and catecholamines. An ESR spin stabilization study. *J. Biol. Chem.* 262, 23, 11080–11087, 1987.
- **Kunt, M.** Traitement numérique des signaux, 3e édition, Dunod, Paris, 1981.

L :

- **Lefaix, Jean-Louis, et Francois Daburon.** Diagnosis of Acute Localized Irradiation Lesions: Review of The French Experimental Experience. *Health Physics*, vol. 75, n° 4, p. 375, 1998.
- **Lazard, Par L.** Restauration de La Régénération de Membres Irradiés d’Axolotl Par Des Greffes Hétérotopiques d’origines Diverses. *Development*, vol. 18, n° 3, p. 321-42, 1967.
- **Le Y, Israelsson A, Pettersson H, Gustafsson H, Lund E.** Retrospective Dosimetry on Human Nails using X-band EPR Spectroscopy, in proceedings of the 13th IRPA International Congress – IRPA13, Glasgow, Scotland, TS2C5, 13-18 May 2002.
- **Le Du et al.,** 2018 : article en cours.
- **Luis Candeias P, Wardman P, Mason Ronald P.** The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid. *Biophysical Chemistry*. 67, 229-237, 1997.

M :

- **Meybeck A.** E.S.R. study of free radicals formed in skin proteins by u.v. irradiation. *Int J Cosmet Sci.* 1(4) :199-211, 1979.
- **Mamedov ShV, Aktas B, Cantürk M, Aksakal B, Alekperov V, Bülbül F, Yilgin R, Aslanov RB.** 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. *Biomaterials*. 23(16):3405-12, 2002.

- **Maltempo MM, Eaton SS, Eaton GR.** Spectral-Spatial Two-Dimensional EPR Imaging. JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE 72,449-455, 1987.
- **Morin, B. et al.** Assessing Induced Folding of an Intrinsically Disordered Protein by Site-Directed Spin-Labeling Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry B 110, 20596–20608, 2006.
- **Marciniak, A., et al.** « The effect of dose and water treatment on EPR signals in irradiated fingernails ». Radiation Protection Dosimetry, vol. 162, n° 1-2, p. 6-9, 2014.
- **Mallat S.** A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence. 11(7), 674-693, 1989.
- **Maya Abou Fadel,** Apports de la chimométrie à la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique : nouvelles perspectives de traitement de données spectrales à dimensions spatiales (imagerie) et / ou temporelles. Thèse de doctorat en Optique, Lasers, Physico-Chimie et Atmosphère, sous la direction de Ludovic Duponchel, Université Lille 1, 2015.
- **Mallat S.** « A Wavelet Tour of Signal Processing », 3rd edition, Academic Press, Boston, 2009.
- **Miller RW, Rapp U.** The oxidation of catechols by reduced flavins and dehydrogenases. An electron spin resonance study of the kinetics and initial products of oxidation. J. Biol. Chem., 248, pp. 6084-6090, 1973.

N :

- **Nakagawa, K.** Free Radicals in Nonirradiated and Irradiated Foods Investigated by ESR and 9 GHz ESR Imaging. Electron Spin Resonance in Food Science 123–136, Elsevier, 2017.

O :

- **Olabanji SO, Ajose OA, Makinde NO, Buoso MC, Ceccato D, De Poli M, Moschini G.** Characterization of human fingernail elements using PIXE technique. Nucl. Instr. And Meth. In Phys. Res. B, 240(4), 895-907, 2005.

Références bibliographiques

- **Okoro HK, Alao ST, Adebayo GB, Basheer KA.** Evaluation of Heavy and Trace Metals in Fingernails of Young School Children and Adults in Ilorin, Kwara State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. Vol 19, No 2, 2015.

P :

- **Particle Sciences,** Drug Development Services. Skin and nail: Barrier function, structure, and anatomy considerations for drug delivery, 2009.
- **Platte RB and Trefethen LN.** Chebfun : A New Kind of Numerical Computing. *ECMI 2008 Proceedings*, 2010.
- **Parizanganeh A, Zamani A, Bijnavand V, Taghilou B.** Human nail usage as a Bio-indicator in contamination monitoring of heavy metals in Dizajabaad, Zanjan province-Iran. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 12(1):147, 2014.
- **Plonka, P.M.** Electron paramagnetic resonance as a unique tool for skin and hair research. *Experimental Dermatology* 18, 472–484, 2009.
- **Perrin C, Michiels JF, Pisani A, Ortonne JP.** Anatomic distribution of melanocytes in normal nail unit: an immunohistochemical investigation. *Am J Dermatopathol*, 19(5) :462-7, 1997.

R :

- **Rigollet C, Gras A.** L'empoisonnement presume de litvinenko au polonium 210, en Grande-Bretagne. *Mémoire de RAD 4*, 2008.
- **Rehani, Madan M., et Pedro Ortiz-Lopez.** Radiation effects in fluoroscopically guided cardiac interventions—keeping them under control. *International Journal of Cardiology*, vol. 109, n° 2, p. 147-51, 2006.
- **Reyes, R.A., Romanyukha, A., Trompier, F., Mitchell, C.A., Clairand, I., De, T., Benevides, L.A., and Swartz, H.M.** Electron paramagnetic resonance in human fingernails: The sponge model implication. *Radiat. Environ. Biophys.*, 47 (4): 515–526, 2008.

- **Reyes, R. A., et al.** Electron Paramagnetic Resonance in Irradiated Fingernails: Variability of Dose Dependence and Possibilities of Initial Dose Assessment. *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 48, n° 3, p. 295, 2009.
- **Reyes, Ricardo A., et al.** Study of the Stability of EPR Signals After Irradiation OF Fingernail Samples. *Health Physics*, vol. 103, n° 2, p. 175, 2012.
- **Romanyukha, A., Trompier F., LeBlanc, B., Calas, C., Clairand, I., Mitchell, C. A., Smirniotopoulos, J. G., and Swartz, H. M.** EPR dosimetry in chemically treated fingernails. *Radiat. Meas.*, 42 (6–7) : 1110–1113, 2007.
- **Romanyukha, A., Reyes, R. A., Trompier, F., and Benevides, L.A.** Fingernail dosimetry: Current status and perspectives. *Health. Phys.*, 98 (2) : 296–300, 2010.
- **Romanyukha, A., Trompier, F., Reyes, R. A., and Melanson, M.A.** EPR measurements of fingernails in Q-band. *Radiat. Meas.*, 46 (9) : 888–892, 2011.
- **Romanyukha, Alexander, et al.** Electron Paramagnetic Resonance Radiation Dose Assessment in Fingernails of the Victim Exposed to High Dose as Result of an Accident. *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 53, n° 4, p. 755-62, 2014.
- **Roy L, Roch-Lefevre S, Vaurijoux A, Voisin P, Martin C, Grégoire E, Voisin P.** Optimization of cytogenetic procedures for population triage in case of radiological emergency. *Radiat. Meas.* 42, 1143-1146, 2007.
- **Regulla, D.F. and Deffner, U.** Dosimetry by ESR Spectroscopy of alanine. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 33 : 1101–1114, 1982.
- **Rodushkin I, Axelsson MD.** Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden. *Sci Total Environ* 262(1) :21–36, 2000.
- **Richard W. Miller and Ursula Rapp.** The Oxidation of Catechols by Reduced Flavins and Dehydrogenases. An electron spin resonance study of the kinetics and initial products of oxidation. *Journal of Biological Chemistry*. 248, 6084-6090, 1973.
- **Rivet B, Vigneron V, Paraschiv-Ionescu A, Jutten C.** Wavelet de-noising for blind source separation in noisy mixtures. Technical report. Technical report for the BLInd Source Separation project (BLISS IST 1999-14190), 2003.

S :

- **Steinhauser, Georg, et al.** « Comparison of the Chernobyl and Fukushima nuclear accidents: A review of the environmental impacts ». *Science of The Total Environment*, vol. 470-471, n° Supplement C, p. 800-17, 2014.
- **Şahiner E, Meriç N, Polymeris GS.** Impact of different mechanical pre-treatment to the EPR signals of human fingernails towards studying dose response and fading subjected to UV exposure or beta irradiation. *Radiation Measurements*. 82, 40–46, 2015.
- **Sarna T, Plonka P M.** Biophysical studies of melanin: paramagnetic, ion exchange and redox properties of melanin pigments and their photoreactivity. In: Eaton S S, Eaton G R, Berliner L J, eds. *Biomedical ESR. Biological Magnetic Resonance Series*, vol. 23. The Netherlands-New York-Boston : Kluwer Academic Publishers, 125–146, 2005.
- **Sasaki, Masao S., et Hisatoshi Miyata.** Biological Dosimetry in Atomic Bomb Survivors. *Nature*, vol. 220, n° 5173, p. 1189, 1968.
- **Schauer, D. A., et al.** EPR Dosimetry of Cortical Bone and Tooth Enamel Irradiated with X and Gamma Rays: Study of Energy Dependence. *Radiation Research*, vol. 138, n° 1, p. 1-8, 1994.
- **Skvortsov, V. G., et al.** Application of EPR retrospective dosimetry for large-scale accidental situation. *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 52, n° 5, p. 1275-82, 2000.
- **Skvortzov, V. G., et al.** Assessment of individual accumulated irradiation doses using EPR spectroscopy of tooth enamel. *Journal of Molecular Structure*, vol. 347, n° Supplement C, p. 321-29, 1995.
- **Schwarcz HP, Grün R & Tobias PV.** ESR dating studies of the australopithecine site of Sterkfontein, South Africa. *Journal of Human Evolution*. 26, 175-181, 1994.
- **Sorin, L. A., et M. V. Vlasova.** *Electron Paramagnetic Resonance. Electron Spin Resonance of Paramagnetic Crystals*, Springer, Boston, MA, p. 94-110, 1973.
- **Souchkevitch, G. N., et A. F. Tsyb.** Health Consequences of the Chernobyl Accident : Results of the IPHECA Pilot Projects and Related National Programmes : Scientific Report. World Health Organization. International Programme on the Health Effects of the Chernobyl Accident (IPHECA), 1996.

- **Sevilla MD, Yan M, Becker D.** Thiol peroxy radical formation from the reaction of cysteine thiyl radical with molecular oxygen: an ESR investigation. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 405–410, 1988.
- **Stoll S, Schweiger.** EasySpin A, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* 178(1), 42-55, 2006.
- **Stoll S.** CW-EPR Spectral Simulations: Solid State Methods in Enzymology 563, 121-142, 2015.
- **Stoll S, Britt RD.** General and efficient simulation of pulse EPR spectra *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 6614-6625, 2009.
- **Swartz, Harold M.** Long-Lived Electron Spin Resonances in Rats Irradiated at Room Temperature. *Radiation Research*, vol. 24, n° 4, p. 579-86, 1965.
- **Schnitzer, M., and R. Riffaldi.** The determination of quinone groups in humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 36: 772–777, 1972.
- **Sevilla, M.D., Becker, D., Swartz, S., and Herrington, J.** Sulfinyl radical formation from the reaction of cysteine and glutathione thiyl radicals with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 144 (2): 1037–1042, 1987.
- **Sholom S, McKeever S.** Stability of X-band EPR signals from fingernails under vacuum storage. *Radiation Physics and Chemistry.* 141, 78-87, 2017.
- **Sholom S, McKeever SWS.** Emergency EPR dosimetry technique using vacuum-stored dry nails. *Radiation Measurements.* 88, 41-47, 2016.
- **Symons MCR, Chandra H and Wyatt JL.** Electron paramagnetic resonance spectra of irradiated finger-nails: a possible measure of accidental exposure. *Radiation Protection Dosimetry.* 58, 11-15, 1995.
- **Symons M.** Formation of radicals by mechanical process. *Free Rad. Res. Comms.*, 5(3), 131-139, 1988.
- **Sukumar A.** Human nails as a biomarker of element exposure. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology.* Springer, New York, NY, pp 141–177, 2006.
- **Strnad P, Usachov V, Debes C, Gräter F, Parry DA, Omary MB.** Unique amino acid signatures that are evolutionarily conserved distinguish simple-type, epidermal and hair keratins. *J Cell Sci*, 124(24), 4221-32, 2011.

Références bibliographiques

- **Sureda A, del Mar Bibiloni M, Julibert A, Aparicio-Ugarriza R, Palacios-Le Blé G, Pons A, Gonzalez-Gross M, Tur JA.** Trace element contents in toenails are related to regular physical activity in older adults. *PLoS ONE* 12(10):e0185318, 2017.
- **Strzelczak G., Sterniczuk M., Sadlo J., Kowalska M. and Michalik J.** EPR-study of γ -irradiated feather keratin and human fingernails concerning retrospective dose assessment. *Nukleonika* 58(4), 505–509, 2013.
- **Saab SC, Martin-Neto L.** Use of the EPR technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions *Quim. Nova*, 26, pp. 497-498, 2003.
- **Sebetić K, Sjerobabski Masnec I, Cavka V, Biljan D, Krolo I.** UV damage of the hair. *Coll Antropol.* 32 Suppl 2:163-5, 2008.
- **Shadman S, Bahreini M, and Tavassoli SH.** Comparison between elemental composition of human fingernails of healthy and opium-addicted subjects by laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Optics* Vol. 51, Issue 12, pp. 2004-2011, 2012.
- **Swarts SG, Holly Boyle, Gaixin Du, Ann B. Flood, Oleg Grinberg, Jiang Gui, Xiaoming He, Kyo Kobayashi, Jean P. Lariviere, Michael Mariani, Stephen D.P. Marsh, Andres E. Ruuge, Kevin Rychert, Wilson Schreiber, Jason W. Sidabras, Dmitriy S. Tipikin, Dean E. Wilcox, Benjamin B. Williams, Victoria Wood, Harold M. Swartz.** Ex vivo EPR dosimetry: Population-based variables in the radiation-induced and background signals of fingernails. Poster présenté lors du “62th Annual International Meeting Radiation Research Society (RADRES) à Hawaï en octobre 2016.
- **Swets, D. L., Reed, B. C., Rowland, J. R., & Marko, S. E.** A weighted least-squares approach to temporal smoothing of NDVI. 1999 ASPRS Annual Conference, From Image to Information, Portland, Oregon, May 17 – 21, 1999, Proceedings: Bethesda, Maryland, American Society for Photogrammetry and Remote Sensing, 1999.
- **Simonoff JS.** Three Sides of Smoothing: Categorical Data Smoothing, Nonparametric Regression, and Density Estimation. *International Statistical Review /Revue Internationale de Statistique*, Vol. 66, No. 2, pp. 137-156, 1998.

- **Salzer HE.** "Lagrangian interpolation at the Chebyshev points $\cos(nu \pi/n)$, $nu = 0(1)n$; some unnoted advantages", *Computer Journal*, 15,156-159, 1972.
- **Standring, S.** *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice.* 40th ed. Churchill Livingstone, London, 2008.
- **Sarrut, David, et al.** « A Review of the Use and Potential of the GATE Monte Carlo Simulation Code for Radiation Therapy and Dosimetry Applications ». *Medical Physics*, vol. 41, n°6 Part 1, 2014.

T :

- **Trompier, F., L. Kornak, et al.** Protocol for emergency EPR dosimetry in fingernails. *Radiation Measurements*, vol. 42, n° 6, p. 1085-88, 2007.
- **Trompier, F., Battaglini, P., Tikunov, D., Clairand, I.** Dosimetric response of human bone tissue to photons and fission neutrons. *Radiation Measurements*, 43 (2-6), pp. 837-840, 2008.
- **Trompier F, Romanyukha A, Kornak L, Calas C, LeBlanc B, Mitchell C, Swartz H, Clairand I.** Electron paramagnetic resonance radiation dosimetry in fingernails. *Radiat Meas* 44(1):6–10, 2009.
- **Trompier, F., C. Bassinet, et al.** Overview of physical and biophysical techniques for accident dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 144, n° 1-4, p. 571-74, 2011.
- **Trompier François,** 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, Thèse de doctorat en Physique et Chimie des Matériaux, sous la direction de Didier Gourier, Université Pierre et Marie Curie, 2012.
- **Trompier F, Romanyukha A, et al.** State of the Art in Nail Dosimetry: Free Radicals Identification and Reaction Mechanisms. *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 53, n° 2, p. 291-303, 2014.
- **Trompier, François, et al.** « EPR Retrospective Dosimetry with Fingernails: Report on First Application Cases ». *Health Physics*, vol. 106, n° 6, p. 798, 2014.
- **Trompier F, Romanyukha A, Swarts S, Reyes R, Gourier D.** Influence of nails polish in EPR dosimetry with human nails. *Radiation Measurements*. Volume 75, Pages 6-8, 2015.

Références bibliographiques

- **Tipikin DS, Swarts SG, Sidabras JW, Trompier F, Swartz HM.** Possible nature of the radiation-induced signal in nails: high-field EPR, confirming chemical synthesis, and quantum chemical calculations. *Radiation Protection Dosimetry*. 172, 112-120, 2016.
- **Tuccio, B., Lauricella, R. & Charles, L.** Characterisation of free radical spin adducts of the cyclic β -phosphorylated nitron DEPMPO using tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 252, 47–53, 2006.
- **Tucker, James D.** Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: A review of the major considerations for human biological dosimetry. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 659, n° 3, p. 211-20, 2008.
- **Trefethen.** Computing numerically with functions instead of numbers, *Commun. of the ACM*, 2015
- **Takagi Y, Matsuda S, Imai S, Ohmori Y, Masuda T, Vinson JA, Mehra MC, Puri BK, Kaniewski A.** Survey of trace elements in human nails: an international comparison. *Bull Environ Contam Toxicol*. 41(5):690-5, 1988.
- **Tosti A, et al.** J Am Acad Dermatol. Characterization of nail matrix melanocytes with anti-PEP1, anti-PEP8, TMH-1, and HMB-45 antibodies. *J Am Acad Dermatol*. 31(2 Pt 1):193-6, 1994.
- **Trochim, W. M., & Donnelly, J. P.** The research methods knowledge base (3rd ed.). Cincinnati, OH:Atomic Dog, 2006.

U :

- **United Nations et Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.** Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation: UNSCEAR 2016 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. 2017.
- **Uptima.** DTT (DithioThreitol). <http://www.interchim.fr/ft/0/054721.pdf>, 2018.

V :

- **Vellar OD.** Composition of human nail substance *Am J Clin Nutr*, 23, pp. 1271-1274, 1970.

- **Van de Kerkhof, P.C., Pasch, M.C., Scher, R.K., Kerscher, M., Gieler, U., Haneke, E., and Fleckman, P.** Brittle nail syndrome: A pathogenesis-based approach with a proposed grading system. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 53 (4): 644–651, 2005.
- **Vlietstra.** Radiation Burns as a Severe Complication of Fluoroscopically Guided Cardiological Interventions. *Journal of Interventional Cardiology - Wiley Online Library*, 2004.

W :

- **Wilcox DE, He X, Gui J, Ruuge AE, Li H, Williams BB, Swartz HM.** Dosimetry based on epr spectral analysis of fingernails clippings. *Health Physics.* 98, 309-317, 2010.
- **Woda C, Spöttl T.** On the use of OSL of wire-bond chip card modules for retrospective and accident dosimetry. *Radiation Measurements.* 44, 548-553, 2009.
- **Wang L, Wang X, Zhang W, Zhang H, Ruan S, Jiao L.** Determining Dosimetric Properties and Lowest Detectable Dose of Fingernail Clippings from their Electron Paramagnetic Resonance Signal. *Health Phys.* 109(1):10–14, 2015.

Y :

- **Yukihara, E. G., et S. W. S. McKeever.** Optically Stimulated Luminescence (OSL) Dosimetry in Medicine. *Physics in Medicine & Biology*, vol. 53, n° 20, p. R351. 2008.
- **Yang Z, Fang KT, Kotz S.** On the Student's t-distribution and the t-statistic. *Journal of Multivariate Analysis.* Volume 98, Issue 6, Pages 1293-1304, 2007.
- **Yordanov N, Gancheva V, Pelova V.** 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, 1999.

Z :

- **Zhang T, Zhang W, Zhao Z, Zhang H, Ruan S, Jiao L.** Two factors influencing dose reconstruction in low dose range: The variability of BKG intensity on one individual and water content. *Radiation Protection Dosimetry.* 171, 297-303, 2016.
- **Zhang T, Zhao Z, Zhang H, Zhai H, Ruan S, Jiao L, Zhang W.** Effects of water on fingernail electron paramagnetic resonance dosimetry. *Journal of Radiation Research.* 57, 460-467, 2016.

Références bibliographiques

- **Zariyantey AH et al.** Evaluation of Trace Elements in the Nails and Hair of Farmers Exposed to Pesticides and Fertilizers. *Journal of Agricultural Science*, [S.l.], v. 9, n. 13, p. p79, ISSN 1916-9760, 2017.

Annexes

1.1 Les effets des radiations sur les matériaux

L'objectif de cette section est de rappeler les bases des interactions rayonnement-matière de manière non exhaustive afin de sensibiliser le lecteur au domaine de la radioprotection.

1.1.1 Les processus physiques d'interaction rayonnement-matière

Les rayonnements peuvent être classés en deux catégories selon leur nature et la manière dont ils réagissent avec la matière. On oppose ainsi les rayonnements ionisants (comme les rayons X) aux non ionisants (comme la lumière visible). En ce qui concernent les rayonnements ionisants, on distingue là encore deux groupes :

- Les particules chargées telles que les électrons, les positrons, les alpha (noyaux d'hélium), les protons et les ions lourds qui sont directement ionisantes ;
- Les particules non chargées telles que les neutrons et les photons (rayons γ et X) qui sont indirectement ionisantes. Les rayons γ sont émis lors de la désintégration de noyaux radioactifs alors que les rayons X sont générés soit par des transitions électroniques, soit lors du ralentissement des électrons dans la matière (rayonnement de Bremsstrahlung).

La plupart des accidents radiologiques font intervenir des rayonnements indirectement ionisants, principalement des rayons gamma ou X [Coeytaux et al., 2015]. Seules les interactions de ceux-ci avec la matière seront donc précisées ici.

Lorsqu'un faisceau de rayons X ou γ pénètre dans un milieu matériel, on constate une diminution progressive de son intensité tout au long de son parcours. Ce phénomène d'atténuation du faisceau a pour origine l'interaction des photons avec la matière et plus particulièrement avec les électrons qui la constituent. L'énergie du photon incident peut-être soit partiellement, soit totalement absorbée par un des électrons du cortège qui acquiert en conséquence de l'énergie lui permettant de se mouvoir. L'énergie cinétique acquise par l'électron se dissipe ensuite dans le milieu matériel en provoquant des ionisations selon des mécanismes de collision ou de freinage avec les particules élémentaires de l'environnement. Ce transfert d'énergie des électrons mis en mouvement vers le milieu matériel est responsable des conséquences radio-induites constatées dans les matériaux irradiés.

Les photons peuvent donc interagir directement avec les électrons, et plus rarement avec les noyaux. On distingue ainsi 2 principaux processus d'interaction principaux avec les électrons et 2 avec les noyaux résumés succinctement ci-dessous :

- **L'effet Compton** : le photon interagit avec un électron faiblement lié au noyau. L'électron est alors mis en mouvement par ce processus d'échange d'énergie, et le photon diffuse avec une énergie plus faible ;
- **L'effet photoélectrique** : le photon est entièrement absorbé par un électron fortement lié au noyau. L'électron est alors éjecté avec une énergie cinétique égale à la différence entre l'énergie du photon incident et l'énergie de liaison de l'électron dans l'atome ;
- **La diffusion simple** : le photon incident est simplement absorbé par le noyau puis est réémis avec la même énergie dans une direction aléatoire ;
- **L'effet de matérialisation** : le photon s'annihile lorsqu'il pénètre dans le champ coulombien du noyau et donne naissance à une paire de particules chargées, l'électron (e^-) et le positron (e^+) de même masse mais de charge opposée. Ce processus ne se forme qu'au-delà d'une énergie de 1,022 MeV.

Les effets des radiations sur la matière biologique sont les résultats finaux d'une succession de réactions physico-chimiques déclenchées par ces ionisations initiales et qui conduisent à des dommages considérables aux molécules indispensables à la vie.

1.1.2 Les processus chimiques d'interaction rayonnement-matière

Les milieux biologiques sont principalement constitués d'atomes dont le numéro atomique est faible (carbone, azote, oxygène...). Ainsi, les interactions des photons avec la matière organique résultent principalement des phénomènes de collisions avec les électrons. Selon l'énergie du rayonnement incident qui est transmise à l'électron, la molécule sera soit ionisée, soit excitée, ou bien verra sa température augmenter. Notons que cette dernière est sans conséquence étant donné qu'il faudrait délivrer une dose très élevée, environ 10 000 Gy, pour que l'élévation de température soit telle qu'il y ait des conséquences sur la biochimie cellulaire du système biologique.

On distingue 2 types d'actions du rayonnement ionisant avec le milieu organique. D'une part, une action directe sur les molécules qui constituent la cellule (protéines, lipides, sucres et acides nucléiques), provoquant des lésions radio-induites au niveau de celles-ci. D'autre part, une action indirecte due aux interactions des produits de la radiolyse de l'eau avec le milieu.

Nous avons vu précédemment qu'un transfert énergétique du flux photonique vers le milieu matériel pouvait s'opérer par l'intermédiaire d'électrons mis en mouvement. Les molécules ainsi excitées et ionisées présentent un surplus d'énergie et deviennent instables. Cet excédent d'énergie peut être expulsé soit via un mécanisme d'émission de photons suivi d'un retour à l'état initial (phénomène de fluorescence), soit via une rupture d'une liaison covalente qui engendre la scission de la molécule en deux radicaux. Il est plus probable que la molécule se scinde après une ionisation qu'après une excitation car la quantité d'énergie mise en jeu est plus grande dans le 1^{er} cas. La rupture ne nécessite pas forcément que l'évènement initial ait porté sur un électron de cette liaison. En effet, l'énergie absorbée peut migrer au sein de la molécule et la rupture se produit souvent au niveau de la liaison la plus faible.

1.2 Le traitement des victimes irradiées

Selon le type d'accident radiologique, l'équipe médicale prendra en charge la victime de différentes manières [Bertho et al., 2006, de Revel et al., 2005, Hérodin et al., 2003, Lazard et al., 1967]. La réponse médicale ne sera pas la même selon qu'il s'agit d'une irradiation externe globale du corps entier, externe localisée sur un organe ou d'une contamination interne par un radionucléide. D'un point de vue médical, trois cas de figure existent :

- Le syndrome aigu d'irradiation : la victime est transportée dans un centre médical d'hématologie (risque d'aplasie au niveau de la moelle osseuse qui est radiosensible) ;
- Les brûlures localisées : la victime est internée pendant une période relativement longue dans un centre dédié aux grands brûlés ;
- La contamination interne : la victime doit être décontaminée très rapidement.

La nature de l'irradiation doit impérativement être prise en compte afin d'établir un diagnostic médical robuste pour traiter efficacement la victime. Le domaine qui nous intéresse ici concerne les irradiations localisées dans le cas des accidents radiologiques localisés au niveau des mains. Ce type d'irradiation se traduit par l'apparition de brûlures semblables à celles thermiques. Cependant, l'évolution de ce type de brûlures diffère par rapports aux thermiques. Contrairement à une brûlure thermique qui est bien définie dans le volume et qui n'évoluera que dans sa zone d'impact, la brûlure radiologique quant à elle va évoluer sur plusieurs mois voire quelques années en se manifestant par des vagues successives inflammatoires hyperalgiques. Une des conséquences d'une irradiation localisée sévère, est la nécrose des tissus irradiés à la fois en surface et en profondeur.

D'un point de vue thérapeutique pour les cas d'irradiation sévères, la technique classique d'exérèse des tissus irradiés reste peu efficace. En effet, après avoir retiré chirurgicalement les parties nécrosées et avoir eu recours aux techniques d'autogreffe de peau, le processus morbide auto-entretenu est très compliqué à éradiquer et perdure très

longtemps. A contrario, les thérapies cellulaires, e.g, les greffes de cellules souches mésenchymateuses, offrent des résultats très prometteurs et il y a fort à parier que, d'ici quelques années, certains cas sévères d'irradiations localisées pourront être traités via ce processus.

1.3 L'interaction hyperfine

Les nucléons possèdent également un moment cinétique orbital $\vec{l}$ lié à leur mouvement (noté $l = 0, 1, 2, \dots$) et un moment cinétique de spin $\vec{s}$ ($s = 1/2$). Le spin nucléaire du noyau, noté I , résulte de la somme des moments cinétiques de tous ses nucléons. Dès lors, deux cas de figures apparaissent : si le nombre de nucléons est pair alors I est nul ou $I \in \mathbb{N}$; s'il est impair, l'état fondamental est paramagnétique avec $I \in \mathbb{N} / 2$.

Lorsque le noyau est paramagnétique, son moment magnétique s'écrit $\mu = g_N \beta_N I$ avec g_N qui dépend du nombre de protons et de neutrons, et le magnéton de Bohr

$$\beta_N = \frac{eh}{4\pi m_p} \quad \text{où } m_p \text{ est la masse du proton. En choisissant arbitrairement } I \text{ dans la direction}$$

z , on a I_z qui peut prendre l'une des $(2I + 1)$ valeurs $M_I = -I, \dots, +I$.

Dans un atome libre, toutes les directions sont équivalentes et le moment magnétique résultant est isotrope. L'interaction hyperfine entre les électrons non-appariés et le noyau de spin I est elle-aussi isotrope. Son Hamiltonien s'écrit :

$$H_{\text{hyperfine}} = A \vec{S} \cdot \vec{I} \quad \text{Avec } A \text{ la constante hyperfine.} \quad (37)$$

Afin d'expliciter ce phénomène, nous allons voir ici le cas simple du système isotrope.

Le régime isotrope

Dans le cas de solutions fluides par exemple, les molécules paramagnétiques suivent un mouvement brownien de rotation et s'orientent de manière aléatoire et équiprobable face au champ magnétique. Il en résulte ainsi un phénomène de moyennage qui tend à faire disparaître du spectre RPE les effets d'anisotropie. Par conséquent, le moment magnétique

électronique et l'interaction hyperfine avec les noyaux sont décrits par les relations suivantes où les nombres g et A sont des valeurs moyennes notées g_{iso} et A_{iso} :

$$\begin{aligned}\vec{\mu} &= -g_{iso} \beta \vec{S} \\ H_{hyperfin} &= A_{iso} \vec{S} \cdot \vec{I}\end{aligned}\quad (38)$$

Dans les radicaux libres, l'électron non-apparié occupe une orbitale moléculaire délocalisée sur plusieurs atomes et il peut interagir avec différents noyaux paramagnétiques comme l'hydrogène (H), le carbone (C) ou bien l'azote (N). Ces interactions créent une structure hyperfine bien caractéristique et visible sur le spectre RPE. Elle est déterminée par la distribution de la population de spin sur les différents atomes de la molécule et constitue une véritable signature spectroscopique du radical.

Considérons maintenant un centre paramagnétique de spin S placé dans un champ magnétique B . En régime isotrope, l'interaction de ses électrons non-appariés avec B s'écrit $g_{iso} \beta \vec{B} \cdot \vec{S}$. Nous supposons que ces électrons interagissent aussi avec un noyau de moment $g_N \beta_N \vec{I}$ de sorte que l'Hamiltonien résultant des interactions auxquelles est soumis le système paramagnétique s'écrit :

$$H = g_{iso} \beta \vec{B} \cdot \vec{S} + A_{iso} \vec{S} \cdot \vec{I} \quad (39)$$

Il existe également un terme $-g_N \beta_N \vec{B} \cdot \vec{I}$ dû à l'interaction entre le moment du noyau et le champ, mais étant donné la faible valeur du magnéton de Bohr nucléaire, il est négligé quand on s'intéresse au spectre RPE.

Considérons un repère orthonormé (x, y, z) tel que z soit parallèle à $\vec{B}$.

$$H = g_{iso} \beta B S_z + A_{iso} (S_x I_x + S_y I_y + S_z I_z) \quad (40)$$

L'expression 40 peut être simplifiée en :

$$H = g_{iso} \beta B S_z + A_{iso} S_z I_z \quad (41)$$

Les valeurs possibles pour S_z étant $M_s = -S, -S + 1, \dots, +S$ et celles de I_z étant $M_I = -I, -I + 1, \dots, +I$. Les valeurs possibles des états énergétiques sont de la forme suivante :

$$E(M_s, M_I) = g_{iso} \beta B M_s + A_{iso} M_s M_I \quad (42)$$

Il existe donc $(2S + 1)(2I + 1)$ niveaux d'énergie. Or, il existe une règle de sélection qui stipule que $\Delta M_s = 0$ et $\Delta M_I = \pm 1$ pour qu'il y ait une transition entre deux niveaux

énergétiques distincts. Ainsi, les transitions du niveau énergétique $E(M_S, M_I) = g_{iso} \beta B M_S + A_{iso} M_S M_I$ ne peuvent avoir lieu que vers deux niveaux :

$$\begin{aligned} E(M_S + 1, M_I) &= g_{iso} \beta B (M_S + 1) + A_{iso} (M_S + 1) M_I \\ E(M_S - 1, M_I) &= g_{iso} \beta B (M_S - 1) + A_{iso} (M_S - 1) M_I \end{aligned} \quad (43)$$

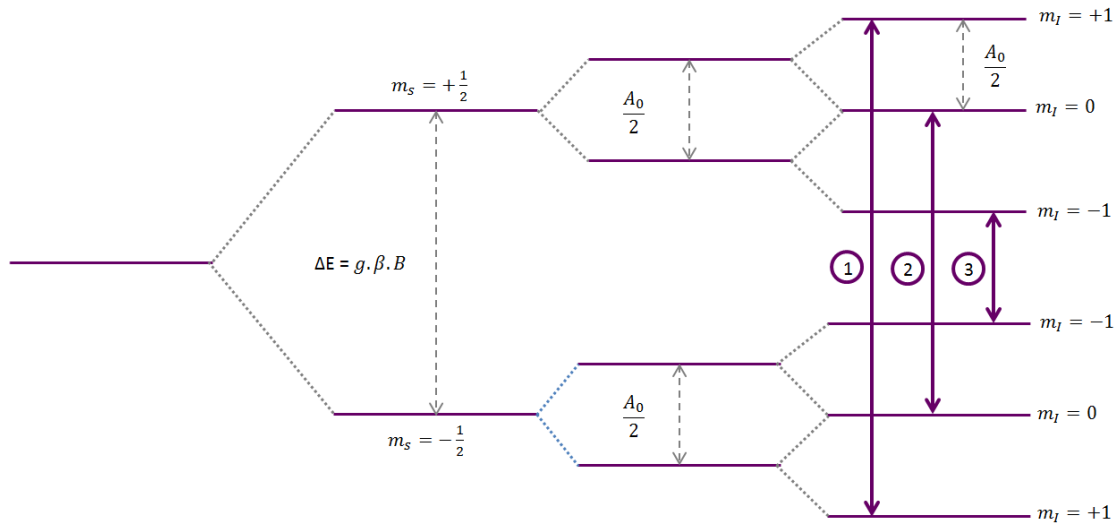


Figure 118 Schéma récapitulatif de l'interaction hyperfine dans le cas simple d'un régime isotrope et d'un système paramagnétique de spin électronique $S=1/2$ et nucléaire $I=1/2$ ou $I=1$. Les transitions énergétiques possibles, i.e qui satisfont les conditions de transition énergétiques $\Delta M_S = 0$ et $\Delta M_I = \pm 1$, sont notées 1, 2 et 3.

Les deux transitions ont la même énergie $\Delta E = g_{iso} \beta B + A_{iso} M_I$ et les champs de résonance sont donnés par :

$$B(M_I) = B_0 - \frac{A_{iso}}{g_{iso} \beta} M_I \quad \text{avec} \quad B_0 = \frac{h \nu}{g_{iso} \beta} \quad (44)$$

Le spectre comporte donc autant de raies de résonance que de valeurs de M_I soit $(2I + 1)$ et la

séparation de ces raies est égale à $\frac{A_{iso}}{g_{iso} \beta}$. L'interaction hyperfine crée donc un motif de $(2I+1)$ raies équidistantes et centrées en B_0 . Tout comme le facteur g , la constante de couplage hyperfine peut elle aussi être anisotrope et ses valeurs seront différentes selon l'orientation du système paramagnétique avec le champ magnétique.

1.4 L'imagerie 2D par spectroscopie RPE

La spectroscopie RPE en onde continue permet, comme nous l'avons vu précédemment, d'obtenir de précieuses informations quant à la nature de l'entité paramagnétique étudiée et son environnement chimique. Cependant, il arrive que l'utilisateur ait besoin d'informations supplémentaires concernant la distribution spatiale des spins électroniques au sein du système. Il n'est pas possible d'effectuer de l'imagerie RPE en onde continue puisque les longueurs d'ondes absorbées par les centres paramagnétiques pour induire les transitions énergétiques sont trop importantes ($\approx 10 \mu\text{m}$) [Maya, 2015]. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des gradients de champs magnétiques pour lever la dégénérescence des populations de spins électronique sélectivement dans le plan considéré. La cartographie des densités de spins électroniques au sein du matériau étudié est alors possible. La figure 119 présente le principe général de l'imagerie RPE en 2 dimensions.

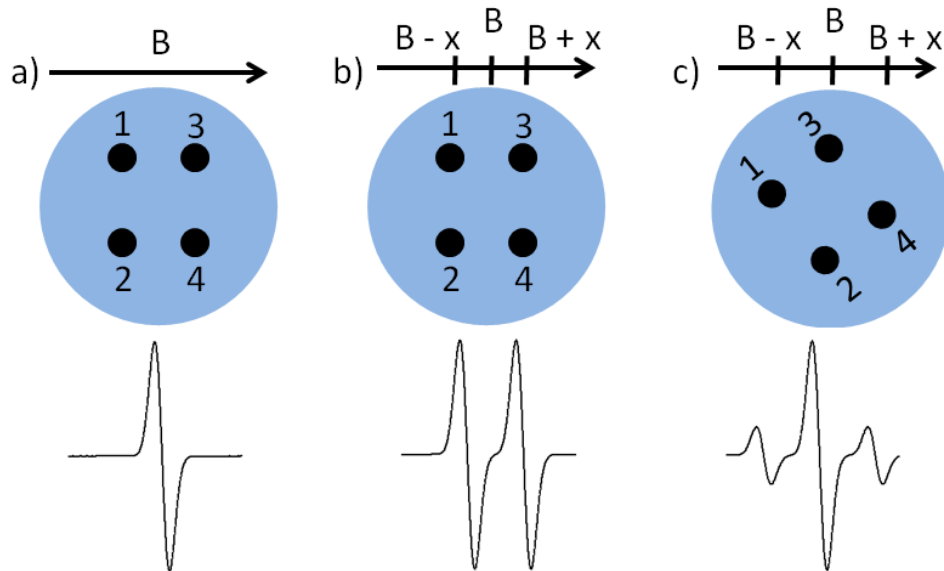


Figure 119 Impact du gradient en champ magnétique sur un système paramagnétique composé de 4 centres identiques. a) Champ magnétique statique dans la direction x . b) Champ magnétique modulé dans la direction x . c) Champ magnétique modulé dans la direction x avec rotation du système de 45° .

Considérant un système paramagnétique composé de 4 centres distribués sur un plan 2D, arbitrairement (x,y) , et soumis à un champ magnétique statique B . Le signal RPE résultant sera composé de seulement une raie d'absorption centrée en $B_{rés} = B$. Dans ce cas, aucune

information quant à la distribution spatiale de ces centres paramagnétiques ne pourra être obtenue.

A contrario, si l'on applique un gradient de champ magnétique dans la direction x par exemple (figure 119 b), il sera alors possible d'obtenir des informations spatiales quant aux positions des centres 1, 2, 3 et 4. Dans ce cas, les raies d'absorption des entités paramagnétiques apparaîtront respectivement pour un champ magnétique $B_{rés1} = B - x$ pour les centres 1 et 2 et $B_{rés2} = B + x$ pour les centres 3 et 4. L'information spatiale sur la répartition des spins électroniques est donc accessible. Des intensités de raies RPE égales indiquent une densité de spin électronique égale.

En changeant l'orientation du système par rapport au gradient de champ magnétique, il est donc possible d'obtenir une répartition spatiale des spins électroniques et donc d'obtenir une cartographie (figure 119 c). En pratique, il est plus précis de faire varier l'orientation du champ magnétique plutôt que le système paramagnétique. Si l'orientation du champ magnétique est balayé de 0 à 180° , il est alors possible d'obtenir une image en 2 dimensions de la répartition des spins électroniques (figure 120). La dernière étape consiste à utiliser des algorithmes de rétroprojection pour reconstruire l'image RPE [Maltempo et al., 1987].

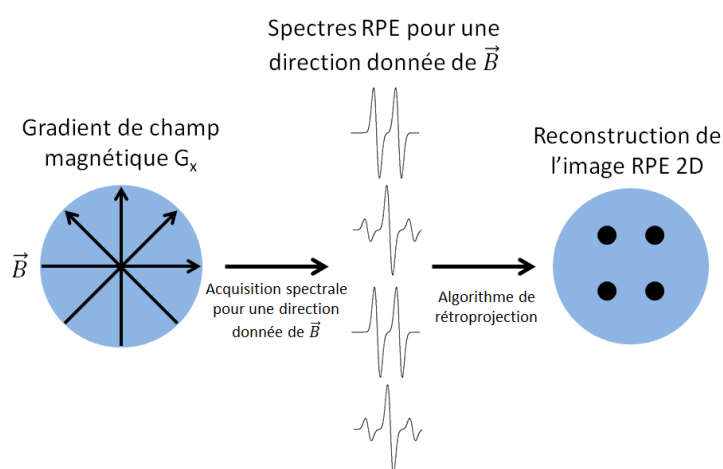


Figure 120 Principe général de l'imagerie RPE en 2 dimensions.

En spectroscopie d'imagerie RPE, le champ de résonance $B_{rés}$ devient :

$$B_{rés} = B + x \cdot G_x = \frac{h \nu}{g \beta} \quad (45)$$

Avec $B_{rés}$ le champ magnétique résonant, G_x le gradient de champ magnétique linéaire (en Gauss.cm⁻¹), x la position du centre paramagnétique (cm), h la constante de Planck, β le magnéton de Bohr et ν la fréquence micro-onde (Hz). Les gradients de champ magnétique permettent une corrélation entre les positions des spins électroniques et les champs de résonance $B_{rés}$.

1.5 Les protocoles de dosimétrie RPE sur les ongles

Si l'émail dentaire et les tissus osseux posent des problèmes du point de vue du prélèvement ou de la mesure *in vivo*, les ongles et les cheveux présentent le grand avantage d'être très facilement récupérables et mesurables dans la plupart des spectromètres les plus courants (fréquences de 9 GHz, 34 GHz, et même 90 GHz). Jusqu'à présent, plusieurs études dosimétriques ont d'ores et déjà été réalisées sur les ongles appartenant plusieurs victimes réelles d'accidents radiologiques [Trompier et al., 2014, Romanyukha et al., 2014]. L'objectif de cette partie est de présenter les différents protocoles de dosimétrie RPE qui existent et d'en discuter les limites.

1.5.1 Saturation du signal radio-induit RIS 5 avec la dose

Trois accidents récents sont survenus lors de la fixation d'une source radioactive de d'iridium d'une gamma-caméra : en Tunisie en 2008, au Gabon en 2010 et au Pérou en 2012. La dosimétrie RPE des ongles prélevés chez les victimes lors de ces accidents a été réalisée par l'IRSN en 2014 selon une méthode de détermination de la dose de saturation des radicaux radio-induits stables [Trompier et al., 2014]. Afin d'illustrer cette méthode, l'accident survenu au Gabon sera pris comme exemple.

Deux échantillons d'ongles ont été prélevés sur la victime : un non irradié (de la main droite) et un second (de la main gauche) irradiée lors de l'accident. Le protocole consistait à réaliser une première mesure pour les deux échantillons préalablement traités d'un l'eau : le signal endogène pur pour l'ongle sain, le signal radio-induit RIS 5 pour l'irradié.

Ensuite, chacun des deux échantillons ont été post-irradiés, retraités dans l'eau et remesurés jusqu'à obtention des doses saturation de chaque aliquote. Un schéma explicatif de cette méthode est donné en Figure 121. La différence entre les deux doses de saturation, i.e entre l'échantillon sain et l'échantillon irradié, était de 38 Gy, ce qui reflète la dose absorbée lors de l'accident.

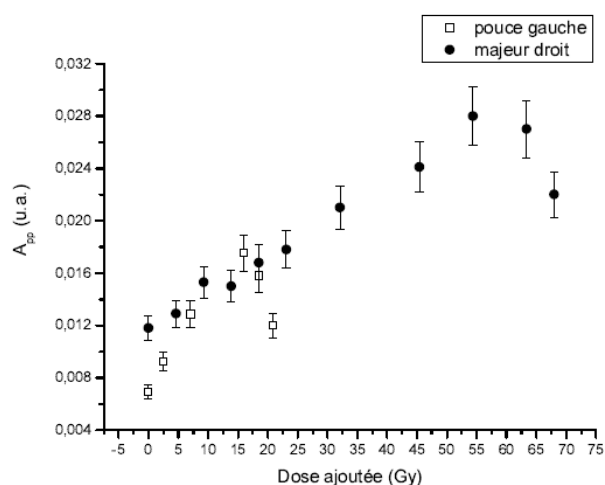


Figure 121 Protocole dosimétrique basée sur la dose de saturation du signal radio-induit stable. Les cercles remplis représentent la variation du signal radio-induit avec la dose pour l'échantillon sain et les carrés vides pour l'échantillon pré-irradié. La différence entre les deux maxima correspond à la dose absorbée lors de l'accident. Image : Trompier 2012.

Cette méthode de dosimétrie rétrospective possède néanmoins un inconvénient majeur qui est le temps nécessaire à l'obtention des doses de saturation [Trompier et al., 2014, Marciniak et al., 2014]. Il s'agit en effet d'un long processus d'irradiations multiples réalisé à la fois sur les échantillons irradiés pendant l'accident et ceux non exposés. Selon Trompier et al., (2014) la valeur de la dose de saturation doit être théoriquement être la même pour tous les doigts d'un individu donné, mais elle varie en pratique d'une personne à l'autre. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de la remesurer à chaque fois ce qui est limitant pour les délais d'expertise.

1.5.2 Courbe d'étalonnage universelle

En dépit de la forte variabilité en intensité des signaux radio-induits notamment avec les conditions de préparation des échantillons (taille, masse, taux d'humidité intrinsèque...), Romanyukha et al., (2014) ont émis l'hypothèse qu'il était possible d'utiliser une courbe d'étalonnage universelle de réponse en dose. Pour élaborer cette dernière, ils ont mesurée l'intensité du *RIS* global (*RIS* 2 + *RIS* 5) à différentes doses (0, 3, 8, 12 et 25 Gy) pour des échantillons d'ongles préalablement préparés de manière strictement identique (nombre de coupes, taille des morceaux, masse...) et en utilisant un spectromètre en bande X (Figure 122). Aucun traitement spécifique ne précédait les mesures RPE ; ainsi, les signaux radio-induits mesurés étaient superposés aux signaux mécaniquement induits et endogène. Notons également que la quantité de matière nécessaire pour acquérir un spectre RPE en bande X est 10 à 15 fois plus importante. Or, on ne connaît jamais à l'avance la quantité potentiellement récupérable chez la victime. L'utilisation généralisée de ce type de courbe universelle semble tout de même compliquée puisqu'une légère différence dans la préparation de l'échantillon avant l'acquisition spectrale engendrerait une estimation de dose erronée.

La dose de 14 ± 3 Gy reconstruite de l'accident avec cette méthode concorde avec la dose de 19 ± 6 Gy obtenue par la méthode des ajouts dosés. Cette méthode est basée sur les résultats d'études antérieures de Reyes et al., (2012, 2009) qui a montré que si les échantillons étaient préparés strictement de la même manière (géométrie, masse et teneur en eau), leurs réponses à la dose étaient alors très similaires, et ce, même pour des individus différents. Cette méthode non invasive et non destructive permet des évaluations de dose rapides sans préparation spécifique des échantillons ni d'irradiations supplémentaires. Néanmoins, une évaluation de sa précision nécessite l'examen de la dispersion inter-individu de la sensibilité face aux rayonnements ionisants mais aussi de la reproductibilité limitée de la préparation des échantillons (longueur des coupures, masses, teneur en eau...).

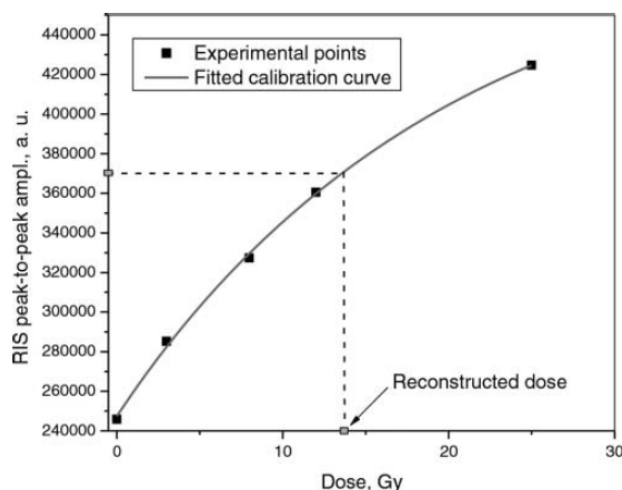


Figure 122 Courbe d'étalonnage universelle du signal radio-induit stable. Les lignes en pointillés relient l'amplitude mesurée de l'ongle irradié et la dose reconstruite de 14 Gy. Image : Romanyukha et al., (2014).

Les doses mesurées par RPE dans les ongles dans l'exemple présenté ci-dessus ont approximativement concordé avec les symptômes cliniques et les doses déterminées par la dosimétrie RPE sur les fragments osseux des victimes ou par reconstitution numérique des conditions d'irradiation de l'accident [Trompier et al., 2014].

1.5.3 Saturation du signal radio-induit RIS 5 avec la puissance micro-onde

Un protocole original a été proposé par Choi et al., (2014) basé sur la variation du coefficient de courbure obtenu en traçant l'amplitude du signal RPE radio-induit global avec la puissance micro-onde. Une fois récupérés, les échantillons ont été irradiés par une source de césium puis redécoupés pour tenter de reproduire le plus juste possible les étapes suivant un accident radiologique. Les aliquotes ont été ensuite séchées dans un four à 70 °C pendant 72 heures afin de minimiser le taux d'humidité intrinsèque dans les ongles puis ont été mesurés à différentes puissances micro-ondes l'aide d'un spectromètre bande X. Le protocole développé par ces derniers peut être résumé en ces 4 étapes :

1. Récupérer des ongles sains, les irradiés à différentes doses entre 0 et 3 Gy (pour mener l'expérience). Après irradiation, les échantillons ont été coupés à nouveau ;

2. Déshydrater les échantillons d'ongles 72 heures dans un four chauffé uniformément à 70 °C avant de mesurer les signaux RPE pour différentes puissances de rayonnement micro-onde ;

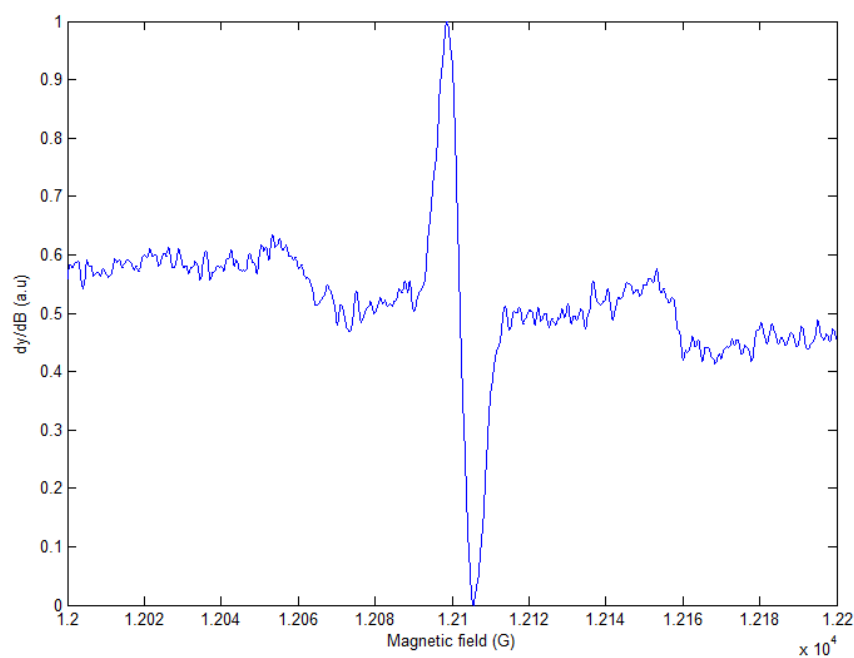
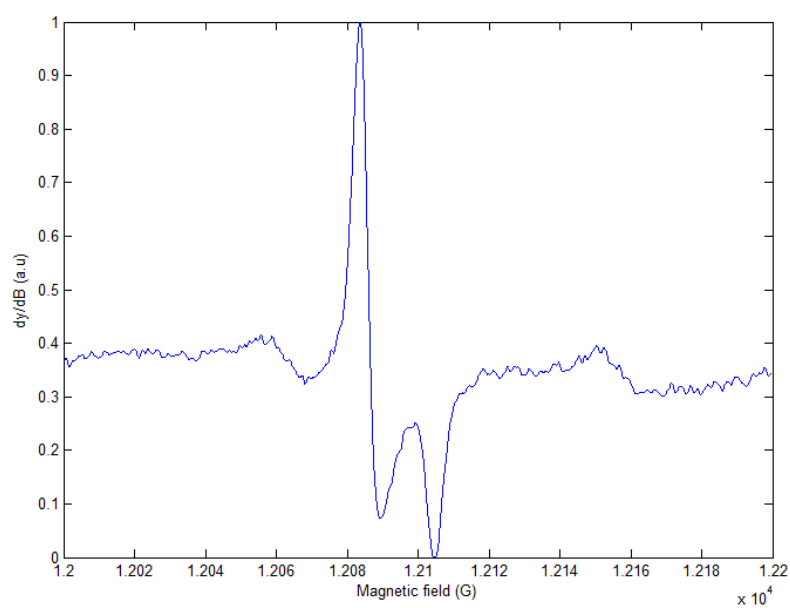
3. Tracer le graphe $\log\left(\frac{S}{P^{1/2}}\right)=f(\log(P))$ avec S l'amplitude pic à pic du signal RPE et P la puissance micro-onde. L'allure du graphe peut-être approximée par la fonction

$$y=e^{a+b\cdot x+c\cdot x^2} \text{ avec } y=\log\left(\frac{S}{P^{1/2}}\right) \text{ et } x=\log(P) ;$$

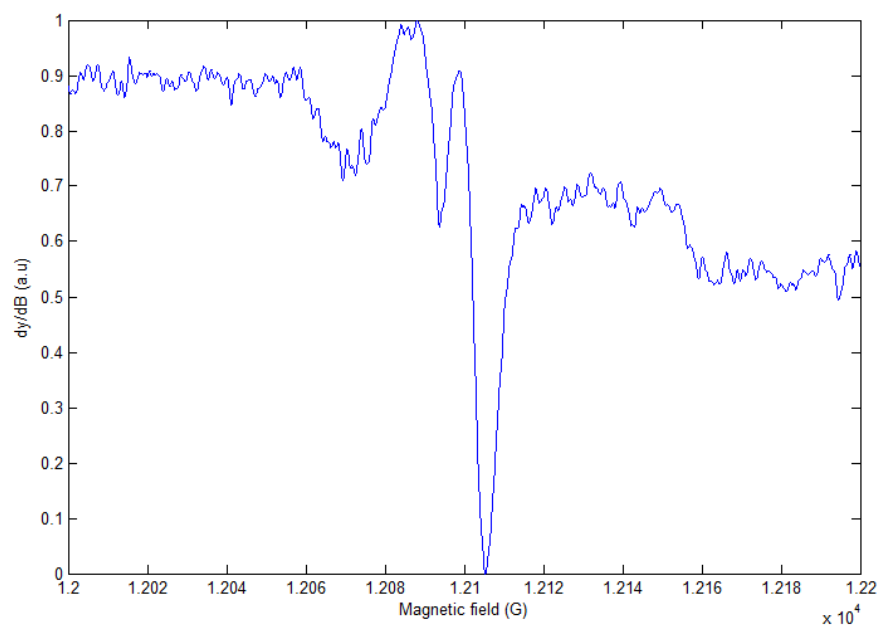
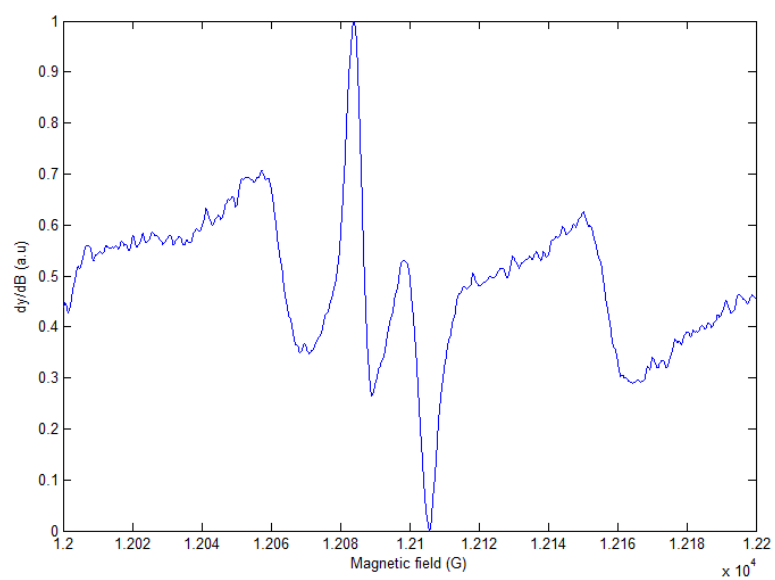
4. Calculer le coefficient de courbure de la fonction K tel que $K=|2ce(a-\frac{b^2}{4c})|$ et tracer K en fonction de la dose.

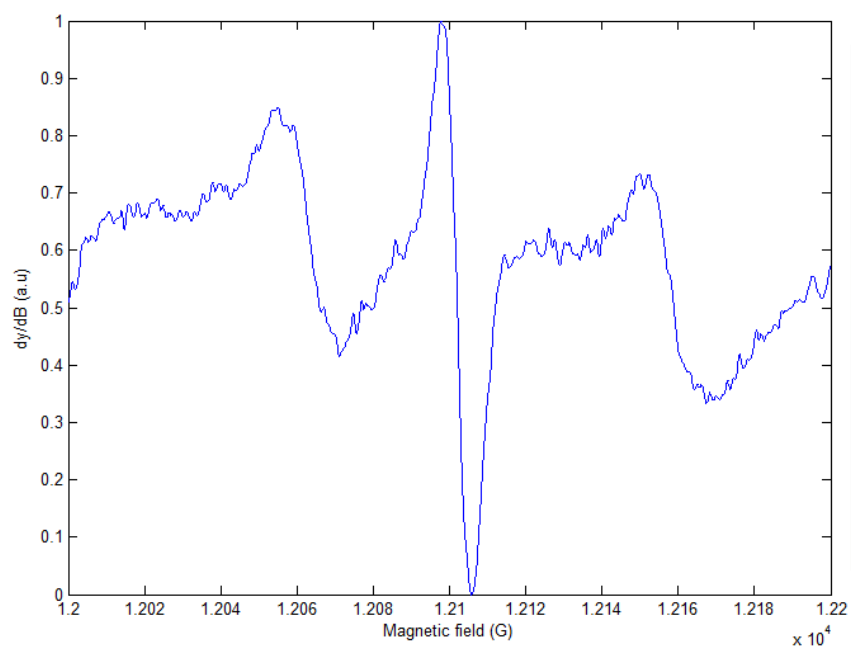
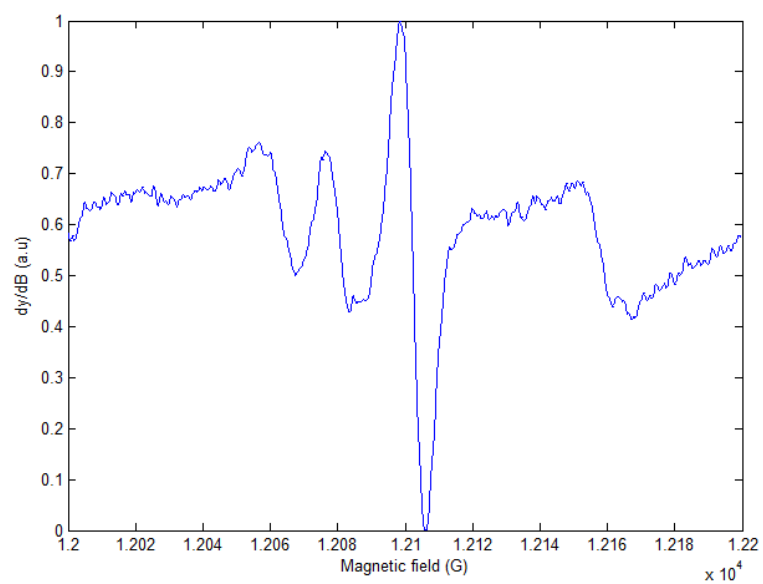
D'après ces auteurs, les entités paramagnétiques et leur environnement proche ont subi des transformations provoquant une différenciation des temps de relaxation entre les radicaux radio-induits, mécaniquement-induits et endogène. Dans leurs études, les amplitudes du signal radio-induit global et du *MIS 2* ont un comportement différent face à la puissance micro-ondes appliquée. Ils ont pu ainsi calculer un coefficient de courbure obtenu en traçant l'amplitude du signal RPE radio-induit global avec la puissance micro-onde et ont montré une relation linéaire avec la dose absorbée dans la gamme de 0 à 3 Gy, prouvant ainsi un fort potentiel de ce procédé pour des applications dosimétriques. Seulement, on note d'importantes disparités de ce coefficient de courbure et dès lors que la dose est supérieure à 3 Gy, le protocole ne fonctionne plus.

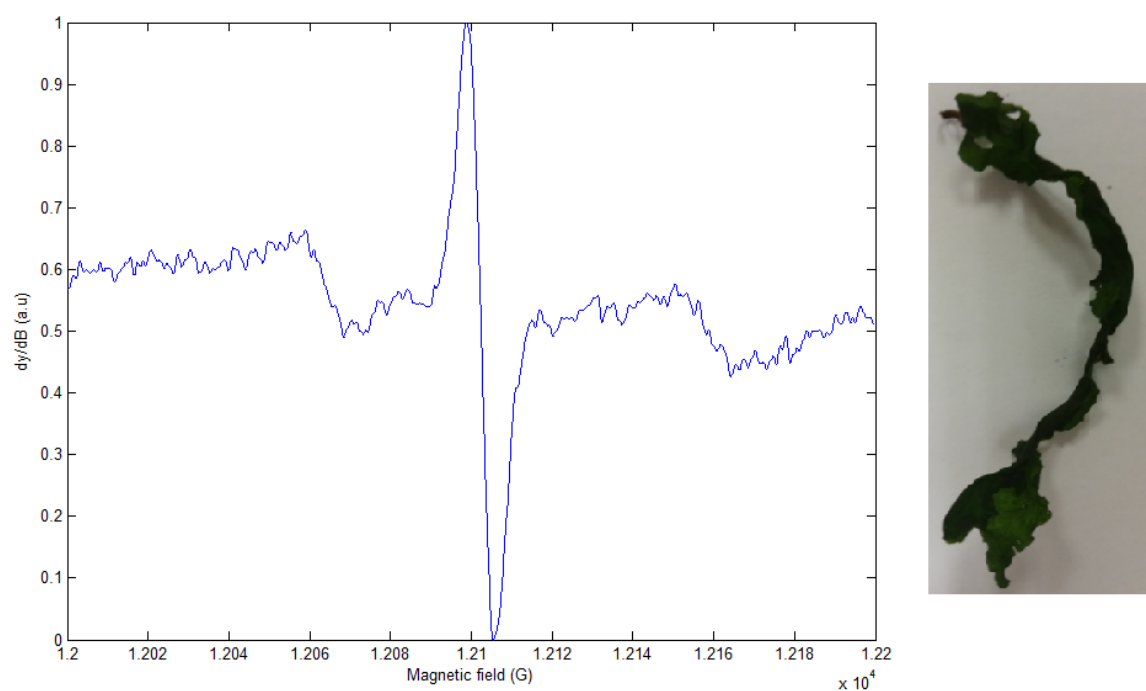
1.6 Algues marines étudiées en spectroscopie RPE



Annexes







1.7 Simulations spectrales des radicaux libres susceptibles d'être générés dans la kératine

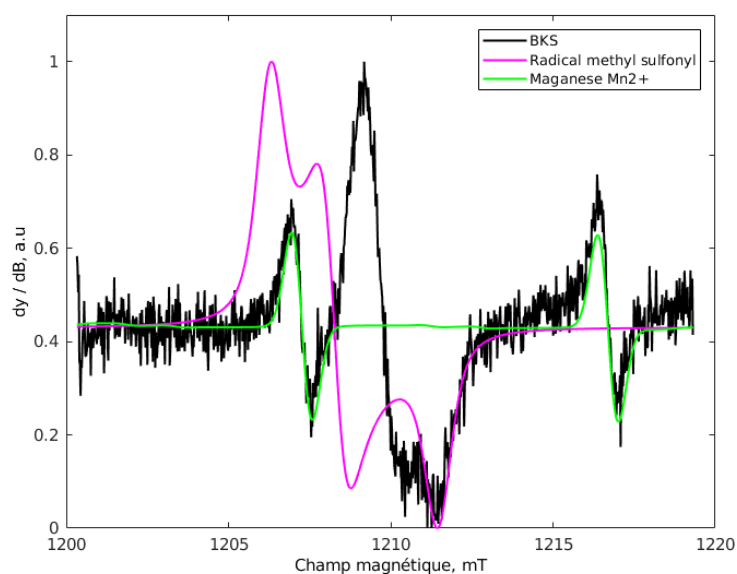


Figure 123 : Spectres RPE du signal endogène *BKS* d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical méthylsulfonyl.

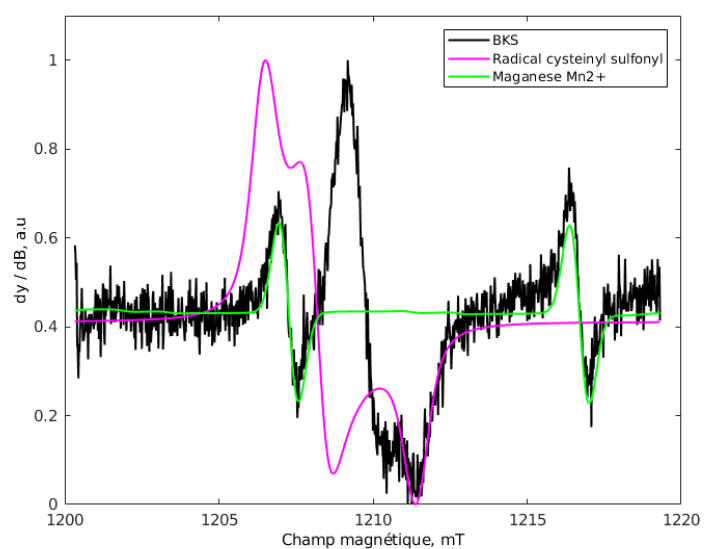


Figure 124 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical cystéinyl-sulfunoyl.

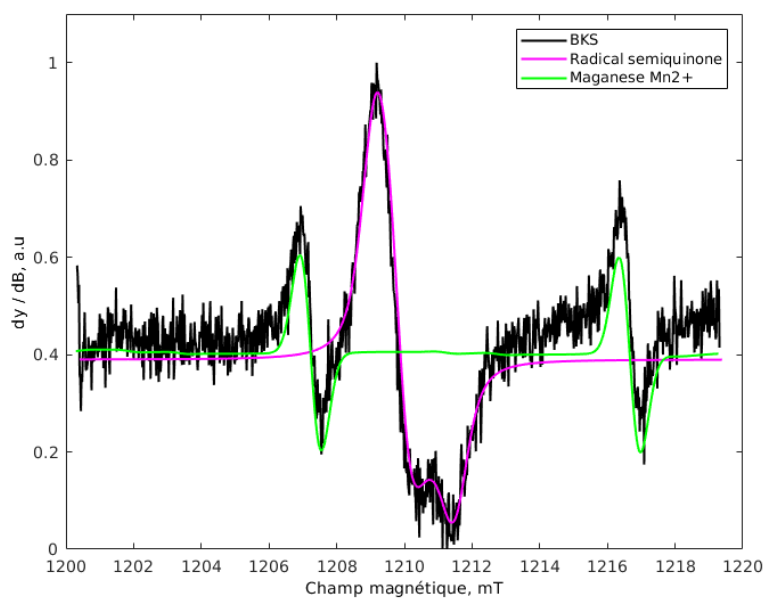


Figure 125 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical semiquinone.

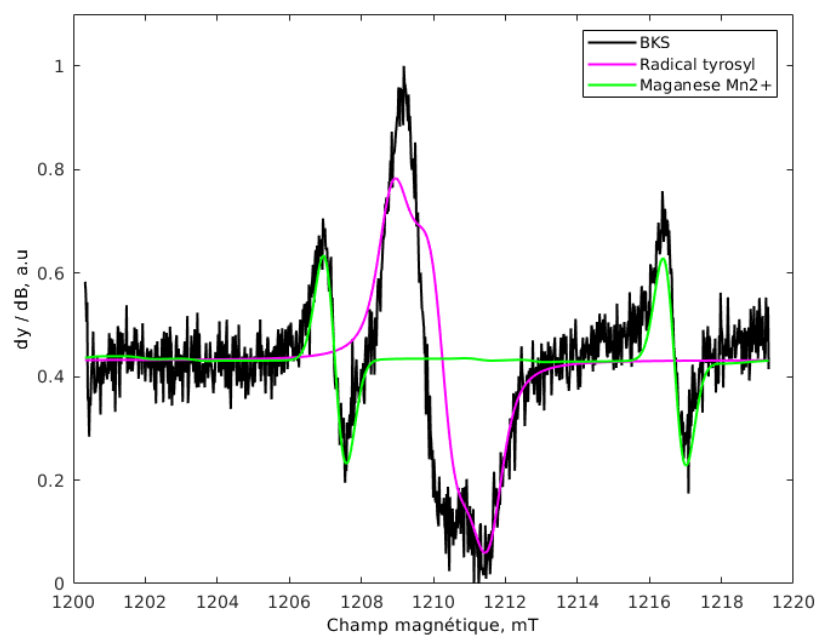


Figure 126 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical tryosyl.

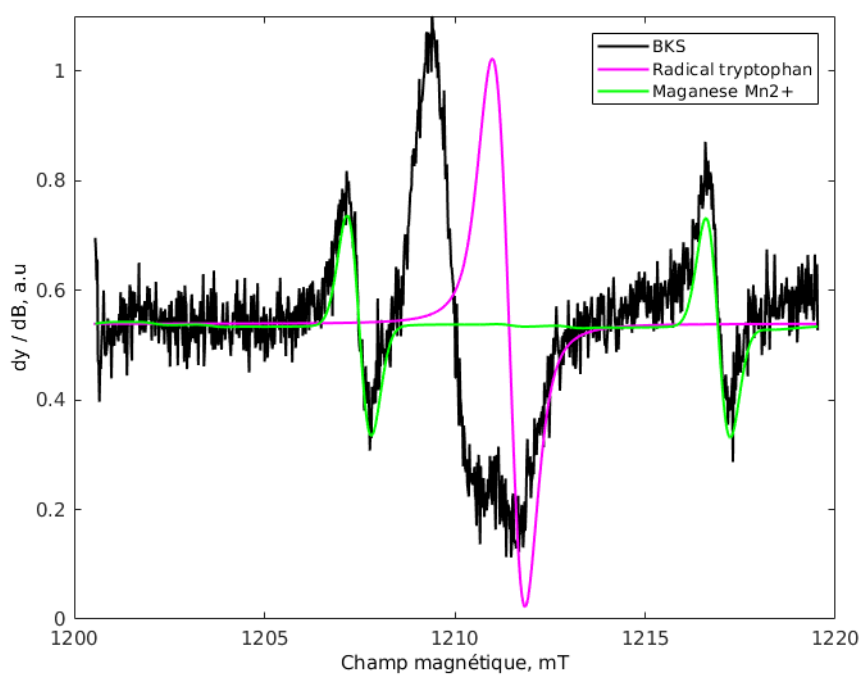


Figure 127 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical tryptophane.

1.8 Irradiations Alphée



FICHE DE MESURE

PRP-HOM/SDE/LDRI
Alphée

SDE/LDRI/ALPHEE/FRM-06 Ind. 2
page 1/17

Date de la mesure : 1/31/2018
Demandeur : Tkatchenko

Mesure du TOP du jour :

Configuration Energie : X4
 Champs : 30 x 30 cm²
 Position : 16 mm
 Chambre : 0,3flex 31013 - 01982
 Débit : 264 UM/min

mesures de 1000 UM :

	nC	UM délivrées	nC/UM	nC/UM (avec corr. kTP)
1	64.11	200.0	0.32055	0.326097573
2	64.05	200.0	0.32025	0.325792381
3	64.07	200.0	0.32035	0.325894112
4	64.07	200.0	0.32035	0.325894112
5	64.09	200.0	0.32045	0.325995842
moyenne	64.1	200.0	0.320390	0.325935
ecart type	0.02280351	0	0.00011402	0.000115991
ratio	0.04%	0.00%	0.04%	0.04%

1.9 Méthode de comparaison des densités de probabilité

L'IRCP de Chimie Paris a développé, au cours de la thèse de Mariem El Afrit, une méthode statistique permettant de comparer la distribution de deux densités de probabilité. Étant donné que nous avons travaillé ensemble pendant plus d'un an, j'utilise leur méthode pour l'appliquer à ma thèse.

Nous avons vu dans la partie « 2.1 Caractérisation théorique du bruit » que le bruit généré par le spectromètre RPE suivait une densité de probabilité normale $N(\mu, \sigma)$. Voici

les différentes étapes nécessaires pour comparer la distribution des résidus (par exemple la différence entre un spectre bruité et non bruité) à la distribution du bruit expérimental :

1. Calculer la moyenne et l'écart-type au carré du bruit qui constituent de bons estimateurs de l'espérance et de la variance ;
2. Générer la densité de probabilité normale $N(\mu, \sigma)$ caractéristique du bruit. La probabilité de tirer une valeur de bruit dans un intervalle quelconque $[a, b]$ est

$$p(x \in [a, b]) = \int_a^b f(x) dx \text{ avec bien-sûr } p(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) dx = 1 ;$$

3. Générer l'histogramme des N résidus. À chaque « bin » de l'histogramme, i.e intervalle $[a, b]$, est associée une fréquence d'apparition de la valeur du résidu notée

H . Or, nous avons vu que l'espérance du bruit valait $N \cdot p = N \int_a^b f(x) dx$ et que son écart-type valait $\sqrt{N \cdot p(1 - N \cdot p)}$. Ainsi, si $H = N \cdot p \pm \sqrt{N \cdot p(1 - N \cdot p)}$, alors cela revient à dire que la distribution des résidus est compatible au moins à 68 % avec la densité de probabilité du bruit.

Le schéma suivant résume ces différentes étapes :

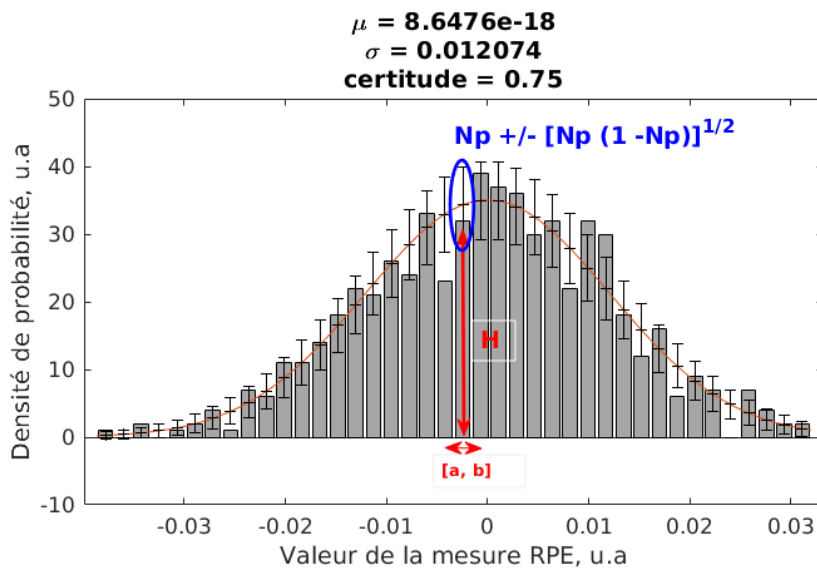


Figure 128 Explication de la méthode statistique permettant de comparer deux distributions entre elles.

1.10 Codes développés au cours de la thèse

1.10.1 Filtre linéaire passe-bas

```
function [Frequence_coupure_opti,Spectre_debruite] = ...
    best_seuil_fft(Condition,Spectre_experimental,spc_theorique,Bruit, spc_theorique_bruite)
    warning('off')
    [Frequence_coupure, Spectre_debruite]=low_pass_filter(Spectre_experimental,Bruit,Condition);
    for k = 1 : length(Frequence_coupure)
        l = Frequence_coupure(k);
        li = l;
        lf = length(spc_theorique_bruite) - l;
        t = fft(spc_theorique_bruite);
        t(li:lf)=0;
        spc_theorique_debruite(:,k) = real(ifft(t));
        Norme_infinie(k) = 100 * norm(spc_theorique-spc_theorique_debruite(:,k),inf);
    end
    [Y_Best, X_Best] = min(Norme_infinie);
    Frequence_coupure_opti = Frequence_coupure(X_Best);
    Spectre_debruite = Spectre_debruite{Frequence_coupure_opti};
end
```

```
function [Frequence_coupure, Spectre_debruite]=low_pass_filter(Spectre_experimental,Bruit,Condition)
N = length(Spectre_experimental);
Spectre_Frequence = fft(Spectre_experimental);
seuil = 1:1:N/2;
[mu, sigma] = normfit(Bruit);
j=1;
while seuil(j) < N
    l = seuil(j);
    li = ceil(l);
    lf = N-l;
    t = Spectre_Frequence;
    t(li:lf)=0;
    Spectre_debruite = real(ifft(t));
    R = Spectre_debruite - Spectre_experimental;
    E(j) = Compatibilite_residus(R,[mu, sigma],Condition);
    Spc_D{j} = Spectre_debruite;
    j=j+1;
end
Frequence_coupure = (find(E>=Condition));
end
```

1.10.2 Lissage polynomial

```
function [Coeff_opti,Compatibilite,Spectre_lisse]=smooth_residu_droite(Spectre_exp,Bruit,Condition)
N = length(Spectre_exp);
Degree = 1:1:N/2;
[mu, sigma] = normfit(Bruit);
j=1;
while Degree(j) < N
    l = Degree(j);
    n=l;
    coeff(1, 1) = 1;
    coeff(2, 1 : 2) = [1 1];
    for r = 3 : l
        coeff(r, 1) = 1;
        for c = 2 : r-1
            coeff(r, c) = coeff(r-1, c-1) + coeff(r-1, c);
        end
        coeff(r, r) = 1;
    end
    Coefficient_ponderation=coeff(l,:);
    Coefficient_ponderation = Coefficient_ponderation(:);
    for k=1:length(Spectre_exp)
        Spectre_exp2 = [Spectre_exp(end-199 : end); Spectre_exp; Spectre_exp(1:200)];
        values = Spectre_exp2((k+200)-floor(n/2):(k+200)+floor(n/2));
        values = sum((values .* Coefficient_ponderation)) / sum(Coefficient_ponderation);
        spc_smooth(k) = values;
    end
    spc_smooth = spc_smooth(:);
    Residus = spc_smooth - Spectre_exp;
    Compatibilite(j) = Compatibilite_residus(Residus,[mu, sigma],Condition);
    Spectre_lisse{j} = spc_smooth;
    j=j+1;
end
Coeff_opti = (find(Compatibilite>=Condition));
end
```

1.10.3 Réduction du degré des polynômes de Tchebychev

```
function Meilleur_degre = Best_poly(Spectre_debruite,B_exp,condition,Bruit)
warning('off')
[mu, sigma] = normfit(Bruit);
Spectre_chebfun = chebfun(Spectre_debruite,[B_exp(1) B_exp(end)]);
N = length(Spectre_chebfun);
Points_Tchebyshev_originaux = chebpts(N,[B_exp(1) B_exp(end)]);
for i = 1 : N-1
    x_cheb{i} = chebpts(i,[B_exp(1) B_exp(end)]);
    y_degre_N{i} = Spectre_chebfun(x_cheb{1,i});
    Spectre_chebfun_N{i} = chebfun(y_degre_N{i},[B_exp(1) B_exp(end)]);
    y_degre_N_prim{i} = Spectre_chebfun_N{i}(Points_Tchebyshev_originaux);
    y_N_original = Spectre_chebfun(Points_Tchebyshev_originaux);
    residus{i} = y_degre_N_prim{1,i} - y_N_original;
    [Mu_residuels{i}, Sigma_residuels{i}] = normfit(residus{i});
    E(i) = Compatibilite_residus(residus{i},[mu, sigma],condition);
end
focus = 1 : length(B_exp);
Extraction = (find(E>=condition));
for k = 1 : length(find(E>=condition))
    spc_debruite_Tchebyshev(:,k) = y_degre_N_prim{Extraction(k)};
    Norme_infinie(k) = 100 * norm(y_N_original(focus)-spc_debruite_Tchebyshev(focus,k),inf);
end
[Y_Best, X_Best] = min(Norme_infinie);
Meilleur_degre = Extraction(X_Best);
end
```

1.10.4 Méthode de comparaison des densités de probabilité

```
function E = Compatibilite_residus(Residus,Bruit_parametres,Condition)
warning('off')
mu = Bruit_parametres(1);
sigma = Bruit_parametres(2);
nbins = 50;
[nelements,bincenters] = hist(Residus,nbins);
X = bincenters;
Y = nelements;
lengthBin = X(3)-X(2);
scalingFactor = size(Snoise,1) * lengthBin;
xx = linspace(min(X)-lengthBin/2,max(X)+lengthBin/2,350);
yy = normpdf(xx,mu, sigma);
yC = chebfun(yy',[xx(1) xx(end)], 'equi');
NN = length(Residus);
Nb = 0;
hh=1;
parfor j=1:nbins
    warning('off')
    a = X(j)-lengthBin/2;
    b = X(j)+lengthBin/2;
    x = chebfun('x',[a b]);
    p(j) = sum(yC(x));
    mumu(j) = NN*p(j);
    sigsig(j) = sqrt(NN*p(j)*(1-p(j)));
    if mumu(j)-sigsig(j)/hh<=Y(j) && Y(j)<=mumu(j)+sigsig(j)/hh
        Nb=Nb+1;
    end
end
E=Nb./nbins;
if E>=Condition
    R=1;
else
    R=0;
end
end
```

1.11 Facteur de Student k

En pratique, on cherche à estimer un intervalle de confiance, et, par conséquent, une incertitude associée à une moyenne m mesurée lors d'une expérience. Concernant sur une série de mesures Y_i , Il est plus commode d'utiliser la variable aléatoire suivante :

$$X = \frac{\bar{Y} - m}{\sigma / \sqrt{n}}$$

Où $\bar{Y}$ est l'estimateur de la moyenne et σ l'écart type associé.

Expérimentalement, on constate qu'il est courant que la variable aléatoire Y suit une loi normale. C'est ce que nous avons observé par exemple dans le chapitre « V Développement d'un nouveau protocole pour le traitement numérique des spectres RPE ».

Cependant, nous ne connaissons pas systématiquement la véritable valeur de l'écart-type σ et c'est la raison pour laquelle nous la remplaçons par l'écart type expérimental S_{n-1} . On utilise ainsi la nouvelle variable aléatoire T à la place de Y :

$$T = \frac{\bar{Y} - m}{S_{n-1}/\sqrt{n}}$$

Cette variable aléatoire T suit une loi de Student à $n - 1$ degrés de liberté [Yang et al., 2007]. Si n est très grand, alors S_{n-1}^2 sera très proche de σ^2 .

On souhaite maintenant déterminer un intervalle de confiance p compris entre 0 et 1. Il faut donc trouver k le fractile d'ordre p de la variable aléatoire T tel que :

$$P(|T| \leq k) \geq p$$

$$\text{Soit } P(|\bar{Y} - m| \leq k \frac{S_{n-1}}{\sqrt{n}}) \geq p$$

$$P(-k \frac{S_{n-1}}{\sqrt{n}} \leq \bar{Y} - m \leq k \frac{S_{n-1}}{\sqrt{n}}) \geq p$$

De manière pratique, on détermine k en fonction de l'ordre p souhaité à l'aide de tables prédéfinies consultables dans les ouvrages mathématiques statistiques [Yang et al., 2007].

1.12 Paramètres d'acquisition des spectres RPE pour l'élaboration des courbes de réponse en dose UV

Tableau 17 : Paramètres d'acquisition des spectres RPE pour l'élaboration de la courbe de réponse en dose UV.

Paramètres	
Fréquence micro-onde (GHz)	33,92
Modèle du résonateur	ER5106QT
Puissance micro-onde incidente (mW)	1,20
Largeur du balayage du champ magnétique (mT)	17,00
Modulation de fréquence (kHz)	100
Modulation d'amplitude (mT)	0,40
Gain (dB)	30
Nombre de points	1870
Temps d'acquisition (s)	34,03
Nombre d'acquisitions	1
Constante de temps (ms)	0
Nombre de points pour le lissage polynomial Bruker	0

Liste des tableaux et des figures

Index des tableaux

Tableau 1: Liste des différents matériaux potentiellement utilisables en dosimétrie RPE qui proviennent soit de l'environnement proche de la victime (matériaux inertes), soit d'elle-même (matériaux biologiques). Le symbole « - » signifie « aucune information dans la littérature ». Sources : Trompier et al., (2009) et Herve et al., (2006).....	24
Tableau 2 : Les différents mécanismes radicalaires susceptibles d'avoir lieu lors d'une interaction d'un rayonnement ionisant avec un milieu biologique.....	47
Tableau 3 : Champs magnétiques de résonance pour un système défini par un facteur $g=2$ en fonction de la fréquence micro-onde utilisée.....	51
Tableau 4: Paramètres d'acquisition utilisés en spectroscopie RPE dans le cadre de ce travail.	63
Tableau 5 : Caractéristiques des différents signaux observables par spectroscopie RPE dans les ongles [Trompier et al., 2014].....	80
Tableau 6 : Extraction de certaines variables d'intérêt du spectre RPE théorique à l'aide de la transformation des données discrètes en polynômes de Tchebychev.....	93
Tableau 7 : Radicaux libres susceptibles d'être générés au sein de la kératine. Seuls ceux dont les facteurs g sont proches de ceux du signal endogène ont été représentés dans le tableau..	108
Tableau 8 : Intensités du signal endogène en fonction du genre, des origines et de l'âge des donneurs. Données provenant du poster de Swarts et al., lors du 62nd Annual International Meeting- Radiation Research Society (RADRES) en octobre 2016 à Hawaï.....	140
Tableau 9 : Synthèse des résultats sur l'estimation des facteurs g du signal radio-induit instable RIS 2.....	147
Tableau 10 Résultats concernant les régressions linéaires de l'évolution du RIS 2 avec la dose.	162
Tableau 11 : Synthèse des résultats sur l'estimation des facteurs g du signal radio-induit instable RIS 5.....	169

Tableau 12 : Résultats obtenus pour la caractérisation expérimentale du bruit généré par le spectromètre RPE. L'étude porte sur l'ensemble des 2000 ordonnées $\{y_n\}$ associées à chaque abscisse x_i	197
Tableau 13 : Synthèse des résultats obtenus pour la caractérisation expérimentale du bruit généré par le spectromètre RPE. La première étude porte sur l'ensemble des 2000 ordonnées $\{y_n\}$ associées à chaque abscisse x_i . La seconde porte sur l'ensemble des 2000 ordonnées $\{y_i\}$ associées à chaque acquisition spectrale n	201
Tableau 14 : Synthèse des résultats sur l'analyse spectrale des spectres débruités.....	215
Tableau 15 : Estimation des amplitudes et des intensités du signal d'intérêt de 12 spectres RPE bruts, successifs et indépendants. Les variables considérées ont été calculées automatiquement à l'aide du protocole numérique développé au cours de ce travail de recherche.....	224
Tableau 16: Modèle théorique représentant l'évolution du signal UVIS 5 avec le temps d'exposition aux UVA selon le mode de traitement spectral (manuel ou automatique).....	226
Tableau 17 : Paramètres d'acquisition des spectres RPE pour l'élaboration de la courbe de réponse en dose UV.....	287

Index des figures

Figure 1 : Premier cliché radiographique de la main Bertha Röntgen en 1895. Image : wilhelmconradoentgen.de/en/about-roentgen (janvier 2018).....	7
Figure 2 Carte des débits de dose émis par les dépôts radioactifs dans l'environnement de la centrale de Fukushima-Daiichi et des estimations de doses susceptibles d'être reçues par irradiation au bout de la première année. Image : IRSN.....	9
Figure 3 Origine des accidents radiologiques selon l'UNSCEAR.....	11
Figure 4 Conséquences radio-induites au niveau des mains pour de fortes doses. Image : emergency.cdc.gov (janvier 2018).....	12
Figure 5 Échange de matériel entre deux chromosomes à la suite d'une exposition aux rayonnements ionisants. Image : IRSN.....	15
Figure 6 Fantôme anthropomorphe équivalent tissu de type Alderson Rando. Ce fantôme est constitué de tranches et peut être rempli de dosimètres thermoluminescents (TLD) ou radio-photoluminescents (RPL) permettant une cartographie de la dose. Image : IRSN.....	16
Figure 7 Représentation en 3-dimensions d'un fantôme voxelisé (gauche), d'un fantôme mathématique (centre) et illustration d'une modélisation 3D d'une géométrie d'irradiation (droite). Image : IRSN.....	17
Figure 8 Nombre de publications dans le domaine de la spectroscopie RPE depuis 1965. Source : https://www.scopus.com/ (janvier 2018).....	20
Figure 9 Nombre de publications dans le domaine de la dosimétrie RPE depuis 1980. Source : https://www.scopus.com/ (janvier 2018).....	23
Figure 10 Dosimètre alanine utilisé en spectroscopie RPE. Image : IRSN.....	25
Figure 11 Origine des signaux RPE observables dans les ongles.....	28
Figure 12 Impact de l'eau distillée sur les signaux RPE observables dans les ongles.....	30
Figure 13 Capture d'écran d'un spectre RPE d'un échantillon d'ongle obtenu à l'aide du logiciel X-EPR du fabricant Bruker.....	33
Figure 14 Capture d'écran de la véritable représentation du spectre RPE d'un échantillon d'ongle.....	34
Figure 15 Orientation des spins électroniques avec ou sans champ magnétique extérieur.....	49

Figure 16 Représentation des niveaux énergétiques des spins électroniques ($S = 1/2$) en présence d'un champ magnétique extérieur.....	50
Figure 17 Représentation d'un système de symétrie élevée. Expérimentalement, nous obtenons la 1 ^{ère} dérivée (b) du spectre d'absorption (a). Cette raie est isotrope et centrée en $g=g_x=g_y=g_z$	52
Figure 18 Représentation de deux systèmes de symétrie axiale. a) Le système paramagnétique est placé parallèlement à l'axe z et le facteur g_z est plus important que g_x et g_y : $g_{\perp} < g_{\parallel}$. b) C'est le cas contraire : le système paramagnétique est placé dans le plan (x, y) et le facteur g_z est plus faible que g_x et g_y : $g_{\perp} > g_{\parallel}$	53
Figure 19 Représentation d'un système de basse symétrie. Dans ce cas, le facteur g mesuré diffère selon l'axe considéré. Ici, le facteur g mesuré dans la direction x est plus grand que celui mesuré dans la direction y et ce dernier est plus important que celui mesuré dans la direction z : $g_x > g_y > g_z$	54
Figure 20 Représentation de spectres RPE avec ou sans interaction hyperfine : a) aucune interaction hyperfine. b) interaction hyperfine avec un noyau d'hydrogène $I=1/2$. c) interaction hyperfine avec un noyau d'azote $I=1$	55
Figure 21 Représentation de la précession des moments magnétiques et de l'aimantation résultante autour de B_0	57
Figure 22 Schéma d'une installation de spectroscopie RPE. Image : Bruker.....	58
Figure 23 Schéma d'un spectromètre RPE. Image : La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique [Bertrand, 2010].....	59
Figure 24 Effet de l'amplitude de la modulation (am) sur la discrimination de signaux proches. Les deux signaux RPE sont séparés de 4 mT. a) $am=0,7$ mT, b) $am=0,5$ mT, c) $am=0,1$ mT.....	62
Figure 25 Principe général de la dosimétrie RPE. a) L'intensité du signal RPE radio-induit augmente avec la dose. b) On relie l'amplitude pic à pic du signal RPE radio-induit à la dose absorbée.....	64
Figure 26 Schéma récapitulatif d'un ongle humain avec ses différentes structures.....	65
Figure 27 Schéma représentant l'orientation des fibres de kératine dans les différentes couches constitutives de l'ongle (ventrale, intermédiaire et dorsale).....	66

Figure 28 Schéma de l'alpha-kératine. Elle est composée de longues chaînes polypeptidiques enroulées en forme de spirale et renforcée par des liaisons ioniques, hydrogènes et des ponts disulfure.....	67
Figure 29 Image obtenue en microscopie électronique d'un échantillon d'ongle coupé. Image : Farren et al., (2004).....	67
Figure 30 Spectre RPE acquis en bande Q d'un ongle stressé mécaniquement. Les 4 composantes mécaniquement induites y sont représentées. En rouge l'acquisition spectrale a été effectuée sous atmosphère inerte tandis qu'en noir sous atmosphère standard. Figure de Trompier et al., (2014).....	69
Figure 31 Spectre RPE en bande X d'un ongle irradié à différentes doses. Les 5 signaux radio-induits <i>RIS</i> y sont représentés. Figure de Trompier et al., (2014).....	73
Figure 32 : a) Variation de l'intensité pic à pic du <i>RIS</i> 2 en fonction de la dose exprimée en kerma dans l'air (grays). b) Variation de l'intensité pic à pic du <i>RIS</i> 5 en fonction de la dose exprimée en kerma dans l'air (grays). Figures de Trompier et al., (2014).....	74
Figure 33 : Capture d'écran d'une simulation spectrale via Easyspin sur un spectre expérimental d'un cofacteur à Mo d'une protéine à 55 K. Source : VIe École Thématique de l'ARPE, Obernai, 2016.....	83
Figure 34 : Spectre RPE théorique rhomboédrique défini par les facteurs g suivants, $g_1=1,9950$, $g_2=2,0120$, $g_3=2,0440$, une largeur de raie de 2,00 mT et échantillonné uniformément sur 100 points.....	86
Figure 35 : Représentation de l'échantillonnage uniforme (en bleu) et sur les nœuds de Tchebychev (en rouge) sur 100 points.....	87
Figure 36 : a) Spectre RPE théorique original échantillonné uniformément sur 100 points (points noirs) et polynôme de Tchebychev associé (rouge). b) Histogramme des résidus entre le spectre original et la fonction polynomiale interrogée aux nœuds de Tchebychev. La majorité des résidus est centrée autour de $-5,19.10^{-16}$ qui est inférieur à la valeur caractéristique de la précision machine (10^{-15})......	89
Figure 37 : a) Spectre RPE théorique échantillonné uniformément sur 100 points (points noirs) et son polynôme de Tchebychev associé (rouge). b) Histogramme des résidus entre le spectre original et la fonction polynomiale interrogée sur les nœuds de Tchebychev. La	

majorité des résidus est centrée autour de $2,96.10^{-16}$ qui est inférieure à la valeur caractéristique de la précision machine (10^{-15}).....	91
Figure 38 : a) Spectre RPE échantillonné uniformément sur 100 points et le polynôme de Tchebychev associé. b) Spectre RPE échantillonné uniformément sur 100 000 points et le polynôme de Tchebychev associé au spectre échantillonné sur 100 points.....	92
Figure 39 : Représentation du spectre RPE théorique original à l'aide de polynôme de Tchebychev. La primitive et la dérivée du spectre RPE sont obtenues instantanément et simplement à l'aide de commandes basiques de Matlab. a) Spectre d'absorption b) 1 ^{ère} dérivée c) 2 nd dérivée.....	93
Figure 40 : Evolution du spectre RPE du signal endogène d'un prélèvement d'ongle sain après traitement dans l'eau distillée pendant 1 heure puis séchage à l'air libre.....	99
Figure 41 : Variation de l'intensité du signal endogène <i>BKS</i> en fonction du nombre de traitements dans l'eau distillée. Source : Trompier, 2012.....	100
Figure 42 : Spectre RPE d'un ongle sain préalablement traité dans de l'eau distillée, séché et acquis en spectroscopie RPE bandes X et Q (0,6 mW).....	102
Figure 43 : Spectres RPE de trois donneurs sains acquis en bande Q. La composante principale du <i>BKS</i> est définie par $g_1=2,0060$ (2), $g_2=2,0054$ (2) et $g_3=2,0024$ (2). Pour un faible nombre de donneurs (10 % de la cohorte), un signal isotrope très intense apparaît pour 2,0024(2) (spectre rouge). Enfin, la concentration en radicaux Mn^{2+} varie également d'un individu à l'autre.....	104
Figure 44 : Variation des amplitudes pic à pic du <i>BKS</i> (<i>ronds bleus</i>) et du singlet particulier (carrés rouges) normalisées en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde. On constate que le <i>BKS</i> sature à environ 1 mW contrairement au signal isotrope qui ne présente aucun comportement de saturation.....	105
Figure 45 : Spectres RPE des algues étudiées au cours de ce travail (voir annexe « 1.6 Algues marines étudiées en spectroscopie RPE »).....	107
Figure 46 : Mécanisme de formation du radical o-semiquinone anionique à partir de l'acide aminée tyrosine.....	109
Figure 47 : Spectres RPE du signal endogène d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical semiquinone.....	110

Liste des tableaux et des figures

Figure 48 : Comparaison entre le spectre expérimental en bande Q d'ongle sain présentant le signal endogène <i>BKS</i> avec un intense singlet en $g=2,0022(2)$ et le spectre simulé de semiquinone et de tryptophanyl.....	111
Figure 49 : Spectres RPE du signal endogène d'un ongle sans traitement chimique (noir), après traitement dans une solution de <i>KOH</i> à $pH=13$ (rouge) et après traitement dans une solution d' <i>HCL</i> à $pH=1$ (bleu).....	112
Figure 50 : Spectres RPE du signal endogène <i>BKS</i> d'un ongle sans traitement chimique (noir), après traitement dans une solution oxydante à $pH=13$ de 0,1 M de $K_3Fe[CN]_6$ (rouge) et après traitement dans une solution réductrice de 0,1 M de DTT (bleu).....	113
Figure 51 : Variation de l'intensité du signal endogène <i>BKS</i> en fonction du temps écoulé après humidification d'un échantillon d'ongle et stockage à l'air libre [Reyes et al., 2008]. Source : Trompier, (2012).....	115
Figure 52 : Spectres RPE du signal endogène d'un ongle sain provenant du même doigt d'un même donneur. Les deux échantillons ont été trempés dans de l'eau distillée pendant 1 heure puis ont séché 72 heures dans l'obscurité respectivement à l'air libre (bleu) et dans un dessiccateur sous vide (orange).....	116
Figure 53 : Evolution de l'amplitude pic à pic du signal endogène <i>BKS</i> selon un traitement thermique isochrone tel que $\Delta T = 10\text{ }^{\circ}C$, $\Delta t = 20\text{ mn}$	119
Figure 54 : Spectres RPE avant et après exposition aux rayonnements UVA (a), UVB (b) et UVC (c) pendant 1 heure. Le signal endogène <i>BKS</i> a été obtenu en traitant les échantillons dans de l'eau distillée pendant 1 heure puis en les séchant sous vide pendant 16 heures. La puissance du rayonnement micro-onde est de 0,6 mW.....	121
Figure 55 : Spectres RPE des échantillons d'ongles exposés aux rayonnements UVA (a), UVB (a) et UVC (b) obtenus à une puissance micro-onde de 9,5 mW.....	122
Figure 56 : a) Spectres RPE du signal endogène après oxydation (gris) et UV-induit (rouge). b) Spectres RPE du signal UV-induit (bleu) et endogène (noir) après humidification et séchage sous vide. La puissance du rayonnement micro-onde est de 0,6 mW.....	123
Figure 57 : Evolution de l'intensité du signal UV-induit mesuré directement après irradiation UVA en fonction du temps d'exposition aux rayonnements UVA artificiels (365 nm, 1,8 mW.cm ⁻²).....	124

Figure 58 : Spectres RPE représentant le signal UV-induit (bleu) mesuré directement après irradiation et la simulation spectrale du radical semiquinone (violet).....	125
Figure 59 : Evolution de l'intensité du signal UV-induit mesuré après traitement dans l'eau en fonction du temps d'exposition aux rayonnements UVA artificiels (365 nm, 1,8 mW.cm ⁻²).	126
Figure 60 : Intensités spectrales du signal endogène <i>BKS</i> et UV-induit après traitement dans l'eau. L'échantillon exposé aux rayonnements UVA a subi trois traitements dans l'eau puis séchage sous vide.....	127
Figure 61 : Spectre RPE représentant le signal UV-induit stable, <i>UVIS 5</i> (bleu), après exposition pendant 2 heures à une source artificielle d'UVA (365 nm, 1,85 mW.cm ⁻²) et traitement pendant 1 heure dans l'eau puis séchage de 16 heures dans un dessiccateur sous vide. Le spectre simulé de semiquinone est représenté en rose.....	128
Figure 62 : Intensité du signal endogène <i>BKS</i> en fonction du doigt de prélèvement (pouce ou petit orteil).....	130
Figure 63 : Evolution de l'intensité du signal global (<i>BKS</i> + <i>UVIS 5</i>) avant et après 3 semaines d'exposition à la lumière du jour. Avant d'être mesurés, les échantillons ont été traités dans l'eau distillée puis séchés sous vide pour n'isoler que le signal endogène stable <i>BKS</i> et le signal UV-induit stable <i>UVIS 5</i>	131
Figure 64 : Illustration de l'évolution de l'intensité du signal UV-induit stable (<i>UVIS 5</i>) avec le temps d'exposition aux UVA. En fonction de la pré-dose UV, le rendement de création des radicaux UV-induits stables sera plus ou moins important.....	132
Figure 65 : Spectres RPE du signal endogène <i>BKS</i> pour deux individus (a et b) obtenus à partir d'ongles de mains (bleu) et de pieds (orange).....	134
Figure 66 : Illustration de l'évolution de l'intensité du signal <i>UVIS 5</i> en fonction de la durée d'exposition aux rayonnements UVA. Dans le cas où le signal endogène (<i>BKS</i> + <i>UVIS 5</i>) des ongles de mains vaut celui des ongles de pieds, alors il est probable qu'il s'agisse du cas n°1 ou 2. Autrement, si les intensités spectrales sont différentes dans les ongles de mains et de pieds, il s'agit du cas n°3.....	135
Figure 67 : Intensité du signal endogène <i>BKS</i> en fonction du doigt de prélèvement pour 4 donneurs différents.....	136

Figure 68 : Evolution de l'intensité du signal endogène <i>BKS</i> tout au long de l'année pour 4 donneurs différents.....	137
Figure 69 : Intensités du signal endogène <i>BKS</i> mesurées pour une cohorte de 30 donneurs différents.....	139
Figure 70 : Spectres RPE en bande Q d'un échantillon d'ongle de main (bleu) et de pied (rouge) tous deux irradiés à 10 Gy et normalisés à une amplitude de 1 u.a à des fins de comparaison.....	145
Figure 71 : Spectres RPE normalisés d'un ongle sain (orange) représentant le signal endogène et d'un ongle irradié à 10 Gy (noir) représentant le signal radio-induit <i>RIS 2</i>	146
Figure 72 : Spectres RPE des ongles de main (a) ou de pied (b) irradiés à 10 Gy de trois donneurs différents.....	146
Figure 73 : Spectres RPE des ongles de main (a) et de pied (b) irradiés et leur simulation spectrale associée. Les paramètres spectraux sont répertoriés dans le tableau 9.....	148
Figure 74 : Evolution de l'intensité du signal RPE après irradiation (0, 10, 25 et 50 Gy) après humidification d'une heure dans l'eau puis séchage à l'air libre 1 jour (rouge), 7 jours (bleu) et 22 jours (magenta).....	149
Figure 75 : Spectres RPE d'un ongle irradié : directement après irradiation (<i>RIS 2</i> , bleu), après traitement dans l'eau (<i>RIS 5</i> , orange) et après traitement oxydatif (jaune).....	151
Figure 76 : Spectres RPE normalisés par les masses respectives des échantillons d'ongles irradiés à 0, 2, 5 et 10 Gy mesurés après irradiation (bleu), après traitement dans l'eau puis séchage (orange) et après traitement oxydant (jaune) à $P=0,6\text{ mW}$	153
Figure 77 : Variation des intensités des signaux RPE des échantillons après irradiation (bleu) et après traitement oxydant (rouge) en fonction de la dose absorbée.....	154
Figure 78 : Spectres RPE des ongles irradiés de deux donneurs (a, b) mesurés après irradiation (<i>RIS 2</i> , rouge) et après traitement oxydant (bleu).....	155
Figure 79 : Spectres RPE du signal mécaniquement induit <i>MIS 2</i> (vert) d'un échantillon 24 heures après prélèvement. Après traitement dans l'eau, le signal endogène <i>BKS</i> a pu être mesuré (bleu). Enfin, le spectre résultant de l'oxydation de l'ongle est représenté en rouge.	158
Figure 80 : Evolution du signal radio-induit <i>RIS 2</i> en fonction de la dose absorbée par un échantillon d'ongle de main (bleu) et d'ongle de pied (rouge) d'un même individu. Les acquisitions spectrales ont été effectuées en bande Q.....	160

Figure 81 : Variation de l'intensité du signal radio-induit <i>RIS 2</i> en fonction de la dose absorbée par l'échantillon. Au total, 6 donneurs différents ont été étudiés et les spectres sont normalisés par les masses des échantillons.....	162
Figure 82 : Impact de bains répétés dans l'eau distillée sur le signal radio-induit <i>RIS 5</i> . L'échantillon a été irradié à 55 Gy et les mesures ont été effectuées en bande Q à température ambiante.....	166
Figure 83 : Evolution de l'intensité du <i>RIS 5</i> en fonction de la dose absorbée par un échantillon d'ongle de main.....	167
Figure 84 : Courbe de saturation du <i>RIS 5</i> obtenue sur un prélèvement d'ongle de main.....	168
Figure 85 : a) Spectres RPE en bande Q d'un prélèvement d'ongle sain appartenant à la victime gabonaise lors de l'accident radiologique survenu en 2010 (en noir) et irradié à 35 Gy (en rouge). b) Extraction de la composante radio-induite stable <i>RIS 5</i> après soustraction du signal endogène <i>BKS</i>	168
Figure 86 : Spectres RPE d'un ongle irradié à 35 Gy après avoir soustrait le spectre représentant le signal endogène <i>BKS</i> . Le spectre bleu représente le signal radio-induit <i>RIS 5</i> , et le spectre violet représente la simulation spectrale du radical semiquinone.....	169
Figure 87 : a) Variation des amplitudes du <i>RIS 5</i> pour différentes doses en fonction de la racine carrée de la puissance du rayonnement micro-onde comparée à celle du <i>BKS</i> . b) Variation de l'aire sous les courbes (a) en fonction de la dose.....	171
Figure 88 : Illustration de courbes de saturation en dose pour un échantillon d'ongle sain et un échantillon pré-irradié. La différence de dose de saturation ($D_2 - D_1$) entre ces deux échantillons permet d'estimer la dose reçue lors de l'accident radiologique.....	173
Figure 89 : Illustration des courbes de saturation en dose pour un même échantillon d'ongle sain, l'un non exposé à la lumière du jour (bleu) et l'autre fortement exposé aux rayonnements UVA. L'intensité du signal <i>UVIS 5</i> agit comme une pré-dose gamma à l'instar d'un échantillon pré-irradié.....	174
Figure 90 : Schéma explicatif de la stabilité des radicaux endogènes (bleus), UV-induits (oranges) et radio-induits (rouges). Ces radicaux stabilisés par interaction coulombienne avec les impuretés métalliques (M^{n+}) seront observables après traitement dans l'eau. La quantité d'impuretés métalliques présente dans les ongles est a fortiori limitée ce qui explique le phénomène de saturation observé concernant l' <i>UVIS 5</i> et le <i>RIS 5</i>	175

Figure 91 : Mécanisme de formation des radicaux o-semiquinones anioniques à partir des molécules de DOPA.....	178
Figure 92 : Schéma explicatif de la stabilité des radicaux o-semiquinones anioniques par interaction coulombienne avec les impuretés métalliques présentes intrinsèquement dans les ongles.....	179
Figure 93 : Schéma qualitatif de la stabilité des signaux ayant pour origine des radicaux o-semiquinones anioniques. Il est possible que d'autres radicaux soient générés au cours de l'irradiation mais ayant une durée de vie ultra courte ce qui ne permet pas de les observer. Le signal endogène <i>BKS</i> , radio-induit <i>RIS 5</i> et UV-induit <i>UVIS 5</i> sont stabilisés par interaction coulombienne avec les impuretés métalliques (Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...).	179
Figure 94 : Schéma explicatif des signaux <i>BKS</i> , <i>UVIS</i> et <i>RIS</i> observables dans les ongles et ayant pour origine des radicaux o-semiquinones anioniques. Les radicaux stabilisés par interaction coulombienne sont à l'origine des signaux <i>BKS</i> , <i>UVIS 5</i> et <i>RIS 5</i> . A contrario, les radicaux non stabilisés seront éliminés par humidification.....	180
Figure 95 : Illustration des protocoles existants de dosimétrie RPE sur les ongles (détaillés en annexe). Le premier se base sur le signal radio-induit <i>RIS 2</i> , et le second sur le signal radio-induit stable <i>RIS 5</i>	182
Figure 96 : Illustration des protocoles de dosimétrie RPE sur les ongles proposés dans le cadre de ce travail. Le premier se base sur la régénération du signal radio-induit <i>RIS 2</i> après son élimination totale, et le second sur les courbes de saturation en puissance micro-onde des radicaux radio-induits stables.....	183
Figure 97 : Simulation d'un spectre d'absorption quelconque (a) : en noir il s'agit de la loi physique qui régit l'absorption du rayonnement micro-onde par l'entité paramagnétique soumise à un champ magnétique variable. En rouge sont représentés les valeurs d'absorption tirées aléatoirement dans la distribution de probabilité normale de type Poisson (b).....	193
Figure 98 : Schéma explicatif de la démarche pour caractériser le bruit du spectromètre RPE. On réalise 2000 mesures du même spectre et, pour chaque abscisse x , on analyse les 2000 ordonnées $\{y_{i,n}\}$	195
Figure 99 : a) Spectre RPE caractéristique du bruit généré par le spectromètre. b) Diagramme Quantile-Quantile permettant d'évaluer la pertinence de l'ajustement des distributions des valeurs $\{y_{i,n}\}$ au modèle gaussien théorique. c) Exemple de compatibilité de la distribution des	

valeurs $\{y_{x,n}\}$ avec la densité de probabilité gaussienne f_i de paramètres (μ_i, σ_i) . La compatibilité est estimée à 77,50 %.....	197
Figure 100 : a) Figure représentant la variation de l'estimateur de l'espérance μ_i en fonction du carré de l'estimateur de l'écart-type σ_i^2 . b) et c) Histogrammes des coefficients α_i et β_i obtenus par régression linéaire.....	198
Figure 101 : Schéma explicatif de l'hypothèse ergodique du bruit : pour caractériser le bruit du spectromètre, selon l'hypothèse ergodique, il est équivalent d'étudier la dispersion des ordonnées pour une abscisse donnée pour un ensemble n mesures (a) que d'étudier une zone plate bruitée d'une seule acquisition spectrale (b).....	200
Figure 102 : a) Spectre RPE caractéristique du bruit généré par le spectromètre. b) Diagramme Quantile-Quantile permettant d'évaluer la pertinence de l'ajustement des distributions des 2000 valeurs $\{y_{x,j}\}$ de chaque spectre au modèle gaussien théorique. c) exemple de compatibilité de la distribution des valeurs $\{y_{x,n}\}$ avec la densité de probabilité gaussienne f_n de paramètres (μ_n, σ_n) . Cette compatibilité est estimée à 72,50 %.....	201
Figure 103 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ dans l'espace « temporel » (a), et dans l'espace des fréquences (b). Dans l'espace de Fourier, le bruit est tracé en rouge et on constate que le signal RPE se situe uniquement aux basses fréquences.....	205
Figure 104 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ avant et après application du filtre passe-bas développé au cours de ce travail.....	208
Figure 105 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ avant et après application du lissage polynomial développé au cours de ce travail.....	210
Figure 106 : Représentation d'une droite bruitée et non bruitée sous forme de polynôme de Tchebychev. Le polynôme associé à la droite non bruitée a un degré 1 tandis que celui de la droite bruitée a un degré de 100.....	211
Figure 107 : Représentation d'un spectre RPE défini par $g_1 = 2.00$ $g_2 = 2.01$ $g_3 = 2.02$ avant et après application du débruitage « Réduction degré polynomial » automatique développé au cours de ce travail.....	212
Figure 108 : Spectre RPE théorique bruité défini par $g_1 = 1,9950$, $g_2 = 2,0120$, $g_3 = 2,0440$, et présentant des couplages hyperfins tels que $a_1 = 0$ mT, $a_2 = 7,25$ mT et $a_3 = 1,55$ mT.....	213

Figure 109 : Représentation des spectres RPE théorique (en noir) et débruités par la filtre linéaire passe-bas (en bleu), par le lissage polynomial (en rouge) et par la méthode de réduction du degré polynomial des polynômes de Tchebychev (en violet).....	214
Figure 110 : Schéma explicatif de l'étude du plus faible rapport signal sur bruit détectable avec les deux procédures de débruitage présentées et développées au cours de ce travail.....	217
Figure 111 : Étude de la limite de détection des deux méthodes de débruitage : écart maximal relatif en fonction du rapport signal sur bruit pour l'intensité (a), pour l'amplitude (b) et pour la largeur de raie (c).....	217
Figure 112 : Spectre RPE expérimental d'un ongle sain. On retrouve le signal d'intérêt de type semiquinone anionique SQ^- ainsi que le signal parasite manganèse Mn^{2+}	220
Figure 113 : Spectre RPE débruité par filtre linéaire passe bas du spectre RPE brut d'un ongle sain. On retrouve toujours le signal d'intérêt de type semiquinone anionique SQ^- ainsi que le signal parasite manganèse Mn^{2+}	220
Figure 114 : Polynôme de Tchebychev représentant le spectre RPE débruité présenté dans la figure 113.....	221
Figure 115 : Représentation d'un spectre RPE expérimental d'un ongle non irradié obtenu à la suite d'une seule et unique acquisition d'une durée de 40 secondes. Ces données sont les véritables données brutes.....	223
Figure 116 : Représentation des variables d'intérêt (amplitude pic à pic en rouge, intensité en bleu) sous forme de diagramme « araignée ». Les amplitudes du signal et les intensités sont calculées automatiquement à l'aide du protocole numérique développé au cours de ce travail de thèse.....	223
Figure 117 : Evolution de l'amplitude pic à pic du signal UV-induit stable, l'UVIS 5, avec la durée d'exposition aux UVA artificiels. a) et b) Traitements manuels via l'interface graphique du logiciel XEPR de Bruker. c) Traitement automatique via l'outil numérique développé au cours de ce travail de thèse. Les amplitudes ont été normalisées par celles du signal endogène.	227
Figure 118 Schéma récapitulatif de l'interaction hyperfine dans le cas simple d'un régime isotrope et d'un système paramagnétique de spin électronique $S=1/2$ et nucléaire $I=1/2$ ou $I=1$. Les transitions énergétiques possibles, i.e qui satisfont les conditions de transition énergétiques $\Delta M_S = 0$ et $\Delta M_I = \pm 1$, sont notées 1, 2 et 3.....	267

Figure 119 Impact du gradient en champ magnétique sur un système paramagnétique composé de 4 centres identiques. a) Champ magnétique statique dans la direction x . b) Champ magnétique modulé dans la direction x . c) Champ magnétique modulé dans la direction x avec rotation du système de 45°	268
Figure 120 Principe général de l'imagerie RPE en 2 dimensions.....	269
Figure 121 Protocole dosimétrique basée sur la dose de saturation du signal radio-induit stable. Les cercles remplis représentent la variation du signal radio-induit avec la dose pour l'échantillon sain et les carrés vides pour l'échantillon pré-irradié. La différence entre les deux maxima correspond à la dose absorbée lors de l'accident. Image : Trompier 2012.....	271
Figure 122 Courbe d'étalonnage universelle du signal radio-induit stable. Les lignes en pointillés relient l'amplitude mesurée de l'ongle irradié et la dose reconstruite de 14 Gy. Image : Romanyukha et al., (2014).....	273
Figure 123 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical méthyl-sulfunoyl.....	278
Figure 124 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical cystéinyl-sulfunoyl.....	279
Figure 125 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical semiquinone.....	279
Figure 126 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical tryosyl.....	280
Figure 127 : Spectres RPE du signal endogène BKS d'un ongle sain et la simulation spectrale du radical tryptophane.....	280
Figure 128 Explication de la méthode statistique permettant de comparer deux distributions entre elles.....	282

Résumé :

La majorité des accidents radiologiques sont des irradiations externes et localisées au niveau des mains des victimes. Le rôle de l'IRSN est d'évaluer précisément les conséquences radiologiques afin de mettre en œuvre les stratégies thérapeutiques adaptées. Actuellement, aucune technique ne permet une estimation précoce des doses pour les irradiations des mains. Ainsi, l'objectif de la thèse est de contribuer au développement d'une méthode de dosimétrie basée sur l'analyse par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) de prélèvements d'ongles en reliant la concentration des radicaux libres radio-induits à la dose absorbée. Toutefois, l'analyse des spectres RPE d'ongles irradiés demeure extrêmement compliquée. Une première étape a été de caractériser la nature des radicaux à l'origine des signaux endogènes et radio-induits et d'étudier leurs propriétés physico-chimiques. L'étude de la variabilité de ces signaux a ensuite été entreprise et nous avons identifié un signal UV-induit stable qui contribue de manière certaine au signal endogène. Deux approches pour doser les faibles doses ont été proposées : l'une sur le comportement des signaux radio-induits avec la puissance du rayonnement micro-onde ; l'autre sur la repousse sélective du signal radio-induit après son élimination totale ou partielle à l'aide de traitement chimique. Nous avons également soulevé la problématique des analyses spectrales qui sont opérateurs-dépendantes. Un protocole de traitement numérique des spectres RPE a été développé permettant de réduire la contribution du bruit généré par le spectromètre RPE et d'extraire de manière automatique et reproductible les variables d'intérêt.

Mots clés : Spectroscopie RPE, Dosimétrie des rayonnements ionisants, Ongles d'humains, Accident radiologique, Protocole non opérateur dépendant

Development of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy on human fingernails for biodosimetry of radiological accidents**Abstract:**

The purpose of this work is to assist in the management of emergency situations following accidental exposition to ionizing radiations. The earlier absorbed doses are quantified following exposure, the more efficient the medical team will be able to handle and treat the victims. In most of radiological accidents, irradiation is localized and especially to the hands. Up to now, no techniques exist to estimate these doses with sufficient accuracy. IRSN is implementing a dosimetry technique based on the quantification of radiation induced free radicals using Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy in fragments human nails. However, the analysis of irradiated nails by EPR spectroscopy remains extremely complicated. A first step was to characterize the nature of radicals at the origin of the endogenous and radio-induced signals and to study their physicochemical properties. We also study the variability of these signals, and we identified a stable UV-induced signal that definitely contributes to the endogenous signal. Two approaches to measure low doses have been proposed: one is based on the behavior of radiation-induced signals with the microwave radiation power; the other is based on the selective regrowth of the radio-induced signal after its total elimination by means of chemical treatment. We have also raised the issue of spectral analyses that is operator-dependent. To avoid manual adjustments, we proposed a uniform EPR data processing approach. Traditional EPR procedures have been vastly improved through simple, repeatable and automatic functional processing of EPR spectra.

Keywords: EPR spectroscopy, EPR dosimetry, Human nails, Radiological accident, Unified EPR data processing