

# THÈSE

présentée à

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET SCIENCES DE L'INGENIEUR

par **Philippe BARBERET**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

### DOCTEUR

Spécialité : Physique

\*\*\*\*\*

#### DEVELOPPEMENT D'UNE LIGNE D'IRRADIATION MICROFAISCEAU EN MODE ION PAR ION POUR LA RADIOBIOLOGIE EXPERIMENTALE A L'ECHELLE CELLULAIRE

\*\*\*\*\*

Thèse soutenue le : 23 octobre 2003

Après avis de :

**M. B. BERTHIER**, Directeur de Recherche, CNRS  
**M. J. REMILLIEUX**, Professeur, Université Lyon 1

**Rapporteurs**

Devant la commission d'examen formée de :

**M. B. HAAS**, Directeur de Recherche, CNRS  
**M. G. GRIME**, Université Surrey, UK  
**M. B. BERTHIER**, Directeur de Recherche, CNRS  
**M. J. REMILLIEUX**, Professeur, Université Lyon 1  
**M. J.L. LEFAIX**, Ingénieur-Chercheur CEA DSV  
**M. Ph. MORETTO**, Professeur, Université Bordeaux 1

**Président  
Rapporteur  
Examineurs**

Membres invités :

**M. E. SURAUD** Professeur, Université P. Sabatier Toulouse  
**M. F. ICHAS**, Chargé de recherche, INSERM



## **REMERCIEMENTS**



Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie tout d'abord Monsieur Bernard HAAS, directeur de recherche au CNRS et directeur du CENBG, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci pour tout l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je remercie également Monsieur Joseph REMILLIEUX, professeur à l'université Claude Bernard de Lyon et Monsieur Bernard BERTHIER, directeur de recherche au CNRS, pour avoir accepté d'être rapporteurs externes de cette thèse. Merci pour votre lecture minutieuse de ce manuscrit et pour vos remarques pertinentes.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Geoff GRIME, de l'université de Surrey, qui, en tant que spécialiste des microfaisceaux d'ions, a accepté de faire partie de ce jury. Merci d'avoir fait l'effort de lire ce manuscrit en français.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Jean-Louis LEFAIX, ingénieur chercheur au CEA, pour avoir accepté de participer à ce jury et d'y apporter ainsi sa contribution de spécialiste en radiobiologie.

Merci à Monsieur Eric SURAUD, professeur à l'université Paul Sabatier de Toulouse et à Monsieur François ICHAS, chargé de recherche à l'INSERM pour avoir accepté de participer à ce jury en tant que membres invités.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux membres du groupe Interface Physique Biologie du CENBG avec lesquelles j'ai eu le plaisir de travailler pendant ces trois années de thèse.

En premier lieu, je tiens exprimer toute ma gratitude à Monsieur Philippe MORETTO, professeur à l'université Bordeaux I, qui a encadré ce travail. Merci de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions et pour la confiance que tu m'as accordé.

Merci également à Madame Claire MICHELET-HABCHI, maître de conférences à l'université Bordeaux I, qui a eu la patience de partager avec moi son bureau. Merci pour tes nombreux conseils et pour ton aide au cours de ces trois années.

Mes remerciements vont également à Monsieur Sébastien INCERTI, chargé de recherche CNRS. Merci d'avoir été toujours disponible et pour ton aide, notamment lors de mon apprentissage de GEANT4.

Je tiens également à remercier Monsieur Pierre AGUER à double titre. Tout d'abord en tant qu'ancien directeur du CENBG, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Ensuite en tant que nouveau membre du groupe Interface Physique Biologie pour tout l'intérêt qu'il a porté et qu'il continue à porter à ce travail de thèse.

Je salue également les deux biologistes du groupe : Messieurs Etienne GONTIER et Thomas POUTHIER pour leur aide précieuse sur la partie biologie de ce travail.

Je tiens à remercier également les personnels techniques du CENBG sans qui le développement de cette ligne d'irradiation aurait été difficilement réalisable.

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Arthur BALANA, Ingénieur en instrumentation, au contact duquel j'ai énormément appris. Merci pour ta participation active et extrêmement efficace au développement de la ligne et de son programme de contrôle.

Je tiens à remercier également Monsieur Gérard BRUT, Ingénieur au bureau d'étude et Monsieur Francis MUNOZ de l'atelier mécanique pour leur participation à la réalisation de la chambre d'irradiation.

Merci également au personnel de l'accélérateur Van de Graaf : Messieurs Laurent SERANI, Philippe ALFAURT et Michel BERCION.

Mes remerciements vont également aux membres du Laboratoire CNAB qui, en tant qu'utilisateurs de la microsonde nucléaire ont été des interlocuteurs privilégiés au cours de cette thèse. Je remercie en particulier Messieurs Richard ORTEGA, Guillaume DEVES et Stéphane ROUDEAU.

Je remercie enfin l'ensemble des personnels du CENBG, qui ont contribué à faire de ce laboratoire un cadre de travail privilégié.





## **INTRODUCTION**



L'interaction des particules chargées avec le milieu vivant joue un rôle prépondérant dans de nombreux domaines : exposition aux rayonnements issus de la radioactivité naturelle, cancérogenèse, thérapie anticancéreuse par particules chargées... Comprendre comment de telles radiations agissent, notamment lors de l'exposition à de très faibles doses, reste un enjeu majeur passant par des études de radiobiologie à l'échelle cellulaire.

Les faisceaux d'ions, tout d'abord développés pour des études de physique nucléaire et de physique des particules, se sont récemment avérés être des outils efficaces avec un fort potentiel pour l'investigation des mécanismes de réparation et de signalisation à l'échelle de la cellule. Lorsqu'ils sont focalisés et/ou collimatés, ces faisceaux présentent en effet une résolution spatiale inférieure à la taille d'une cellule, ce qui permet une irradiation ciblée. L'intérêt d'un dispositif de type microfaisceau pour mener des études de dommages radiologiques à l'échelle cellulaire est double. Tout d'abord, chaque cellule peut être irradiée individuellement, parfois en ciblant uniquement certains compartiments cellulaires (noyau ou cytoplasme). Ensuite, un nombre de particules prédéterminé peut être délivré sur cible, ce qui permet par conséquent de maîtriser parfaitement la dose déposée.

Le premier exemple d'utilisation d'un tel outil date de l'année 1950. A cette date, Zirkle et Bloom ont utilisé pour la première fois un faisceau de protons collimaté afin d'étudier l'effet d'une irradiation sur la division cellulaire [1]. Bien qu'ils aient été reconnus depuis comme des outils puissants dans d'autres domaines comme la microanalyse chimique ou la caractérisation, il a fallu attendre les années 1990 pour que l'utilisation des microfaisceaux d'ions dans le cadre d'études de radiobiologie apparaisse à nouveau. Ce regain d'intérêt au cours de la dernière décennie tient sans aucun doute aux évolutions technologiques qui ont permis le développement de systèmes d'imagerie performants et de dispositifs de déplacements micrométriques entièrement automatisés indispensables pour ce genre d'études. On retiendra cependant que l'une des premières utilisations d'un microfaisceau d'ions concernait déjà une étude de radiobiologie à l'échelle cellulaire.

Au CENBG, le développement de la ligne d'irradiation s'est appuyé sur la microsonde nucléaire existante. Le challenge consistait initialement à contrôler un faisceau de particules en mode ion par ion tout en maintenant une résolution spatiale

de quelques micromètres lors de l'extraction de ce faisceau à l'air. Une quinzaine d'années d'expérience dans la maîtrise des microfaisceaux à faible flux nous a permis de résoudre ces difficultés expérimentales. D'un point de vue instrumental, il a fallu modifier complètement l'étage terminal de cette ligne microfaisceau afin de l'équiper d'un système d'imagerie, indispensable à la localisation en ligne des cellules, et d'un étage d'extraction des particules dans l'air à pression atmosphérique. D'autre part, un développement informatique important a été nécessaire pour contrôler la totalité des instruments du dispositif et mettre en place des procédures automatiques d'étalonnage et d'irradiation.

Dans le chapitre I de ce mémoire, nous commencerons par poser la problématique liée à l'étude des faibles doses d'irradiation. Les processus biologiques mis en jeu et les implications des microfaisceaux d'ions dans cette thématique seront abordés. Nous présenterons également les dispositifs de ce type actuellement en fonctionnement. La microsonde nucléaire du CENBG sera présentée au chapitre II, où nous aborderons également les principes généraux d'une ligne d'irradiation ion par ion de cellules vivantes. L'optimisation de cette ligne de faisceau a nécessité l'utilisation de programmes de simulation Monte-Carlo. Une validation préalable de ces outils à l'échelle micrométrique a été nécessaire. Celle-ci sera présentée au chapitre III. Les développements techniques et la mise au point du système d'irradiation ont constitué la majeure partie de ce travail, ils feront l'objet du chapitre IV. Enfin, l'évaluation des performances du système mis au point ainsi que les premières irradiations sur cellules vivantes seront présentées dans le dernier chapitre.

## **Chapitre I**

# **INTERET DES MICROFAISCEAUX DANS L'ETUDE DES REponses CELLULAIRES A L'IRRADIATION**



L'apparition des premières lignes microfaisceau permettant l'irradiation ciblée de cellules en culture avec un nombre exact de particules chargées date de la fin de années 90 [2-5]. Ces outils, qui présentent généralement une résolution spatiale de quelques micromètres, permettent d'exposer individuellement chaque cellule à une dose d'irradiation bien maîtrisée et de choisir le site cellulaire touché (typiquement noyau ou cytoplasme). Cette technique expérimentale constitue une voie importante pour l'étude des effets des faibles doses d'irradiation au niveau cellulaire. Elle devrait permettre par ailleurs d'aborder des mécanismes cellulaires fondamentaux comme la signalisation, la communication intercellulaire ou encore la mort cellulaire programmée (apoptose).

Ce premier chapitre sera consacré à une évaluation de l'impact de ces dispositifs dans les études de radiobiologie. Après une introduction à la problématique des faibles doses d'irradiation et à l'estimation du risque associé, les apports des microfaisceaux d'ions à ce genre d'études seront exposés. A ce jour, la plupart des résultats obtenus l'ont été à l'aide de quelques microfaisceaux qui fonctionnent actuellement en routine. Nous présenterons ici ces dispositifs afin que le lecteur se familiarise avec leurs originalités techniques.

## **1. Etude des faibles doses**

### **1.1 Quelques définitions**

La quantification des dommages infligés à des matériaux (et notamment les matériaux biologiques) par les rayonnements ionisants fait appel à des grandeurs dont nous allons rappeler les définitions. Des informations plus détaillées pourront être trouvées dans la référence [6].

#### ***1.1.1 Le transfert linéaire d'énergie***

Le **transfert linéaire d'énergie (TLE)** correspond à l'énergie transférée de la particule incidente au milieu considéré par unité de longueur de matière traversée. La Commission Internationale des Unités Radiologiques (ICRU) l'a défini de la manière suivante en 1962 :

« *Le transfert linéaire d'énergie d'une particule dans un milieu est le rapport  $dE/dl$  où  $dE$  est l'énergie moyenne transférée localement au milieu par la particule chargée d'énergie spécifiée sur une longueur  $dl$  » [6].*

L'unité la plus couramment utilisée est le **keV/ $\mu\text{m}$** .

Il est à noter que le TLE d'une particule n'est qu'une quantité moyenne et, la quantité d'énergie transférée le long d'une trace variant énormément, cette quantité est peu représentative. Elle peut cependant permettre une classification radiobiologique primaire des particules en fonction de leur nature et de leur énergie.

### **1.1.2 La dose absorbée**

La **dose absorbée** par un milieu lorsqu'il est traversé par des particules correspond à la quantité d'énergie absorbée par unité de volume. L'unité correspondante est le **Gray (1 Gy = 1 joule/kg)**.

Dans des milieux vivants, une dose égale déposée par différents types de radiations n'aura pas le même effet biologique. Un Gray déposé par des particules  $\alpha$  produit par exemple plus de dégâts qu'un Gray déposé par des photons X, la différence provenant notamment de la géométrie du dépôt d'énergie à l'échelle microscopique.

Lors d'irradiations de cellules en culture, cette grandeur est utilisée pour établir les relations dose-effet.

### **1.1.3 L'efficacité biologique relative**

Afin de déterminer l'effet biologique d'un type de radiation donné, la dose absorbée par le matériau considéré doit être pondérée par un facteur de qualité appelé **Efficacité Biologique Relative (EBR)**. La comparaison des différents types de radiations se fait usuellement en prenant les rayonnements X de 250 keV comme référence. L'EBR est définie comme suit :

« *L'EBR d'un type de radiation donné ( $r$ ) comparée à celle de rayons X est définie comme le rapport  $D_X/D_r$  où  $D_X$  et  $D_r$  sont respectivement la dose de rayonnement X et la dose du rayonnement considéré nécessaire pour produire le même dommage biologique ».*



Une fois encore, la notion d'EBR, qui permet de relier une dose à un effet biologique, doit être vue comme une grandeur complexe et dépendant de plusieurs paramètres. En effet les relations liant la dose à l'effet varient en fonction de l'effet biologique observé et du système biologique étudié.

#### 1.1.4 Dose équivalente et dose efficace

Comme nous venons de le voir, l'efficacité biologique relative étant un paramètre très complexe, il est difficilement utilisable pour la définition de doses limites pour la radioprotection. Le facteur de pondération des radiations (tableau I.1) a été introduit dans ce but. La quantité obtenue en multipliant la dose absorbée par ce facteur de pondération est la **dose équivalente (exprimée en Sievert : Sv)**. Les facteurs de pondération des différents types de radiations ionisantes sont donnés par la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP) à partir de valeurs expérimentales de l'EBR concernant des effets biologiques spécifiques pertinents pour la radioprotection (tels que l'induction de cancers à faibles doses par exemple).

Type de radiation et énergie	Facteur de pondération
Photons, toutes énergies	1
Electrons et muons, toutes énergies	1
Neutrons	
<10 keV	5
de 10 keV à 100 keV	10
de 100 keV à 2 MeV	20
de 2 MeV à 20 MeV	10
>20 MeV	5
Protons (autres que les protons de recul)	20
d'énergie > 2MeV, particules $\alpha$ , fragments de fission, ions lourds.	

Tableau I.1 : Facteurs de pondération des différents types de radiation en fonction de leurs énergies [7].

La sensibilité aux différents effets spécifiques radio-induits varie également d'un type de tissu à un autre. Afin de prendre en compte ce phénomène, l'ICRP a introduit la notion de facteur de pondération tissulaire (tableau I.2) qui représente la contribution

relative de chaque tissu ou organe à l'effet total induit par une irradiation uniforme du corps dans sa totalité.

La multiplication de la dose équivalente par ce facteur donne accès à la **dose efficace** (également exprimée en Sv).

Tissu ou Organe	Facteur de pondération tissulaire
Gonades	0.20
Moelle	0.12
Colon	0.12
Poumon	0.12
Estomac	0.12
Vessie	0.05
sein	0.05
foie	0.05
Oesophage	0.05
Thyroïde	0.05
Peau	0.01
Os	0.01
Reste	0.05

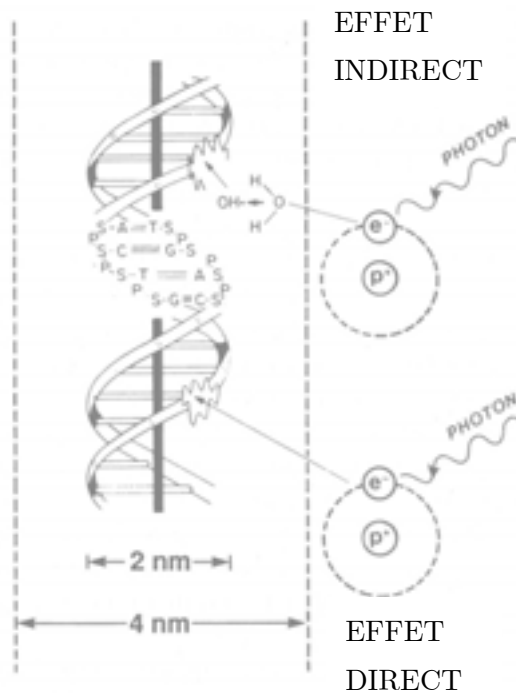
*Tableau I.2 : Facteurs de pondération correspondant aux différents types de tissus. La somme de tous ces facteurs est égale à 1 [7].*

Cette dose efficace est utilisée pour la définition des normes de radioprotection.

### **1.1.5 Les effets des rayonnements ionisants sur le vivant**

Les effets biologiques des radiations sont principalement générés par des dommages induits sur l'ADN. Si un rayonnement ionisant (X,  $\gamma$ , neutrons ou particules chargées) est absorbé dans un milieu biologique, il peut interagir directement avec une molécule d'ADN. Les atomes de cette molécule seront alors ionisés ou excités, ce qui va induire une cascade d'événements conduisant aux dommages biologiques. Ce phénomène est appelé l'**effet direct** d'une radiation. D'autre part, une particule traversant une cellule peut interagir avec d'autres molécules, principalement les molécules d'eau qui constituent 80% d'une cellule. Cette interaction peut mener à la

formation de radicaux libres qui sont des molécules très réactives en raison de la présence d'un électron non apparié sur les couches externes d'un de leurs atomes. Ces radicaux libres, une fois créés, peuvent réagir chimiquement avec les molécules critiques de la cellule telles que l'ADN (figure I.1). Ce phénomène est appelé l'**effet indirect** d'un rayonnement.



*Fig I.1 : Représentation schématique des effets direct et indirect des rayonnements (ici un photon) sur l'ADN. L'électron secondaire éjecté par le photon incident va endommager l'ADN (effet direct) ou interagir avec une molécule d'eau pour créer un radical libre ( $\text{OH}^\bullet$ ) qui va réagir avec l'ADN (effet indirect). On estime que les radicaux libres créés à une distance inférieure à deux fois la taille de la double hélice ( $\sim 4$  nm) peuvent affecter l'ADN.*

Suite à l'irradiation, deux cas sont envisageables :

- la lésion de l'ADN n'est pas réparable et provoquera la mort cellulaire à plus ou moins long terme. On parle alors de nécrose ou d'apoptose (mort cellulaire programmée).
- la réparation de la lésion est possible. Si cette réparation n'est pas fidèle, la séquence des gènes sera modifiée, ce qui provoquera l'apparition de mutations géniques. Une modification morphologique du chromosome est également possible. On parle alors d'aberration chromosomique.

## 1.2 Risque associé aux faibles doses d'irradiation

L'estimation du risque lié à l'exposition à des rayonnements ionisants est basée sur des données épidémiologiques obtenues sur des cohortes choisies pour la qualité des données acquises. L'une des études de référence est celle de la cohorte LSS (Life Span

Study) établie à la suite des explosions de Hiroshima et Nagasaki. Cette cohorte compte 120 321 survivants sur lesquels l'induction de leucémies et de cancers solides a été étudiée. Ces données sont considérées comme fiables car un grand nombre de patients ont pu faire l'objet d'une reconstitution de dosimétrie individuelle. Pour les deux types de données (leucémies et cancers solides) cependant, les incertitudes à des doses inférieures à 200 mSv sont trop importantes pour valider un modèle fiable de calcul du risque [8][9].

Le risque lié aux faibles doses est actuellement estimé à partir d'évaluations à fortes doses (>200 mSv) par une extrapolation utilisant un modèle linéaire sans seuil [9][11]. Or diverses études épidémiologiques et biologiques semblent montrer que les réponses des tissus vivants à de faibles doses d'irradiation (de type environnementales) impliquent des mécanismes différents de ceux actuellement connus pour de fortes doses. Ce modèle « linéaire sans seuil » habituellement admis et utilisé pour la gestion du risque soulève un certain nombre d'interrogations concernant sa validité [9][10][21].

Des données complémentaires ont été relevées par le suivi d'expositions internes d'origine professionnelle aux émetteurs  $\alpha$ . Dans ce cas, la notion de dose efficace est utilisée car l'irradiation n'est pas homogène. Différentes études ont montré que, dans la gamme des faibles expositions, le risque calculé par extrapolation linéaire proportionnellement à la dose efficace de mesure est souvent surévalué par rapport au risque réel [28].

D'après une étude récente réalisée par l'académie des sciences américaine [12], 10 à 14% de la mortalité par cancer du poumon sur le territoire américain seraient dus à l'exposition au radon. Ces chiffres ont été obtenus par extrapolation du risque à partir de données épidémiologiques concernant l'exposition de mineurs d'uranium. Or, les cellules de l'épithélium des mineurs d'uranium peuvent être exposées à de multiples traversées de particules  $\alpha$  sur une courte période suite à l'inhalation de radon. Ce cas de figure est extrêmement rare pour les personnes soumises à des expositions domestiques.

L'ensemble de ces données montrent que l'hypothèse d'extrapolation linéaire n'est pas la plus légitime à faible dose. En effet, à ce niveau, des mécanismes indirects tels que l'effet de proximité (ou effet « bystander ») où la réponse adaptative (cf. paragraphe 1.3) peuvent avoir une importance non négligeable et remettent en cause un certain nombre de postulats. Une étude des différents mécanismes mis en jeu à ces faibles doses au niveau de la cellule est donc nécessaire.

### 1.3 Phénomènes particuliers impliqués à faible dose

#### 1.3.1 L'effet de proximité

Il s'agit de l'induction de dommages dans des cellules non irradiées dans une population où seules quelques cellules ont été traversées par des particules. La première observation de ce mécanisme *in vitro* après irradiation avec des particules de fort TLE date de 1992 [13]. De nombreuses études expérimentales montrent que différents effets biologiques spécifiques surviennent dans la population de cellules non touchées au voisinage du point d'impact des ions (hors de portée des électrons secondaires). Ce phénomène remet en cause l'hypothèse de réponse individuelle de chaque cellule. La section efficace de la cible peut être alors considérée comme supérieure à la dimension de la cellule [14].

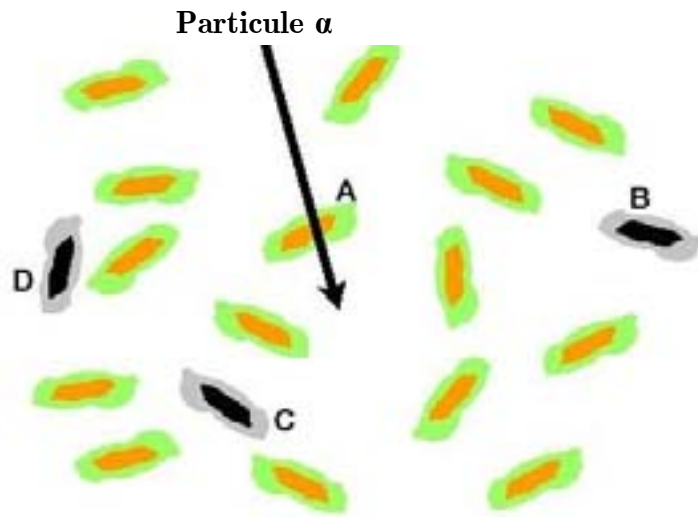


Fig. I.2 : Représentation schématique de l'effet de proximité radio-induit. Une particule  $\alpha$  traverse la cellule A. Des dommages sont induits dans les cellules B, C et D même si celles-ci ne sont pas touchées directement [15].

Le mode de transmission des dommages entre les cellules n'a pas encore été élucidé complètement. Le signal de réponse aux dommages pourrait être transmis via des « gap junctions » (jonction de contact liant deux cellules) [16]. Une induction de dommages à plus longue portée a également été observée et pourrait découler de la sécrétion d'agents de transmission dans le milieu intercellulaire [17-19].

L'effet de proximité peut avoir une influence importante sur le risque à faible dose. Dans cette configuration en effet, l'occurrence des traversées de cellules est faible. De plus ces traversées sont très espacées dans le temps. Ce mécanisme indirect de création de dommages peut alors devenir prépondérant dans la réponse de tissus aux radiations. Aux plus fortes doses, l'effet direct prédomine sur le comportement de la relation liant la dose à l'effet.

Les microfaisceaux, qui permettent d'irradier sélectivement quelques cellules au milieu d'une population sont des outils tout à fait adaptés aux études sur la communication intercellulaire [20-22]. Des revues détaillées traitant des connaissances actuelles de ce phénomène et de l'importance des études par microfaisceaux ont été publiées récemment [23-25].

### ***1.3.2 La réponse adaptative***

La réponse adaptative aux rayonnements ionisants a été mise en évidence de manière reproductible pour la première fois en 1984 [27]. Ce phénomène suggère qu'une exposition à une faible dose de rayonnements peut déclencher des mécanismes protecteurs qui rendront les cellules moins sensibles à une irradiation ultérieure à plus forte dose. L'effet de proximité présenté précédemment et la réponse adaptative auraient donc des effets opposés sur la réponse d'une population cellulaire. L'effet de proximité aurait tendance à amplifier les effets délétères par rapport à ceux prédits si l'on ne considère que les effets directs. La réponse adaptative quand à elle aurait tendance à atténuer ces effets dans le cas d'expositions chroniques à de faibles doses.

Une étude publiée récemment montre un lien entre ces deux effets [21]. Dans ce cas, une première exposition à une dose de  $2 \cdot 10^{-3}$  Gy de photons X abolit partiellement l'effet de proximité (évalué en terme de survie clonogénique) engendré par l'exposition à des particules  $\alpha$  effectuée six heures après. Ces résultats suggèrent que l'exposition à de faibles doses pourrait également déclencher un mécanisme capable d'atténuer le signal émis par les cellules touchées par des particules  $\alpha$  en direction des cellules non irradiées.

Ces types de réponses cellulaires aux faibles doses de rayonnements ionisants montrent la complexité de la relation liant la dose reçue aux effets biologiques observés.

## 2. Apports des microfaisceaux

### 2.1 Contrôle de la dose au niveau cellulaire

Un des moyens les plus répandus permettant l'étude des réponses cellulaires à une irradiation par des particules à fort TLE consiste à irradier des cellules en culture à l'aide d'un faisceau d'ions préalablement extrait à l'air. Les cellules sont généralement adhérentes en monocouche et conservées dans un milieu nutritif (si possible à 37°C) contenu dans des puits de culture scellés. Cette technique donne des résultats satisfaisants lorsque des doses modérées ou fortes sont en jeu.

Les faibles doses sont quant à elles beaucoup plus difficiles à reproduire pour des irradiations de lignées cellulaires. La méthode généralement utilisée est l'irradiation par faisceaux d'ions de faible fluence. Le nombre moyen d'ions ayant interagi avec chaque cellule est déterminé en connaissant le rapport de la section géométrique des cibles considérées (surface de la cellule ou du noyau) et de la fluence (nombre d'ions par unité de surface) du faisceau incident. A partir de loi de distribution statistique des impacts dans la population de cellules, le nombre de cellules touchées par  $n$  particules est déterminé.

Or, lorsque l'on considère des expositions de type environnementales, il est très rare qu'une cellule soit traversée par plus d'une particule au cours de sa vie. Si l'on veut reproduire ces conditions par irradiation aléatoire, on se heurte alors à une loi statistique de Poisson [28]. Pour un ion en moyenne traversant chaque cellule, 37% des cellules ne seront pas touchées et 26% subiront des impacts multiples. De plus, la variété des sites sub-cellulaires touchés (noyau ou cytoplasme), les effets indirects induits par les cellules voisines touchées ou par des impacts dans le milieu extracellulaire vont compliquer sérieusement l'interprétation des données.

Le développement de microfaisceaux d'ions pour l'irradiation de cellules vivantes permet de s'affranchir de ces limites expérimentales. En effet, l'utilisation de ces instruments pour des irradiations ciblées, cellule par cellule et contrôlées ion par ion est la seule méthode permettant de contrôler le nombre exact de particules délivrées à chaque cellule, de déterminer la position du point d'impact de chaque ion avec une précision de quelques micromètres, et d'irradier sélectivement certaines cellules dans une population afin d'observer les réponses de cellules voisines non irradiées.

## 2.2 Discrimination des sites sub-cellulaires

Il est maintenant communément admis que les dommages créés indirectement sur l'ADN ont une importance non négligeable dans les effets biologiques observés. De même, contrairement à ce qui a été supposé pendant longtemps, le noyau cellulaire n'est pas la seule cible critique présente dans la cellule. Les microfaisceaux actuels, grâce à leur résolution spatiale de quelques micromètres, permettent d'irradier sélectivement des compartiments sub-cellulaires. Des travaux menés à l'université de Columbia à New York ont par exemple montré que l'irradiation du cytoplasme cellulaire avec une particule  $\alpha$  doublait le taux de mutations par rapport aux mutations spontanées [29]. L'ajout d'un chélateur de radicaux libres a par ailleurs permis de réduire d'un facteur 4 le taux de mutations, ce qui suggère que les dommages engendrés par une traversée du cytoplasme seraient liés à la production de ces radicaux libres. De plus, l'irradiation cytoplasmique n'induit pratiquement pas d'augmentation de la mortalité cellulaire, les cellules ainsi irradiées peuvent par conséquent muter tout en restant viables.

Le mode de transmission des dommages du cytoplasme vers le noyau n'est pas encore bien connu. Il pourrait impliquer des cascades plus complexes que la production des radicaux oxygénés de type  $\text{OH}^\bullet$  qui ont une durée de vie très courte. Le lecteur pourra se reporter à la référence [29] pour plus de détails.

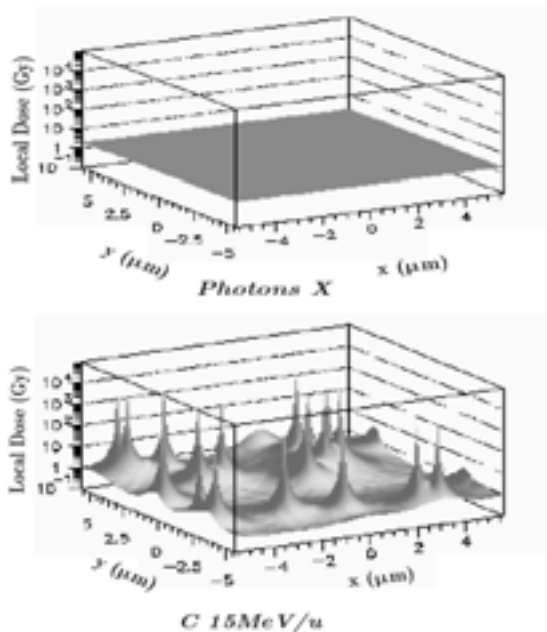
## 2.3 Aide aux modèles de dosimétrie

La microdosimétrie s'est beaucoup développée ces dernières années. La démarche est différente de celles utilisées dans les travaux précédents. Il s'agit ici de maîtriser la modélisation de phénomènes à l'échelle de quelques nanomètres (typiquement les dimensions de la trace d'une particule chargée) afin de corréliser la dose locale dans la trace de l'ion à la structure cellulaire.

Des techniques de simulations numériques peuvent permettre de mieux connaître la répartition des dommages en fonction des caractéristiques des particules considérées. En effet, pour des particules de fort TLE, la dose est délivrée de manière très localisée. La dose locale peut alors atteindre des valeurs extrêmement élevées. La densité des dommages et les mécanismes de réparation mis en jeu sont alors différents de ceux impliqués pour des rayonnements de faible TLE pour lesquels la dose est répartie plus uniformément (fig. I. 3).



Parmi les différents outils utilisés pour l'étude des réponses cellulaires à la traversée de particules, les microfaisceaux sont ceux qui permettent la meilleure maîtrise de la géométrie de l'irradiation. Ces techniques expérimentales pourraient permettre la validation de certains modèles utilisés ou encore le développement de nouveaux modèles.



*Fig. I.3 : Exemple de distribution spatiale de la dose déposée par des photons X et des ions carbone distribués aléatoirement. Pour des expositions à des particules chargées de forts TLE (en bas), la dose délivrée dans des traces individuelles peut atteindre  $10^4$  Gy au centre de la trace. La dose délivrée par les photons X est uniforme (en haut). Source : [15]*

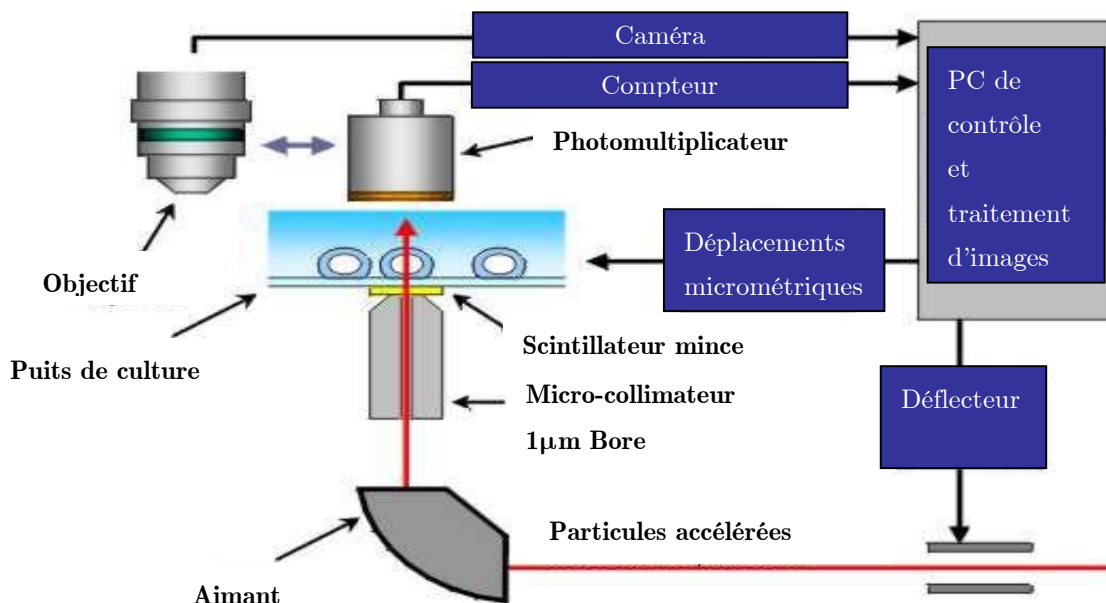
### 3. Les microfaisceaux en fonctionnement

Il existe actuellement quatre lignes microfaisceau de particules chargées complètement opérationnelles pour des applications en radiobiologie. Trois de ces laboratoires disposent d'accélérateurs électrostatiques de type Van de Graaff et la taille micrométrique du faisceau est obtenue par simple collimation (cf. chapitre II). Les particules utilisées sont généralement des protons, particules  $\alpha$  ou des noyaux de  ${}^3_2\text{He}$  qui ont un effet biologique similaire aux particule  $\alpha$ . Un dispositif développé auprès d'un cyclotron délivrant des ions lourds à des énergies supérieures à 10 MeV/nucléon existe également à Takasaki au Japon [30].

Le seul dispositif européen en fonctionnement est celui du Gray Laboratory à Northwood, Royaume-Uni [2][3] (figure I.4). Ce dispositif est utilisé pour des études de radiobiologie depuis 1997. Ces dernières années, l'effet de proximité a été étudié aussi bien au niveau de la cellule [20][31][32] qu'au niveau de tissus [33][34].

Depuis quelques années, un dispositif de deuxième génération est en cours de développement. Des améliorations techniques permettant notamment une augmentation de la fréquence d'irradiation et une meilleure efficacité des techniques de repérage cellulaire ont été apportées [35].

Le laboratoire dispose également d'un microfaisceau de photons X de basse énergie présentant une résolution spatiale de quelques centaines de nanomètres [36].

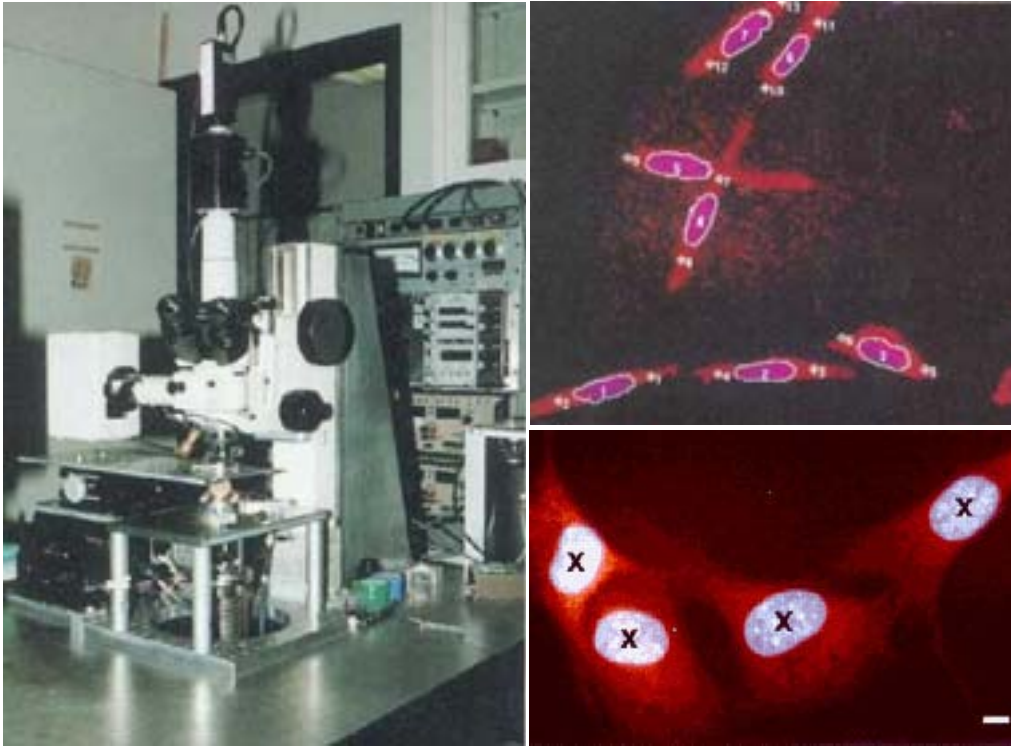


*Fig. I.4 : Principe de fonctionnement d'un microfaisceau collimaté vertical servant à l'irradiation ion par ion de cellules en culture. Le dispositif représenté ici est celui du Gray Laboratory. Les particules sont comptées par un détecteur situé avant les cellules. Une fois que le nombre de particules requis a atteint la cible, le faisceau est coupé par un déflecteur électrostatique. Les cellules sont localisées grâce à un système de microscopie par fluorescence et positionnées à l'aide d'un étage motorisé de déplacement micrométrique. Nous reviendrons plus en détail sur le principe de fonctionnement de ce genre de dispositif au chapitre II.*

Le deuxième dispositif est celui du RARAF (Radiological Research Accelerator Facility) de l'université de Columbia à New York. Les premières irradiations réalisées avec ce système date de 1997 [37]. Ce dispositif d'irradiation diffère des autres par la configuration choisie pour le système de détection et de comptage des particules qui est situé après le puits de culture [38] (cf. chapitre II).

Le développement d'un système de focalisation et d'une source laser permettant la production d'ions lourds [39][40] sont en cours.

De nombreux résultats concernant l'effet de proximité, la réponse adaptative et la sensibilité aux irradiations cytoplasmiques ont été obtenus grâce à ce dispositif [21][29][41-46].



*Fig. 1.5 : Photographie de l'étage terminal du dispositif du RARAF de l'université de Columbia (à gauche). On distingue le tube d'extraction du faisceau (vertical) et le système de microscopie permettant la visualisation des cellules en culture. La double coloration des cellules permet de distinguer le noyau et le cytoplasme (à droite). La cible d'intérêt peut ensuite être choisie. Photos : Physics Today, septembre 99 et La Recherche n° 326, Décembre 99.*

Enfin, un dispositif d'irradiation existe également à l'Université Texas A&M à College Station. Les premiers travaux impliquant ce système d'irradiation ont également été publiés en 1997 [26]. Celui-ci se situait alors au Pacific Northwest Laboratory dans l'état de Washington et son déplacement a pris quelques années. Il est maintenant opérationnel. Le laboratoire dispose également d'un microfaisceau d'électrons permettant d'étudier les effets de particules de faible TLE de même

nature que les électrons secondaires générés par des photons ou des particules de forts TLE.

Au cours de ces dernières années, un certain nombre de groupes se sont engagés dans le développement de lignes microfaisceau pour des applications en radiobiologie (tableau I.3). D'autres dispositifs permettant l'irradiation cellulaire ciblée avec des photons X (générateurs X ou synchrotrons) ou des électrons sont également en cours mise au point.

Laboratoire	Particules	En fonctionnement	Applications en biologie (Publiées)
Gray Laboratory Royaume-Uni	p, ${}^3_2\text{He}$	Oui	Oui
Gray Laboratory Royaume-Uni	X mous	Oui	Oui
Columbia University I	$\alpha$	Oui	Oui
Columbia University II	ions lourds	Non	Non
Texas A&M	p, $\alpha$	Oui	Oui
Texas A&M	electrons	Oui	Non
JAERI Takasaki	ions lourds	Oui	Oui
PTB Braunschweig Allemagne	p, $\alpha$	Oui	Oui
GSI Darmstadt	ions lourds	Oui	Non
INFN Legnaro Italie	p, $\alpha$	Non	Non
Universität Leipzig, Allemagne	p, $\alpha$	Non	Non
MIT Boston USA	p, $\alpha$	Oui	Non
Technische Universität München, Allemagne	p, ions lourds	Non	Non

*Tableau I.3 : Les dispositifs de microirradiation à l'échelle cellulaire dans le monde.*



## **Chapitre II**

### **LA LIGNE MICROFAISCEAU**





Le développement de la ligne d'irradiation s'est appuyé sur la ligne microfaisceau déjà en service depuis une dizaine d'années au CENBG. En regard des dispositifs d'irradiation présentés dans le chapitre précédent, la ligne de faisceau du CENBG présente deux originalités. Tout d'abord, celle-ci est horizontale. Ensuite, la taille micrométrique du faisceau sur la cible est obtenue par focalisation et non pas par collimation. Comme mentionné dans le chapitre précédent, d'autres lignes ion par ion actuellement en développement sont basées sur des microfaisceaux focalisés et horizontaux déjà existants tels que le dispositif du GSI à Darmstadt [47], du PTB à Braunschweig [48] ou SNAKE à Munich [49]. L'équipe du RARAF de l'université de Columbia à New York prévoit également la mise au point d'un système focalisé [50]. Cependant à ce jour, aucun résultat concernant des irradiations à l'échelle cellulaire réalisées à l'aide de faisceaux focalisés n'a été publié.

Le but de ce chapitre est d'introduire les techniques relatives à l'obtention et à l'utilisation de microfaisceaux d'ions. Nous débuterons par une comparaison des dispositifs collimatés verticaux en fonctionnement et des dispositifs focalisés horizontaux initialement développés pour d'autres applications. Le principe de fonctionnement et les caractéristiques de la microsonde nucléaire du CENBG seront ensuite présentés. Nous nous attarderons sur un mode de fonctionnement particulier de cette microsonde : le mode faible flux, utilisé pour certaines techniques d'imagerie et pour l'irradiation ion par ion. Enfin nous décrirons les méthodes générales permettant le contrôle du nombre d'ions sur cible.

## **1. Obtention d'un microfaisceau : deux techniques possibles**

Réduire un faisceau d'ions à une taille de quelques micromètres peut se faire de deux manières différentes. La première consiste à placer un collimateur de taille micrométrique sur la trajectoire des ions, juste avant la cible. On obtient ainsi une taille de faisceau proche de celle du collimateur utilisé. Les particules diffusées sur les bords de ce collimateur limitent cependant la résolution à quelques micromètres. Cette technique, relativement simple à mettre en œuvre, ne peut cependant pas être utilisée pour obtenir des microfaisceaux permettant l'analyse de matériaux ; elle conduirait en effet à des flux de particules sur cible beaucoup trop faibles et incompatibles avec les applications envisagées. La deuxième méthode passe par la mise en place d'un dispositif de focalisation électromagnétique permettant, à partir de fentes objet, d'obtenir dans le plan focal une image aussi réduite que possible. Cette

méthode est utilisée pour tous les microfaisceaux (et maintenant nanofaisceaux) en fonctionnement pour des applications analytiques.

Pour des irradiations en mode ion par ion à l'échelle de la cellule, le flux de particules du faisceau primaire doit être suffisamment réduit pour permettre d'isoler une particule. La technique de collimation, suffisante pour obtenir des tailles de faisceau inférieures à la taille d'une cellule, peut donc être envisagée. Les premiers microfaisceaux développés pour cette application ont utilisé cette solution relativement simple et peu coûteuse (cf. chapitre I). Au cours des dernières années, un certain nombre d'équipes ont cependant entrepris le développement de lignes d'irradiation ion par ion basées sur des dispositifs focalisés. La focalisation présente en effet deux atouts majeurs :

- elle permet d'obtenir des faisceaux plus fins que ceux obtenus par collimation, bien que cet avantage soit modulé par la nécessité d'extraire le faisceau à pression atmosphérique pour des irradiations de cellules vivantes.
- le faisceau peut être déplacé à l'aide de plaques de balayage électrostatique. Pour des faisceaux d'ions légers de basse énergie, la fréquence d'irradiation peut alors être décuplée par rapport à un positionnement mécanique de chaque cellule devant un collimateur.

Les lignes collimatées développées pour l'irradiation ion par ion sont toutes des lignes verticales. Compte tenu de la nature des échantillons à irradier, les dispositifs permettant de garder les cellules sur un support horizontal présentent un certain nombre d'avantages. Les lignes initialement conçues pour l'analyse sous vide sont, quant à elles, généralement horizontales, ce qui impose de positionner l'échantillon verticalement.

Les lignes de faisceau horizontales ne sont pas incompatibles avec des applications en radiobiologie à l'échelle cellulaire. Beaucoup de systèmes d'irradiations classiques utilisant des macrofaisceaux sont d'ailleurs basés sur des lignes horizontales. Les cellules ayant la propriété de pouvoir adhérer à un support, l'échantillon peut être maintenu verticalement en prenant quelques précautions. Cependant, les lignes verticales présentent un meilleur confort à l'utilisation, la configuration de l'étage terminal se rapprochant d'une paillasse de laboratoire. De plus, lorsque le puits de culture contenant les cellules est positionné horizontalement, l'utilisation d'un objectif à immersion plongé directement dans le milieu de culture est possible [51]. Cette

configuration permet d'éviter les problèmes de localisation des cellules liés à la différence d'indice optique entre le milieu de culture où sont maintenues les cellules et l'air. La propagation des rayons lumineux dans différents milieux optiques pouvant entraîner des décalages entre la position observée et la position réelle des cellules.

Malgré ces désavantages, les systèmes d'irradiations développés à partir de microfaisceaux préexistants conservent généralement leur configuration horizontale. Le passage à une configuration verticale nécessite en effet la modification de la ligne dans son ensemble.

## **2. La microsonde nucléaire du CENBG**

D'une manière générale, la microsonde nucléaire peut être vue comme un outil de microscopie, principalement dédié à l'analyse de matériaux. Son principe de fonctionnement est proche de celui d'un microscope électronique. Un faisceau d'ions légers de quelques MeV est fortement collimaté puis focalisé jusqu'à une taille de l'ordre de quelques micromètres sur la cible. Des plaques de déflexion électrostatique situées à la sortie du système de focalisation permettent un balayage bidimensionnel du faisceau dans le plan de la cible donnant ainsi accès à une cartographie 2D de l'échantillon à analyser. On trouvera une description détaillée de la microsonde du CENBG (figure II.1) dans la référence [52].

Le faisceau d'ions est délivré par un accélérateur électrostatique de type Van de Graaff 4MV. Ce type d'accélérateur présente un double intérêt pour l'obtention de microfaisceaux focalisés. Tout d'abord, il est équipé d'une source radio fréquence très brillante donnant accès à des flux de particules élevés, même après collimation. Ensuite ce type d'accélérateur permet d'obtenir des faisceaux très stables en énergie ( $\Delta E/E \approx 10^{-3}$ ) et en position, ce qui est une condition indispensable à l'obtention d'une bonne résolution spatiale sur cible.

Le faisceau délivré en sortie d'accélérateur est guidé vers un aimant d'analyse par une série de lèvres et de déflecteurs électromagnétiques. Lors du passage dans l'aimant, seuls les ions ayant le rapport masse/charge souhaité seront défléchis de manière à pénétrer dans la ligne de faisceau. La position du faisceau en sortie d'aimant est asservie grâce à des lèvres de régulation permettant une rétroaction au niveau du potentiel accélérateur. Après être passées entre les lèvres de régulation, les particules entrent dans la ligne.

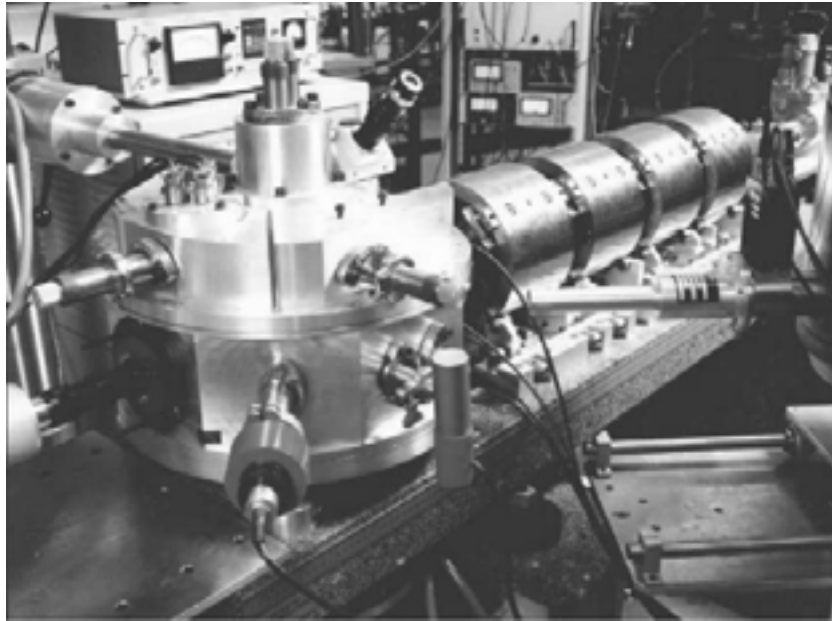


Fig. II.1 : La ligne microfaisceau du CENBG. On distingue la chambre d'analyse au premier plan et les quadrupôles au second plan

## 2.1 Les différents constituants de la microsonde

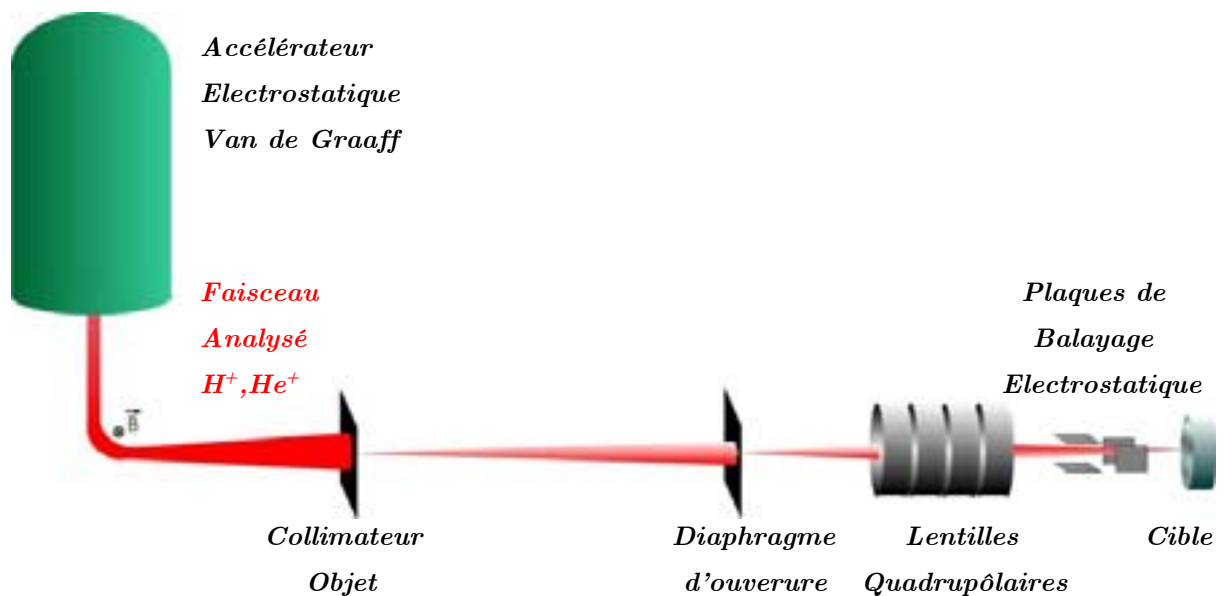


Fig. II.2 : Schéma de principe de la microsonde nucléaire du CENBG : de la source d'ions à la cible.

### ***2.1.1 Dispositif de focalisation***

A la sortie de l'aimant d'analyse, le faisceau d'ions est mis en forme selon le principe montré sur la figure II.2.

Le système de focalisation présente des caractéristiques similaires à celles d'un système optique centré. Quatre lentilles quadrupôlaires magnétiques couplées deux à deux en un quadruplet de type Dymnikov [53] donnent l'image d'un collimateur objet situé 5.4 mètres en amont sur la ligne. L'intérêt majeur de ce type de configuration pour les lentilles focalisantes (appelé système orthomorphique) est de présenter une symétrie cylindrique avec des facteurs de grandissement égaux dans les plans horizontal et vertical. L'utilisation de collimateurs objets circulaires permet donc d'obtenir une forme de faisceau circulaire sur cible.

La divergence angulaire du faisceau est limitée à l'entrée des lentilles focalisantes par un diaphragme d'ouverture. Différentes ouvertures sont accessibles permettant de limiter les aberrations optiques dues aux particules pénétrant dans les lentilles magnétiques loin de l'axe. L'ensemble du dispositif de focalisation (lentilles + diaphragme) est supporté par un banc optique en granit massif afin de limiter les vibrations mécaniques parasites pouvant affecter la résolution spatiale du faisceau.

Le facteur de grandissement de la microsonde du CENBG est de  $1/10$ . Les collimateurs objets couramment utilisés ont un diamètre variant de 5 à 50  $\mu\text{m}$  ce qui permet d'obtenir (en se limitant au premier ordre d'aberrations) des tailles de faisceaux comprises entre 0.5 et 5  $\mu\text{m}$  dans le plan focal.

### ***2.1.2 Système de balayage électrostatique***

Entre la sortie du dernier quadrupôle et le plan focal du système optique, une distance de travail de 23 cm a permis d'insérer des plaques de balayage électrostatique. Ce dispositif est constitué de deux paires de plaques : une pour la déflexion du faisceau dans le plan vertical, l'autre pour la déflexion dans le plan horizontal. Lors du fonctionnement en analyse, le balayage du faisceau est piloté de manière automatique pendant l'acquisition. Ce balayage est effectué point par point sur une matrice de  $n \times m$  pixels (généralement  $128 \times 128$ ), la durée d'acquisition sur chaque point étant de quelques millisecondes. Les tensions permettant de défléchir le faisceau sont appliquées aux plaques par des amplificateurs haute tension à tubes (Physicon, Scan Amplifier RSI224-2500) certifiés pour leur bonne stabilité.

Selon l'application et en fonction de l'énergie et de l'état de charge des ions du faisceau, la taille du balayage sur cible peut aller de quelques dizaines de micromètres à deux millimètres.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, cette possibilité de positionner le faisceau sur la cible grâce à un dispositif de déflection rapide est un des atouts majeurs des faisceaux focalisés pour des irradiations ciblées. En effet le temps nécessaire à une irradiation se trouve considérablement réduit par rapport à celui nécessaire avec un faisceau collimaté, où chaque cellule doit être positionnée mécaniquement devant le faisceau.

### ***2.1.3 La chambre d'analyse***

La chambre d'analyse (Fig. II.3), contenant les échantillons et les différents détecteurs, est située au bout de la ligne microfaisceau. Deux microscopes optiques permettent de visualiser l'échantillon. L'un des deux microscopes possède un fort grandissement ( $\times 100$ ) et est couplé à un écran vidéo via une caméra haute sensibilité. Il est possible, en positionnant un quartz luminescent dans le plan de focalisation des lentilles magnétiques, de visualiser en temps réel la position et la forme du faisceau. Les réglages de focalisation sont effectués manuellement en s'aidant de ce dispositif de visualisation. Selon la technique utilisée pour l'analyse, différentes configurations des détecteurs sont possibles.

Pour les analyses couplées PIXE (Particle Induce X-ray Emission)/ RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry), on utilisera deux détecteurs : une jonction Si(Li) pour la détection des rayonnements X et un détecteur en Silicium implanté pour la détection des particules rétrodiffusées. Ces deux détecteurs sont situés à  $135^\circ$  de part et d'autre de l'axe du faisceau (figure II.3).

Il est également possible d'effectuer des analyses en densitométrie d'un échantillon, soit en 2 dimensions pour la microscopie en transmission, soit en 3 dimensions pour la tomographie en transmission [54]. Un détecteur en Silicium implanté est alors placé à  $0^\circ$  derrière l'échantillon. Ce mode de fonctionnement nécessite des flux de particules beaucoup plus faibles que les autres modes d'analyses, le détecteur étant placé dans l'axe du faisceau.

Pour l'adaptation de la ligne en mode faisceau extrait ion par ion, cette chambre d'analyse devra être remplacée par un étage d'irradiation spécifique.

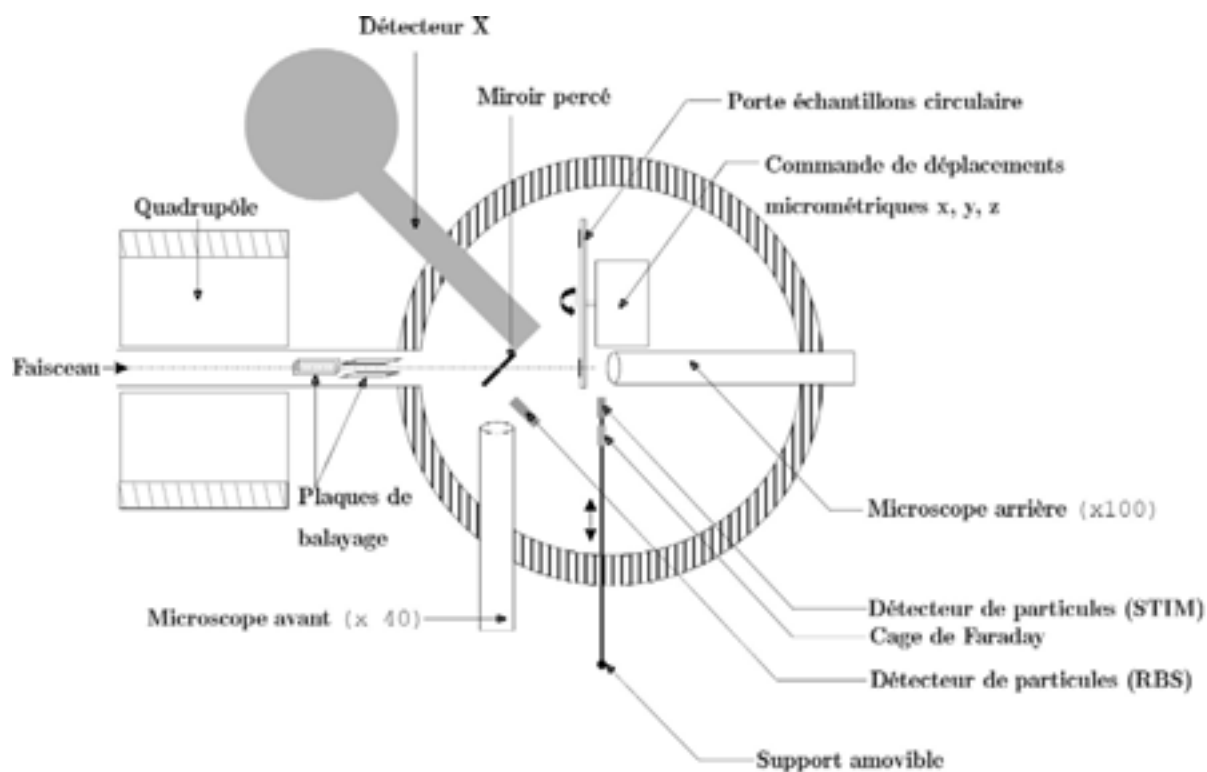


Fig. II.3 : Schéma technique de la chambre d'analyse. Vue en coupe horizontale. On y distingue les deux systèmes de microscopie servant aux repérages des échantillons ainsi que les détecteurs utilisés pour les techniques d'analyse par fluorescence X (PIXE) et rétro diffusion de particules (RBS).

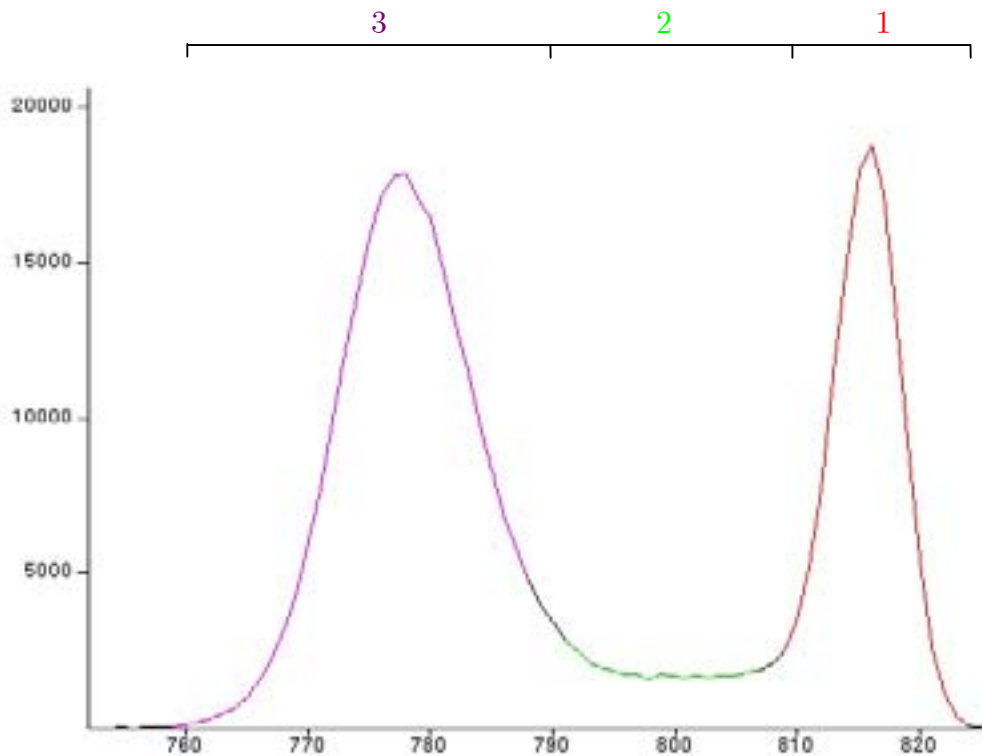
## 2.2 Fonctionnement en faible flux et microscopie ionique en transmission

Pour plus de confort dans la compréhension de la suite de ce manuscrit, il paraît important de détailler le fonctionnement de la microscopie ionique en transmission (STIM : Scanning Transmission Ion Microscopy). En effet, bon nombre de méthodes employées lors de l'utilisation de la ligne microfaisceau en irradiation sont proches de celles employées en microscopie en transmission, à commencer par la configuration du système de focalisation. Les cartographies obtenues par STIM sont également beaucoup utilisées lors des phases de tests et d'étalonnage du système d'irradiation.

### 2.2.1 La technique STIM

La technique d'analyse par STIM est basée sur un principe relativement simple : le faisceau est balayé sur l'échantillon à analyser et l'énergie résiduelle des particules

lorsqu'elles sortent du matériau est mesurée par un détecteur de particules placé dans l'axe du faisceau. L'analyse est réalisée point par point, on accède ainsi à une cartographie en deux dimensions de l'énergie transmise (figures II.4 et II.5). Dans la gamme d'énergie du microfaisceau, le ralentissement des particules est d'origine électronique. Pour un matériau donné, la perte d'énergie du faisceau est par conséquent directement reliée à sa masse surfacique ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ).



*Fig. II.4 : Exemple de spectre en énergie obtenu par STIM. L'échantillon est une grille de nickel de motif  $12,7\mu\text{m}$ . Le pic de plus haute énergie (1) correspond aux particules ayant l'énergie du faisceau, i.e. n'ayant pas interagit avec la grille. Les particules détectées à plus basse énergie (2 et 3) sont celles qui ont été ralenties dans les montants de la grille. Les bords de ces montants (2) étant moins épais (3) que leur centre.*



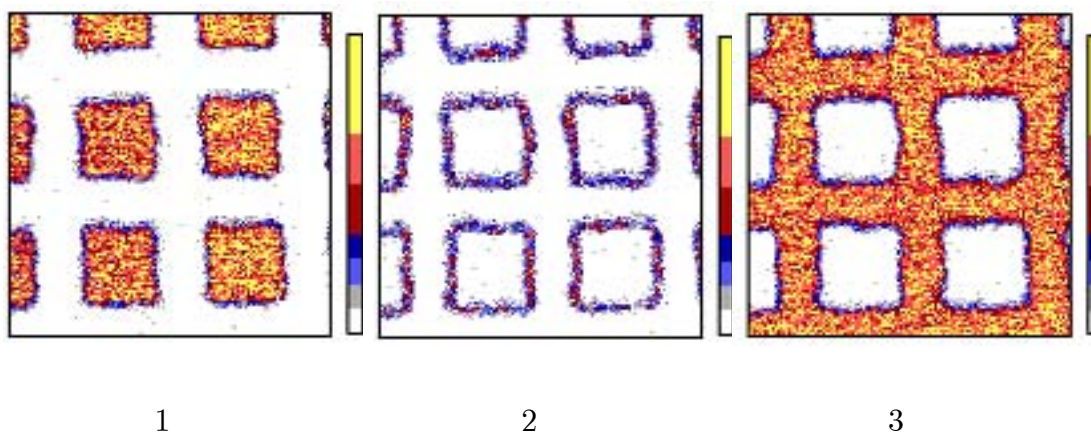


Figure II.5 : Exemple de microscopie en transmission sur une grille de Nickel 2000 mesh (motif  $12.7 \mu\text{m}$ ). La largeur de balayage est de  $33 \mu\text{m}$ . Les différentes cartographies représentées correspondent aux fenêtrages en énergie montrés sur la figure II.4.

### 2.2.2 Configuration faible flux

Que ce soit pour l'analyse de matériaux par mesure de perte d'énergie présentée précédemment ou pour l'irradiation contrôlée ion par ion, un flux de particules très faible au niveau de la cible est requis, compris typiquement entre quelques centaines et quelques milliers de particules par seconde. En effet, l'isolement de quelques particules à partir du faisceau primaire ne peut se faire que si le temps moyen séparant deux particules successives est au moins de l'ordre de la microseconde. La possibilité de définir la géométrie du faisceau à l'aide de collimateurs circulaires facilite la gestion du faisceau d'ions en mode faible flux. Pour arriver à une intensité si faible sur cible, le faisceau est donc fortement collimaté ; on utilisera typiquement un collimateur de diamètre  $5 \mu\text{m}$  comme objet et un collimateur de  $10 \mu\text{m}$  comme diaphragme d'ouverture. Le principal avantage d'une telle configuration est que la taille du faisceau sur cible est considérablement réduite par rapport à celle obtenue avec des configurations d'analyse à forts courants. En effet le collimateur objet ayant un diamètre inférieur à  $10 \mu\text{m}$ , on obtiendra la plupart du temps un faisceau sur cible d'un diamètre inférieur au micromètre.

### 3. Le contrôle du faisceau ion par ion

L'irradiation de cellules vivantes avec un nombre exact de particules nécessite des modifications importantes des lignes microfaisceaux consacrées à l'analyse de matériaux sous vide. L'objectif ici est de parvenir à isoler un certain nombre de particules (le cas limite étant une particule) à partir d'un faisceau initial et d'extraire ces particules dans l'air ambiant où se trouve l'échantillon.

#### 3.1 Principe de fonctionnement

Le principe général de fonctionnement d'un tel système est relativement simple (fig. II.6).

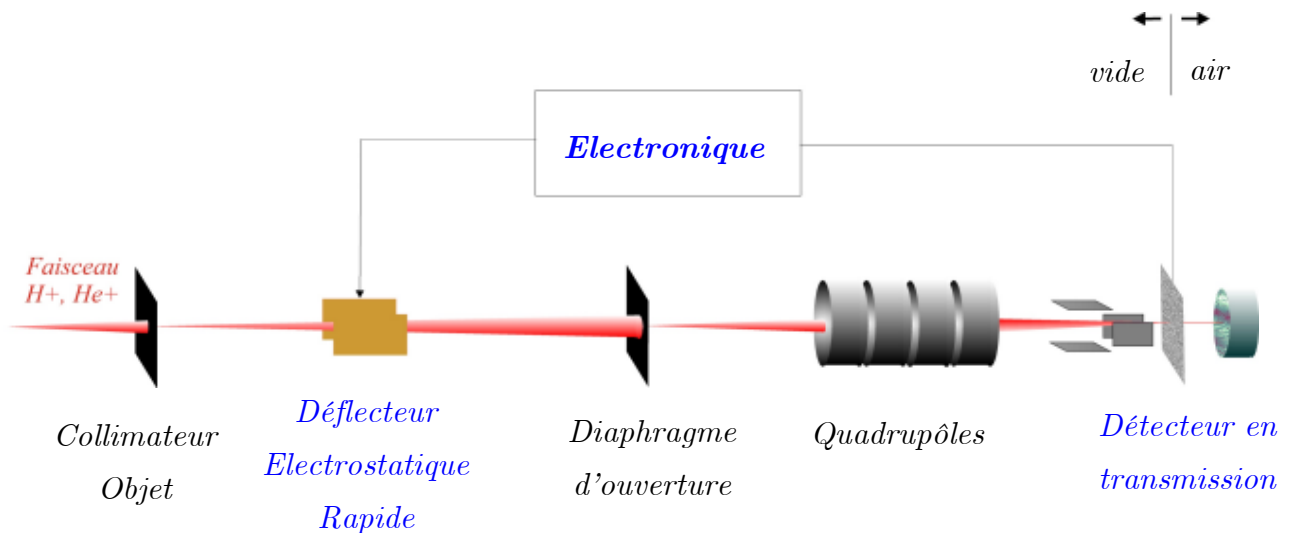


Fig. II.6 : Principe du contrôle ion par ion de la ligne du CENBG. Le faisceau est dévié par le déflecteur électrostatique commandé par le signal généré dans le détecteur en transmission via une électronique de mise en forme.

La trajectoire des particules est tout d'abord défléchie de manière à ce que celles-ci n'atteignent pas la cible. Cette déflexion est en général obtenue grâce à une haute tension appliquée à des plaques parallèles. Dans le cas représenté sur la figure II.6, les particules déviées par la différence de potentiel ne passeront plus dans le diaphragme d'ouverture. Le faisceau est ensuite ouvert en faisant chuter rapidement cette tension à 0V. Chaque particule atteignant la cible génère un signal dans le détecteur en transmission, ce qui permet de les compter avec précision. Une fois que le nombre de particules souhaité à atteint la cible, on impose de nouveau une haute tension sur le

défecteur et les particules suivantes sont stoppées. Comme nous l'avons abordé précédemment, le principe utilisé pour les faisceaux collimatés est le même, le collimateur situé avant la cible faisant office de coupe-faisceau.

Il est évident que le temps nécessaire au traitement des signaux électroniques et à la commutation doit être inférieur au temps minimum séparant l'arrivée de deux ions successifs. Ce point sera détaillé dans le chapitre IV.

### **3.2 Détection et comptage des ions**

Le dispositif de détection permettant de compter le nombre de particules délivrées sur la cible et de déclencher la commutation du faisceau dépend fortement de la nature et de l'énergie des particules à isoler. Le parcours des ions utilisés dans la cible va imposer le positionnement du détecteur (avant ou après la cible) et leur nature va conditionner le choix du type de détecteur à utiliser.

La configuration généralement retenue consiste à insérer un détecteur mince que les particules incidentes traversent avant d'atteindre la cible. En effet, au cours de l'irradiation, les cellules sont conservées dans un milieu humide que les particules ne peuvent en général pas traverser. Placer un détecteur après la cible est donc exclu.

Une exception notable est celle du dispositif du RARAF de l'université de Columbia à New York où le milieu de culture est retiré pendant l'irradiation, ce qui permet de disposer un détecteur après la cible [38]. Les cellules sont alors maintenues sous un flux de gaz humide empêchant leur déshydratation. Afin d'éviter les artefacts que pourrait engendrer un stress excessif des cellules, l'irradiation en milieu de culture paraît cependant plus appropriée.

La détection des particules en transmission pose un certain nombre de problèmes. Le détecteur doit être suffisamment fin pour perturber le moins possible le faisceau (notamment sa résolution spatiale) et comporter une quantité suffisante de matière pour que chaque particule y induise un signal détectable. Une fois encore, la nature et l'énergie des ions vont imposer la configuration du détecteur.

Les détecteurs les plus couramment utilisés sont des films minces de scintillateurs plastiques couplés à des photomultiplicateurs pour les ions légers, et des détecteurs d'électrons secondaires pour les dispositifs fonctionnant avec des ions lourds [47]. Lorsque les particules sont détectées après la cible, des détecteurs à gaz [38] et à semi-conducteurs peuvent être envisagés.

Les deux détecteurs développés au CENBG seront présentés dans les chapitres III et IV.

### **3.3 Commutation rapide du faisceau**

La commutation rapide du faisceau est un point central de la technique d'irradiation ion par ion. Les méthodes employées varient peu d'un dispositif à l'autre. Elles sont généralement basées sur une déviation électrostatique du faisceau empêchant les particules d'atteindre la cible. Cette déviation s'effectue à l'aide de plaques parallèles couplées à des dispositifs délivrant des hautes tensions. Des amplificateurs hautes tensions présentant des temps de montée très rapides ont été développés spécialement pour ce genre d'application. L'observation de la structure temporelle du faisceau en mode faible flux permet de constater que le temps minimum séparant deux particules successives est supérieure à une microseconde. Le temps nécessaire à la commutation du faisceau doit par conséquent être inférieure à la microseconde. Le développement de l'électronique de traitement du signal présenté au chapitre IV a dû prendre en compte cette contrainte.

### **3.4 Extraction des particules à l'air**

Irradier des cellules vivantes dans leur milieu de culture impose un certain nombre de contraintes sur les développements instrumentaux. La plus importante de ces contraintes est la nécessité d'extraire le faisceau de particules dans l'air. Il s'agit de mettre en place, sur la trajectoire du faisceau, un matériau réalisant l'interface entre le vide de la ligne de faisceau et l'air ambiant. Ce matériau devra être suffisamment solide pour tenir la différence de pression pendant un temps minimum correspondant au temps d'irradiation et suffisamment fin pour perturber le moins possible le faisceau d'ions qui aura à le traverser. De même, la distance qu'auront à parcourir les particules dans l'air devra être minimisée afin de perturber le moins possible le faisceau.

## 4. Conclusion

Malgré l'intérêt que les irradiations par microfaisceaux ont suscités dans le domaine de la radiobiologie, ces dispositifs sont encore peu nombreux à fonctionner de manière routinière. La lourdeur et la diversité des développements techniques associés à ces systèmes en sont sans doute la cause principale.

La microsonde nucléaire du CENBG, malgré une configuration différente de celles des lignes en fonctionnement actuellement, paraît être un outil tout à fait approprié pour ce genre d'études. Le dispositif de focalisation, qui permet déjà d'atteindre une résolution spatiale inférieure au micromètre sous vide, est un des atouts majeurs de cette ligne. En effet, seul ce type de dispositif peut permettre de repousser la limite théorique de résolution spatiale en s'affranchissant du phénomène de diffusion sur les bords de collimateurs.

Isoler quelques particules d'un faisceau et les extraire à l'air nécessite cependant d'introduire des matériaux (fenêtre d'extraction, détecteur en transmission) sur la trajectoire des ions. La relativement faible énergie des particules délivrée par l'accélérateur Van de Graaff (3.5 MeV au maximum) a nécessité une étude minutieuse des différents matériaux et des différentes configurations de l'étage d'extraction.



## **Chapitre III**

### **MODELISATION ET OPTIMISATION DU DISPOSITIF**





Contrairement aux techniques d'analyse classiques évoquées au chapitre II, l'irradiation ion par ion pour des études en radiobiologie nécessite l'extraction des particules à l'air et leur détection en transmission avant la cible. Ces contraintes imposent une étude approfondie des phénomènes entraînant une dégradation de la résolution spatiale du microfaisceau lors de son passage à travers les divers matériaux qui constituent les détecteurs ou la fenêtre d'extraction. D'autres phénomènes intervenant le long de la ligne de faisceau sous vide peuvent également avoir un impact non négligeable sur la résolution finale obtenue. C'est le cas notamment de la diffusion des particules sur les bords des différents collimateurs et sur les molécules du gaz résiduel présent dans la ligne de faisceau. Les codes de simulations numériques de type Monte-Carlo sont les outils les mieux adaptés à ce genre d'études. Ils permettent de modéliser les effets des divers matériaux rencontrés en fonction des caractéristiques des particules.

Ce chapitre sera consacré à la présentation de simulations réalisées au cours de ce travail de thèse, validées par des résultats expérimentaux. Nous commencerons par un bref rappel sur le phénomène de diffusion Coulombienne participant à la déviation angulaire des ions dans le milieu traversé. Celui-ci sera suivi d'une introduction aux théories traitant de la diffusion multiple, phénomène prédominant aux petits angles. Des études expérimentales de diffusion de particules chargées dans des feuilles minces, menées sur la ligne microfaisceau afin de recouper les résultats des simulations seront ensuite exposées. A cette occasion, les outils de simulation Monte-Carlo, très peu utilisés jusqu'ici à l'échelle du micromètre, ont pu être évalués. Nous présenterons les codes Monte-Carlo utilisés ainsi que la comparaison de leurs prédictions à l'échelle du micromètre avec les résultats expérimentaux. Enfin, les simulations réalisées pour l'aide au développement de systèmes de détection en transmission seront présentées.

## **1. Rappels sur la diffusion Coulombienne**

### **1.1 La diffusion simple**

Lorsqu'une particule chargée traverse la matière, sa trajectoire est modifiée par les interactions Coulombiennes avec les atomes constituants du milieu. La première description classique de ce phénomène est due à Rutherford. La formule bien connue associée à son nom permet d'obtenir la probabilité pour une particule chargée d'être diffusée à un certain angle par une autre particule chargée. La section efficace

différentielle de diffusion (liée à cette probabilité) d'une particule chargée de masse  $M_1$  par un noyau atomique de masse  $M_2$  dans un angle solide  $2\pi \sin \theta d\theta$  s'exprime sous la forme (dans le repère du centre de masse) [55] :

$$d\sigma(\theta) = \left( \frac{(Z_1 Z_2 e^2)}{4E} \right)^2 \cdot \frac{1}{\sin^4 \theta / 2} \cdot 2\pi \sin \theta d\theta \quad (1)$$

où :

$d\sigma(\theta)$  est la section efficace élémentaire de diffusion à l'angle  $\theta$ .

$Z_1$  et  $Z_2$  sont respectivement les états de charge de la particule incidente et du noyau cible.

$E$  est l'énergie de la particule incidente.

La section efficace donnée ci-dessus reflète donc la probabilité pour une particule d'être diffusée dans un angle solide élémentaire autour d'un angle  $\theta$ . Dans le cas d'un faisceau d'ions traversant un matériau, la particule 1 est un ion incident et la particule 2 est un noyau atomique du matériau de la cible. Dans ce type de configuration, le phénomène prépondérant est la diffusion vers l'avant, i.e. la diffusion à petit angle ( $\theta \approx 0$ ). Dans ce domaine angulaire, l'expression de cette section efficace diverge et n'est plus valable car elle ne tient pas compte de l'effet d'écran des électrons du cortège atomique. La contribution de ces électrons peut être prise en compte en remplaçant  $Z_2$  par  $Z_2 - F(\theta)$  où  $F(\theta)$  est le facteur de forme de l'atome [55].

Dans le cas de la traversée d'un matériau, la trajectoire de la particule incidente va être soumise à un grand nombre de diffusions. Diverses études théoriques, dites de diffusion multiple ont été menées pour décrire ce phénomène.

## 1.2 La diffusion multiple

Les études théoriques fondatrices traitant du phénomène de diffusion multiple sont dues à Molière [56][57], Goudsmit et Saunderson [58] et Lewis [59]. Ces études passent par la résolution de l'équation de transport [60]:

$$\frac{\partial f(\vec{x}, \vec{v}, s)}{\partial s} + \vec{v} \cdot \vec{\nabla} f(\vec{x}, \vec{v}, s) = N \int [f(\vec{x}, \vec{v}', s) - f(\vec{x}, \vec{v}, s)] \sigma(\vec{v} \cdot \vec{v}') d\vec{v}' \quad (2)$$

Dans laquelle :

$\vec{x}$  est le vecteur position de la particule incidente.

$\vec{v}$  est le vecteur unitaire donnant la direction de déplacement de la particule avant collision.

$\vec{v}'$  est le vecteur unitaire donnant la direction de déplacement de la particule après collision.

$s$  est l'abscisse curviligne de la particule.

$\sigma$  est la section efficace de diffusion simple par unité d'angle solide.

$N$  est le nombre de centre diffuseurs de la cible par unité de volume.

$f$  est la fonction de distribution recherchée.

L'intégrale se faisant sur l'angle solide.

Pour résoudre cette équation, Molière a utilisé une approximation des petits angles et une expansion en fonctions de Bessel de la fonction de distribution. Goudsmit et Saunderson puis Lewis ont utilisé un développement de la fonction de distribution en polynômes de Legendre. Ces deux théories sont valables à tout angle. Une revue de ces modèles ainsi qu'une description de leur utilisation dans des codes de simulation Monte-Carlo pourront être trouvées dans la référence [61]. Ces modèles sont en effet très utilisés dans les simulations numériques car ils permettent de réduire considérablement le temps nécessaire au calcul de l'effet d'une épaisseur de matériau sur le trajet d'une particule (cf. paragraphe 3.1).

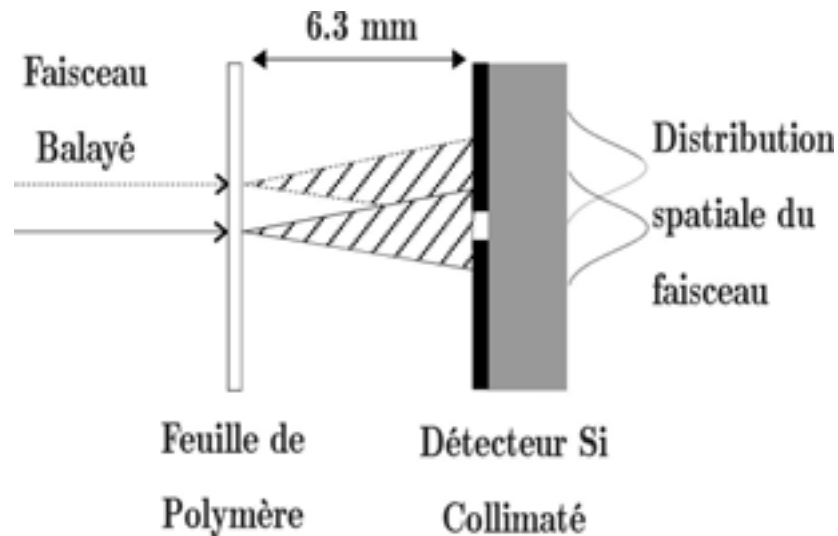
## 2. Mesures expérimentales par microfaisceau

### 2.1 Méthode expérimentale

Une mesure de l'élargissement du microfaisceau d'ions après la traversée de différentes feuilles minces a été effectuée au CENBG [63]. Pour cela, la méthode suivante a été employée :

Le faisceau est balayé sur une feuille de polymère d'épaisseur connue placée dans le plan image de l'optique magnétique. Pour chaque position du faisceau, les particules

traversant cette feuille sont détectées par un détecteur silicium collimaté placé dans l'axe du faisceau et à 6.3 mm en aval (fig. III.1).



*Fig. III.1 : Méthode de mesure de l'ouverture angulaire d'un faisceau d'ions après traversée d'une feuille de polymère. Après déconvolution, le profil gaussien du faisceau est accessible.*

La distribution spatiale dans le plan transverse des particules du faisceau est de type gaussienne. En effet, le processus de diffusion multiple peut être globalement vu comme une marche aléatoire. Les «ailes» de diffusion, dues à la diffusion simple (prédominante aux grands angles), n'apparaissent que lorsque le faisceau traverse des matériaux de très faible épaisseur. Le but de la manipulation est de déterminer la largeur à mi-hauteur de cette distribution gaussienne (FWHM : Full Width at Half Maximum ;  $\text{FWHM} = 2.354\sigma$ ,  $\sigma$  étant l'écart type de la gaussienne).

La détection en transmission des particules permet d'établir une cartographie 2D des évènements (figure III.2). La distribution spatiale des évènements dans le plan transverse est alors directement accessible. En sommant quelques lignes de balayage, on obtient une projection sur un axe perpendiculaire à la direction du faisceau.

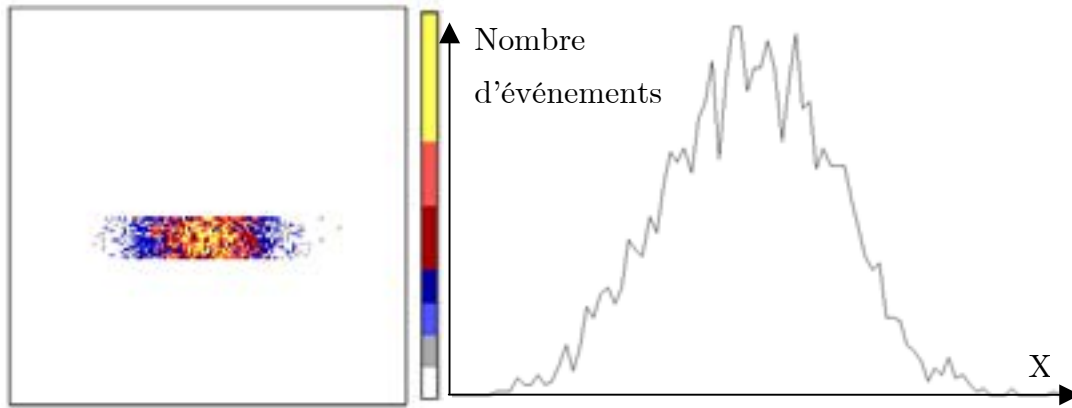


Fig. III.2 : Image en transmission d'une partie du collimateur (à gauche) et profil correspondant obtenu en sommant les lignes de la matrice. La cartographie n'utilise que les particules d'énergie maximum qui n'ont pas interagit avec les bords du collimateur.

## 2.2 Traitement des données

La distribution obtenue, projetée sur un axe transversal, est la convolution de deux distributions :

- la distribution des ions qui, après avoir traversé la feuille, est approximativement gaussienne.
- la coupure engendrée par le collimateur, assimilable à une fonction porte.

La distribution acquise sera donc de la forme :

$$g = C \cdot (f * \pi)$$

où :

$g$  est la fonction de distribution acquise

$f$  est la fonction de distribution des particules après traversée de la feuille de polymère. On aura donc :  $f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-x^2/2\sigma^2}$

$\pi$  est la fonction porte de largeur  $2a$  représentant le collimateur (de rayon  $a$ ),

définie de la manière suivante :  $\left\{ \begin{array}{l} \pi(x) = 1 \quad \text{si } x \in [-a, a] \\ \pi(x) = 0 \quad \text{si } x \notin [-a, a] \end{array} \right\}$

$C$  est une constante.

La distribution est symétrique par rapport à l'axe du faisceau. Nous considérerons ici les projections des distribution sur un axe normal au faisceau incident.

L'expression de la fonction  $g$  sera alors :

$$g(x) = C \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cdot \pi(x - t) dt = C \int_{x-a}^{x+a} f(t) dt \quad (3)$$

en remplaçant  $f$  par son expression, on obtient :

$$g(x) = \frac{C}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{x-a}^{x+a} e^{-t^2/2\sigma^2} dt$$

en posant  $u = \frac{t}{\sigma}$  :

$$g(x) = \frac{C}{\sqrt{2\pi}} \int_{\frac{x-a}{\sigma}}^{\frac{x+a}{\sigma}} e^{-u^2/2} du = \frac{C}{\sqrt{2\pi}} \left( \int_0^{\frac{x+a}{\sigma}} e^{-u^2/2} du - \int_0^{\frac{x-a}{\sigma}} e^{-u^2/2} du \right)$$

Finalement :

$$g(x) = \frac{C}{\sqrt{2\pi}} \left( \operatorname{erf} \left( \frac{x+a}{\sigma} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{x-a}{\sigma} \right) \right)$$

avec

$$\operatorname{erf}(x) = \int_0^x e^{-t^2/2} dt$$

D'après l'expression (3) ci-dessus, on remarque que, si l'ouverture  $a$  du collimateur est suffisamment petite devant la taille  $\sigma$  du faisceau, alors la fonction  $g$  peut être approximée par un fonction gaussienne proportionnelle à  $f$ . La largeur de la distribution spatiale du faisceau avant convolution sera alors proche de la largeur mesurée. Nous reviendrons ultérieurement sur l'incertitude introduite par cette approximation.

## 2.3 Résultats

La méthode présentée précédemment permet d'obtenir la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la gaussienne représentant la distribution réelle du faisceau à partir des cartographies en transmission. Un certain nombre d'incertitudes sont liées à ces mesures expérimentales. Elles ont trois origines [63]:

- *La taille du collimateur*

Comme nous l'avons vu, les données expérimentales peuvent être traitées en approximant la fonction de distribution convoluée par une fonction gaussienne. L'incertitude introduite peut être estimée en comparant les profils des deux fonctions  $f$  et  $g$  pour différentes valeurs de  $\frac{a}{\sigma}$ . Celle-ci varie de 0.17% pour  $a = 0.1\sigma$  à 16.8% pour  $a = \sigma$ .

- *L'étalonnage du système de balayage électrostatique*

L'incertitude sur la connaissance de la taille totale du balayage effectué se retrouve dans la précision finale de la mesure. Une incertitude de moins de 2% a été déterminée en utilisant les cartographies RBS d'une grille de cuivre 300 mesh (motif 84.7  $\mu\text{m}$ ) [63].

- *La précision de l'ajustement par moindres carrés de la distribution expérimentale*

Cette précision dépend de la statistique du profil expérimental et de l'homogénéité en épaisseur des feuilles de polymère. Cette statistique varie de 5000 à 30000 événements pour les acquisitions effectuées. L'incertitude associée, estimée en utilisant les routines d'ajustement, est comprise entre 0.6% et 1.7%.

Les trois sources d'incertitude présentées ci-dessus étant non corrélées, elles ont été ajoutées quadratiquement afin d'évaluer l'incertitude totale.

Ces mesures expérimentales ont été réalisées dans le but de valider les résultats obtenus par simulations Monte-Carlo obtenus à l'aide de différents codes. Les comparaisons expériences – simulations seront présentées au paragraphe 4.

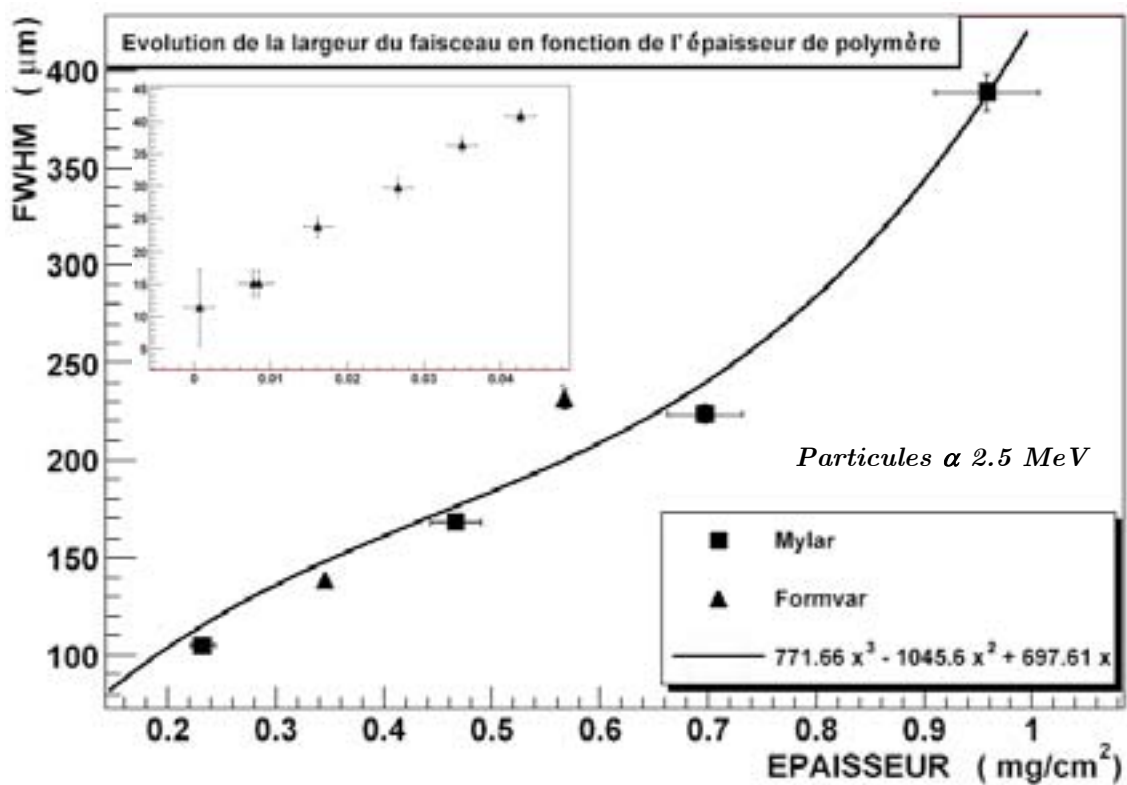
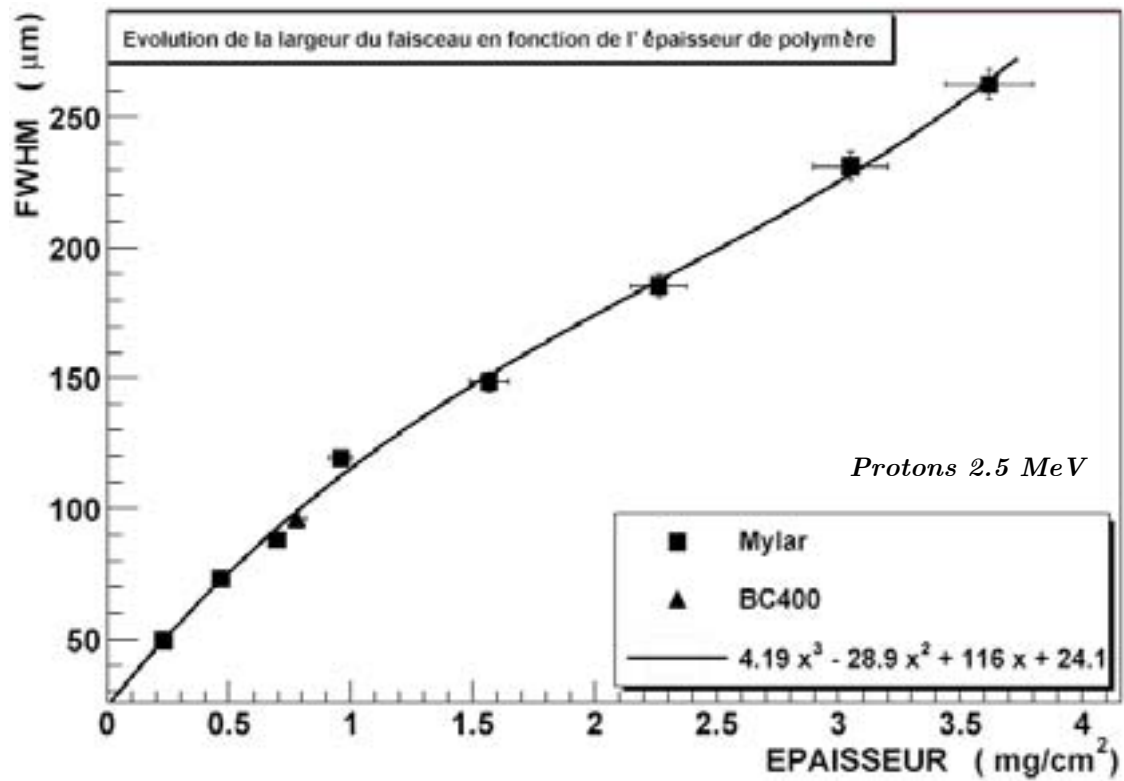


Fig. III.3 : Effet de la traversée de feuilles de polymères d'épaisseur croissante sur la largeur à mi-hauteur du microfaisceau de protons (haut) et de particules  $\alpha$  (bas) de 2.5 MeV. Cette évolution peut être ajustée par un polynôme d'ordre 3 dans les deux cas.



### 3. Simulation Monte-Carlo

La modélisation du dispositif d'irradiation et le contrôle des différents paramètres influant sur la résolution spatiale obtenue au niveau de la cellule passent par l'utilisation de codes de simulation. Nous présentons ici les codes utilisés et les modèles associés à la simulation de la diffusion de particules chargées de quelques MeV dans des matériaux minces.

#### 3.1 Introduction : simulation condensée ou détaillée ?

Pour plus de clarté dans la présentation des codes Monte-Carlo utilisés, nous allons définir quelques concepts liés à la simulation de la diffusion multiple.

Les algorithmes de simulation existants peuvent être classés en deux catégories : les simulations « détaillées » et les simulations « condensées » [60][61].

Les simulations détaillées, dans lesquelles les collisions élémentaires rencontrées par les particules sont simulées une par une dans l'ordre chronologique, ne peuvent être envisagées que pour un petit nombre de collisions. Lorsque qu'un grand nombre de collisions entre en jeu, les simulations détaillées nécessitent des temps de calcul qui deviennent souvent rédhibitoires.

Une technique de simulation dite « condensée » permet de rassembler l'effet d'un grand nombre d'interactions dans un pas (Step) élémentaire. L'effet cumulé des interactions individuelles est pris en compte par un changement approprié de l'énergie et de la position de la particule après un certain parcours dans le matériau. La précision de ces simulations dépend alors des approximations introduites dans les modèles utilisés. Chaque code de simulation utilise son propre modèle de calcul de distributions et l'incertitude inhérente à ce type d'algorithme se manifeste par le fait que la taille du pas choisie influe souvent sur le résultat final. L'influence de ce paramètre doit alors être étudiée en détails.

Une nouvelle classe de simulation est apparue récemment dans la littérature. Au cours de ces simulations, dites « mixtes » [61, 62], les collisions sont classées en deux catégories : les collisions « dures », pour lesquelles la déflexion angulaire est supérieure à un seuil convenablement choisi, et les collisions « douces », pour lesquelles la déflexion angulaire est inférieure à ce seuil [62]. Les collisions « dures »

sont alors simulées individuellement et les collisions « douces » sont simulées en utilisant un modèle de diffusion multiple.

## **3.2 SRIM**

### ***3.2.1 Introduction***

SRIM (Stopping and Range of Ions in Matter) est un groupe de programmes dédiés au calcul de la perte d'énergie et du parcours de particules chargées dans la matière [64]. Initialement créé en 1983 par J.F. Ziegler et J.P. Biersack, la dernière version de ce programme date de 2003. Le calcul de transport dans un matériau se base sur le programme TRIM (TRansport of Ions in Matter) dont la dernière version date de 1998. TRIM accepte une définition de cible selon une géométrie en couches parallélépipédiques successives. Un dictionnaire complet de matériaux composés pré-programmé est disponible.

### ***3.2.2 Le traitement de la diffusion dans SRIM***

L'utilisateur peut choisir entre plusieurs modes de calcul lors des simulations TRIM :

- un calcul condensé (rapide) qui permet de prendre en compte l'effet global d'un pas dans la cible sur la trajectoire de la particule.
- un calcul détaillé, où chaque collision va être simulée. Comme nous l'avons déjà vu, ce type de simulation est envisageable dans le cas de cibles minces. Néanmoins, la nécessité de simuler le parcours d'un nombre important de particules pour obtenir des distributions implique des temps de calculs relativement longs. Des simulations condensées sont alors indispensables.

## **3.3 GEANT4**

### ***3.3.1 Introduction***

Le code Monte-Carlo GEANT a été développé au CERN pour la simulation des interactions de particules (chargées ou non) avec la matière. Historiquement, le programme GEANT3 [65] a été utilisé pour la simulation de la plupart des expériences de physique corpusculaire. Le développement de ce code, écrit en langage

Fortran, a été arrêté en 1994. En effet, celui était devenu trop complexe, ce qui rendait sa maintenance difficile. Le besoin d'un outil plus flexible s'est rapidement fait sentir et le projet GEANT4 [66][67] a vu le jour en 1994. Son architecture orientée objet, écrite en C++, facilite l'interfaçage avec des logiciels externes et permet une grande souplesse dans la maintenance.

Initialement développé pour les expériences aux hautes énergies du CERN, le domaine d'application de GEANT4 a récemment été étendu à la simulation de phénomènes de basses énergies (jusqu'à quelques centaines d'eV). C'est pourquoi la simulation du dispositif du CENBG a pu être envisagée.

Au cours de la simulation, l'utilisateur peut suivre la variation des caractéristiques des particules primaires (« tracking ») au cours de leur passage dans un milieu. GEANT4 est un code de simulation de type condensé, l'effet de chaque pas (« step ») élémentaire dans le milieu est calculé de manière globale.

Afin de simuler une expérience particulière, l'utilisateur doit implémenter lui-même, trois des composantes du programme.

### ***3.3.2 La géométrie du volume d'interaction***

A chaque expérience correspond une géométrie bien particulière. Il incombe à l'utilisateur de définir sa géométrie : composants du détecteur, matériaux... GEANT4 donne accès à des outils permettant de décrire des dispositifs relativement complexes. L'utilisateur peut ensuite assembler les différents objets créés dans l'espace afin d'obtenir la géométrie globale de l'expérience à simuler. La longueur du pas dans chaque volume peut être contrôlée par l'utilisateur. L'introduction de champs électromagnétiques dans certains volumes est également possible.

### ***3.3.3 Les processus physiques***

Une librairie très complète de processus physiques est disponible dans GEANT4. L'utilisateur doit définir sa propre liste de processus physiques à prendre en compte lors de la simulation dans une classe dérivée de la classe virtuelle fournie. La définition d'une coupure (« cut ») en énergie est également requise. Cette valeur correspond à l'énergie minimale des particules secondaires créées qui seront effectivement prises en compte.

Pour les simulations du dispositif du CENBG, nous avons cherché à évaluer l'évolution de la trajectoire et des caractéristiques des particules primaires. Les interactions physiques très peu probables à ces énergies (telles que l'interaction nucléaire inélastique) n'ont pas été prises en compte.

Les processus suivants ont été utilisés :

- **Processus hadroniques** : les particules concernées sont les particules primaires, protons et alphas dans notre cas. A des énergies de quelques MeV, le seul processus déclaré est celui de diffusion élastique nucléaire.
- **Processus électromagnétiques** : Ces processus concernent les photons, les électrons, les positrons et les autres particules chargées. Les interactions utilisées sont :

	Processus implémentés
<b>Photons</b>	Effets photoélectrique et Compton, Création de paires, Diffusion Rayleigh
<b>Electrons Et Positrons</b>	Diffusion multiple, Ionisation, Bremsstrahlung, Annihilation ( $e^+$ )
<b>Autres Particules Chargées</b>	Diffusion Multiple, Ionisation (Modèle ICRU_R49)

Tableau III.1 : Processus physiques électromagnétiques implémentées dans GEANT4 pour la simulation de la ligne microfaisceau.

### 3.3.4 Le générateur d'évènements

Le générateur d'évènements va gérer les caractéristiques du faisceau primaire : nature des particules, énergie, distributions ... Ce générateur d'évènements doit également être défini par l'utilisateur en dérivant une classe fournie dans GEANT4. La possibilité d'implémenter des distributions en position et en énergie des particules primaires est particulièrement intéressante pour la simulation de faisceaux d'ions issus d'accélérateurs.

### 3.3.5 Le traitement de la diffusion dans GEANT4

Un module spécifique dédié au calcul de la diffusion multiple est disponible dans GEANT4. Ce module est fréquemment mis à jour et sa dernière modification remonte

à mai 2003. Le calcul de la diffusion multiple des ions incidents est de type condensé. Il se base sur la théorie de Lewis [59] et utilise des fonctions paramétrées afin de déterminer les distributions angulaire et spatiale après chaque pas. Ces fonctions ont été choisies pour donner les mêmes distributions que la théorie de Lewis.

La trajectoire d'une particule primaire étant modifiée à chaque collision rencontrée dans un pas, le parcours effectif de cette particule est différent de la taille géométrique du pas de simulation. Le processus de diffusion multiple est par conséquent le premier processus pris en compte sur un pas, car il permet de déterminer la longueur effectivement parcourue par la particule dans le matériau.

Une description détaillée du modèle utilisé est disponible et peut être trouvée dans les références [68] et [69].

### 3.3.6 Stockage et traitement des données : *ROOT*

La structure orientée objet du code GEANT4 permet un interfaçage relativement aisé avec des codes de traitement de données. Le code d'analyse ROOT [70] a été choisi pour réaliser ces traitements. Egalement créé en C++ au CERN, il possède ses propres bibliothèques d'objets (histogrammes, N-tuples ...) auxquelles il est possible de faire appel dans le code de GEANT4. Plus de 350 classes permettant la gestion des données sont disponibles.

## 4. Validation des codes Monte-Carlo par comparaison avec l'expérience

Afin de valider les codes de simulation présentés ci-dessus, nous avons comparé les résultats expérimentaux (présentés au paragraphe 2.3) avec les prédictions de ces codes pour la simulation de la diffusion de particules chargées dans la matière à l'échelle du micromètre (fig. III.4) [71].

La traversée de différents polymères a été simulée afin de reproduire l'expérience. Les matériaux utilisés sont les suivants :

Mylar	:	$C_{10}H_8O_4$	$d = 1.397 \text{ g/cm}^3$
Formvar	:	$C_5H_8O_2$	$d = 1.310 \text{ g/cm}^3$
BC400 (scintillateur plastique)	:	$C_{475}H_{525}$	$d = 1.032 \text{ g/cm}^3$

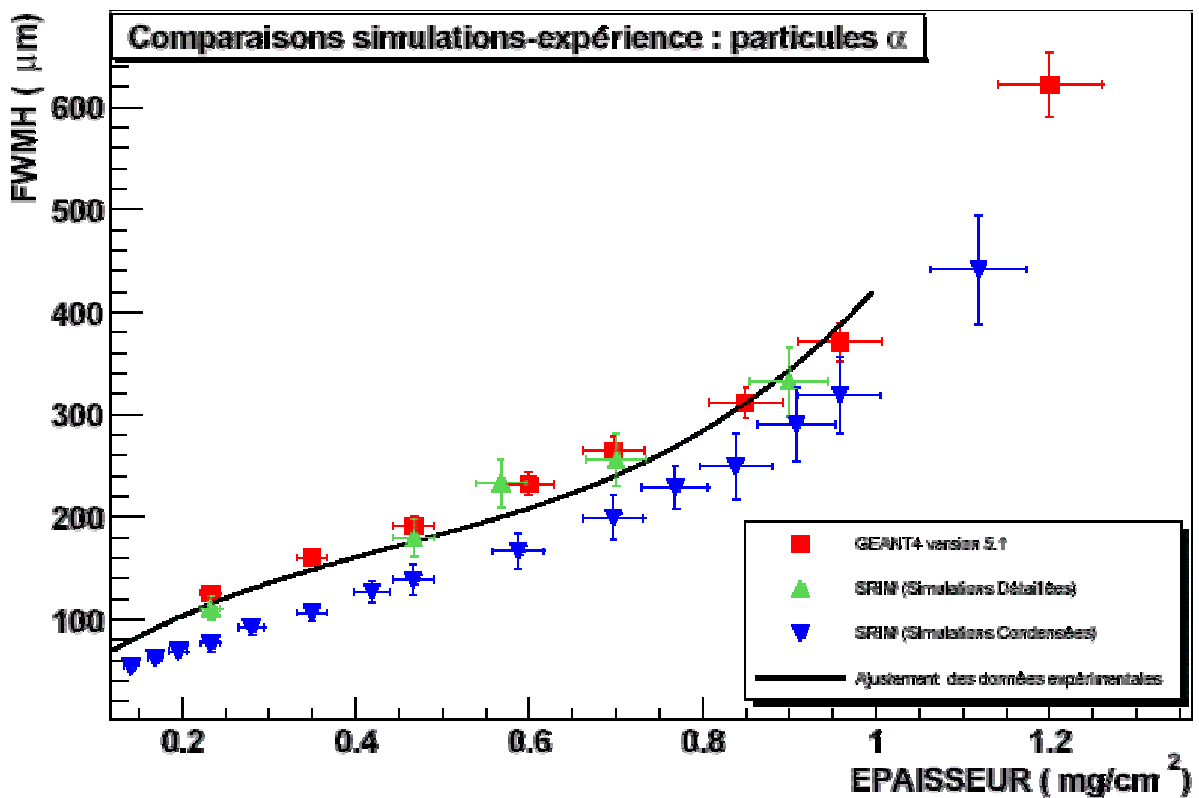
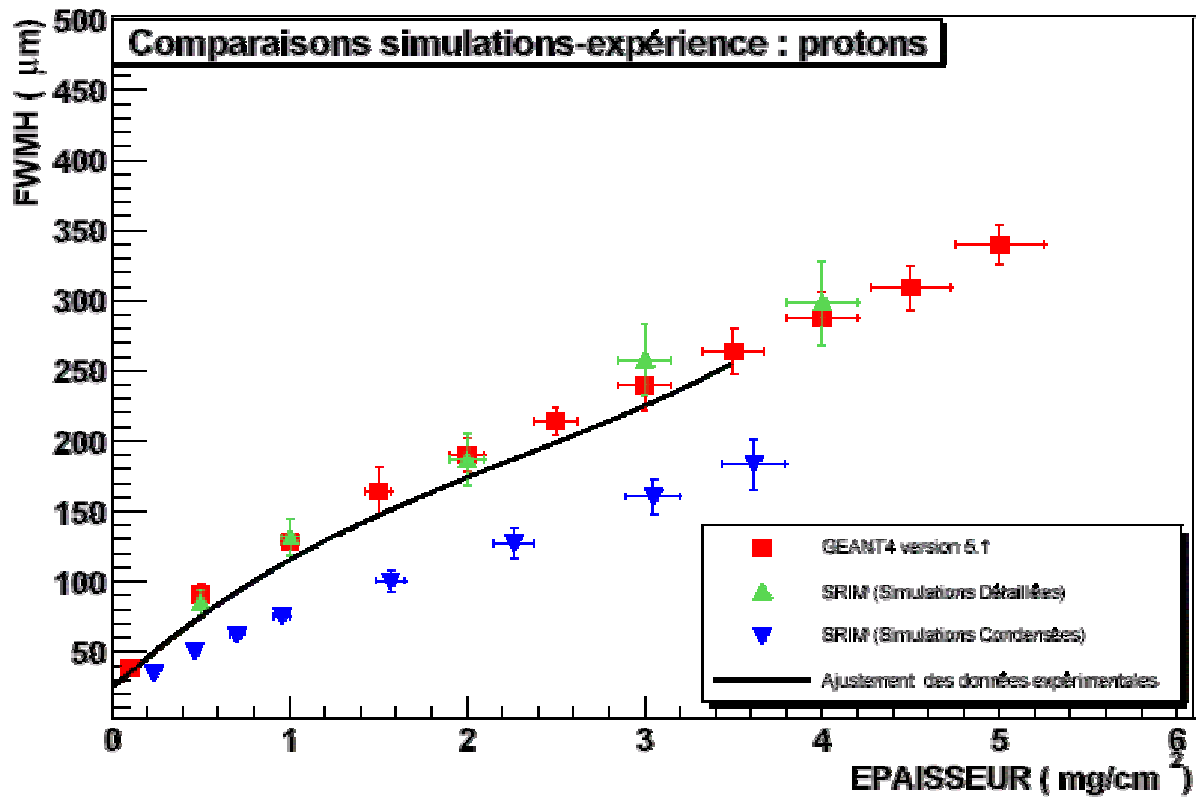


Fig. III.4 : Comparaison des résultats expérimentaux à ceux obtenus par simulations Monte-Carlo, dans le cas de faisceaux de protons et de particules  $\alpha$  de 2.5 MeV. Les ajustements polynomiaux représentés correspondent à ceux présentés sur la figure III.3. Les simulations détaillées et condensées ont été effectuées respectivement avec 1000 et 10000 particules.

Les résultats présentés sur la figure III.4 permettent de confronter les codes de simulation utilisés à l'expérience :

- dans le cas de SRIM, seul le mode de calcul « détaillé » permet reproduire les résultats expérimentaux. Un écart de l'ordre de 40 % par rapport aux résultats expérimentaux apparaît lorsque le mode « condensé » est utilisé. L'utilisation de ce programme pour la simulation du dispositif d'irradiation va demander des temps de calculs très importants.
- les simulations GEANT4 donnent des résultats satisfaisants. Elles ont été réalisées en testant différentes tailles de pas et différentes valeurs de coupure de suivi des particules secondaires. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une quelconque influence de ces paramètres sur les distributions obtenues.

## 5. Simulations de détecteurs en transmission avec GEANT4

Les simulations Monte-Carlo, sont d'une grande aide dans le choix de la géométrie de détection à utiliser. La plupart des études présentées ici ont porté sur la simulation d'un système de détection en transmission adapté au microfaisceau du CENBG (voir paragraphe II.3.2).

Pour le contrôle du faisceau en mode ion par ion, deux types de détecteurs en transmission ont été développés. Leurs caractéristiques instrumentales seront présentées au chapitre IV. Le premier repose sur une feuille mince de scintillateur plastique couplée à deux photomultiplicateurs. Le second est un détecteur à gaz faible pression. Nous allons ici présenter les simulations de l'influence de l'étage de détection sur les caractéristiques du faisceau. L'influence de ces simulations sur l'optimisation du dispositif expérimental sera également abordée.

### 5.1 Détecteur à scintillation

Le scintillateur choisi pour contrôler le nombre de particules est de type BC400®. Son épaisseur, mesurée par la technique RBS [63], est de 7.5  $\mu\text{m}$  (voir paragraphe IV.1.1.1). Les simulations Monte-Carlo permettent de modéliser la distribution des positions des protons après la traversée du détecteur et d'une épaisseur résiduelle d'air à pression atmosphérique. Les données de la simulation GEANT4 sont stockées dans des objets histogrammes ROOT et peuvent ainsi être traitées facilement. Un

ajustement gaussien des distributions donne accès à la FWHM du faisceau en sortie de dispositif (fig. III.5).

La traversée d'une feuille de scintillateur plastique est tout à fait similaire à celle d'une feuille de polymère telle que celles étudiées au paragraphe 2. C'est pourquoi les résultats de simulation GEANT4 pour ce type de détecteurs peuvent être considérés comme fiables. Différentes tailles de pas et de coupure ont été testées sans générer de variation mesurable dans les distributions obtenues.

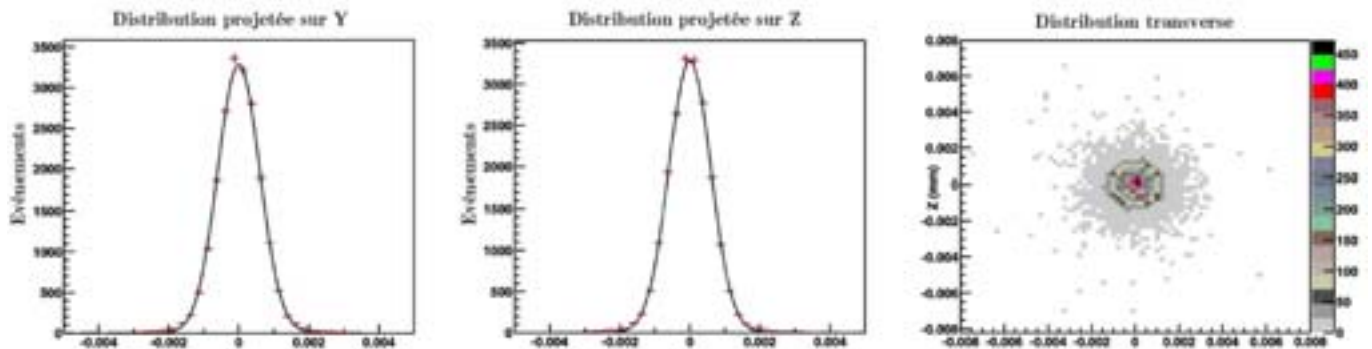


Fig. III.5: Exemple de distributions obtenues à l'aide de GEANT4 5.1 après traversée de  $7.5 \mu\text{m}$  de  $\text{BC400}^{\text{®}}$  (densité =  $1.032 \text{ g/cm}^3$ ) et de  $100 \mu\text{m}$  d'air par 20000 protons de  $3 \text{ MeV}$  issus d'un faisceau ponctuel. Les distributions projetées sur les deux axes transversaux sont symétriques. Un ajustement gaussien de ces distributions (lignes en trait plein) permet d'accéder à la largeur du faisceau en sortie. Une représentation en 2 dimensions permet de visualiser les positions des particules à la sortie de la couche d'air. La distribution dans le plan transverse est comparable aux implantations sur détecteurs de traces présentées au chapitre V.

Afin de minimiser la quantité de matière traversée par les ions avant d'atteindre la cible, la feuille de  $\text{BC400}^{\text{®}}$  est utilisée comme fenêtre d'extraction, elle réalise par conséquent l'interface entre le vide de la ligne et la pression atmosphérique. Cette feuille mince supporte la différence de pression sur une surface de  $1 \text{ mm}^2$  nécessaire au balayage du faisceau sur la cible. Elle est donc incurvée et la présence d'une épaisseur d'air résiduelle, entre le détecteur et le support de culture des cellules est inévitable. La figure III.6 montre l'évolution de la taille du faisceau en fonction de l'épaisseur de cette couche d'air.



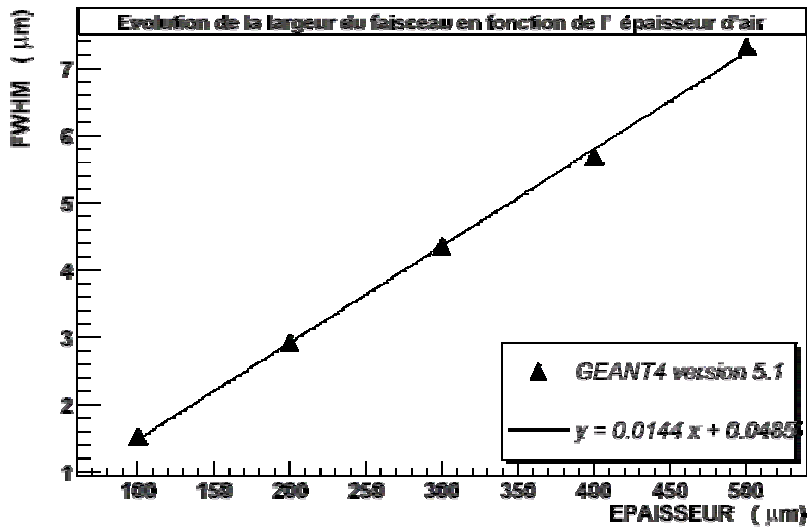


Fig. III.6 : Simulation de l'influence de l'épaisseur de la couche d'air résiduelle sur la taille finale du faisceau. L'évolution est linéaire dans une gamme de quelques centaines de  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Détecteur à gaz

Le parcours limité des particules  $\alpha$  de quelques MeV dans le BC400® (voir paragraphe IV.1.1.2) a entraîné le développement d'un second détecteur. Comme nous l'avons déjà mentionné, la contrainte imposée par une résolution spatiale inférieure à la taille d'un noyau cellulaire impose l'utilisation de détecteurs ultra-minces. Un détecteur à gaz a donc été choisi en raison de la faible densité du milieu de détection. Un détecteur de type compteur proportionnel doit cependant avoir une dimension suffisante afin d'éviter toute décharge électrostatique entre son anode et sa cathode. Le parcours minimal des particules dans le gaz sera par conséquent de quelques millimètres. La pression de gaz devra être ajustée afin d'obtenir une taille de faisceau minimale en sortie et une efficacité de détection aussi proche que possible de 100%. Le gaz utilisé est de l'isobutane ( $\text{C}_4\text{H}_{10}$ ). Pour la détection de particules  $\alpha$  de 3 MeV en transmission, une épaisseur de l'ordre de  $10^{-5}$  g/cm<sup>3</sup> semble être un bon compromis entre une perturbation minimum du faisceau et une perte d'énergie suffisante à la détection. Pour un parcours des ions de 3.5 mm dans de l'isobutane (conditions expérimentales), la pression à utiliser sera typiquement de l'ordre 10 mbar. En outre, la nécessité de contenir le gaz de détection dans une enceinte isolée impose l'utilisation de fenêtres minces résistant aux différences de pressions entre l'intérieur et l'extérieur du détecteur et permettant le passage des particules.

### 5.2.1 Le problème de la fenêtre d'entrée

Comme nous l'avons vu, une épaisseur de plusieurs millimètres de gaz devra être traversée par les particules du faisceau. Comme l'illustre la figure III.7, la mise en place, à l'interface entre le vide de la ligne et l'enceinte contenant le gaz, d'une fenêtre (même ultra mince) entraîne une taille de faisceau beaucoup trop importante à la sortie du détecteur.

Ce phénomène tient à un simple effet géométrique : les ions incidents ne sont que très légèrement déviés lors de la traversée de la fenêtre d'entrée, mais l'angle à la sortie de cette fenêtre, aussi petit soit-il, va entraîner les ions loin de l'axe du faisceau après un parcours de plusieurs millimètres. C'est pour cette raison que la fenêtre d'entrée du détecteur a été remplacée par un collimateur de très petite ouverture afin de préserver le vide de la ligne tout en évitant l'introduction de matière dense à l'entrée du détecteur. Cela imposera un certain nombre de contraintes sur les développements expérimentaux qui seront exposés au chapitre IV.

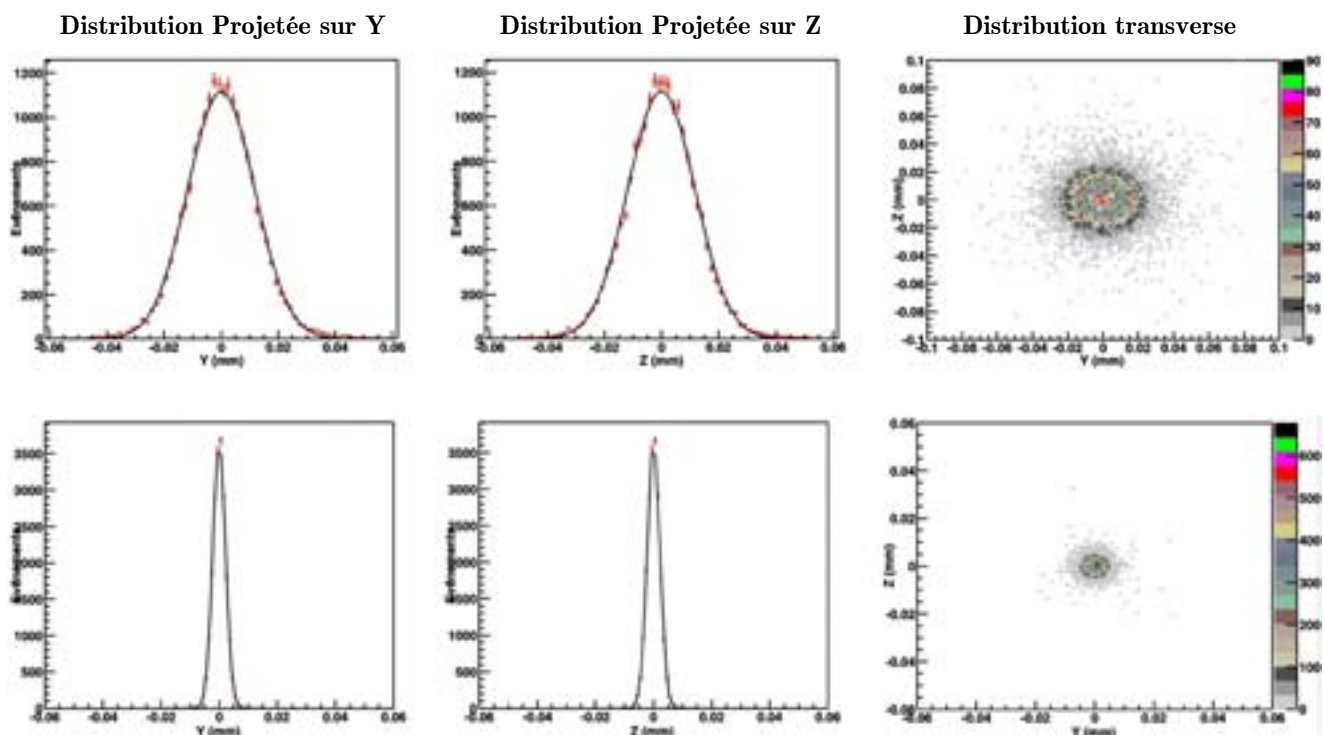


Fig. III.7 : Distributions spatiales en sortie du dispositif de détection avec une fenêtre d'entrée dans l'enceinte à gaz de 100 nm de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (en haut, FWHM = 27.9  $\mu\text{m}$ ) et sans cette fenêtre (en bas, FWHM = 4.9  $\mu\text{m}$ ). Les simulations GEANT4 5.1 ont été réalisées avec un pas de 350  $\mu\text{m}$  dans le gaz.

Les simulations ont été effectuées avec une géométrie décrivant la géométrie expérimentale :

- 3.5 mm d'isobutane ( $C_4H_{10}$ ) à 10 mbar.
- Une fenêtre de sortie de 150 nm de  $Si_3N_4$  (densité = 3.44)
- 100  $\mu m$  d'air résiduel.

Dans le cas de la simulation sans fenêtre d'entrée, l'interface entre l'enceinte à gaz et l'isobutane a été modélisée comme plane, la fuite de gaz à travers le collimateur étant difficile à modéliser.

### **5.2.2 Le rapport longueur / densité**

L'exemple de la figure III.7 montre bien l'importance de la distance entre le milieu diffuseur et l'endroit où est mesurée la distribution spatiale des particules. En effet plus l'observation se fera loin du milieu diffuseur, plus le faisceau aura divergé. On s'aperçoit alors que dans notre cas, la masse surfacique (en  $g/cm^2$ ) du milieu diffuseur n'est pas le paramètre le plus critique. Le profil d'un faisceau de particules chargées après traversée d'un milieu allongé et dilué sera différent de celui résultant de la traversée d'un milieu dense et mince, même si les deux objets considérés présentent une masse surfacique équivalente.

Sur la base de ce constat, nous avons amélioré la géométrie du détecteur à gaz (comme nous le verrons au chapitre IV) en raccourcissant le parcours des ions dans le gaz tout en augmentant la pression. Nous conservons ainsi la même masse surfacique globale et une production de signal équivalente tout en améliorant notablement la résolution spatiale du faisceau extrait (fig.III.8).

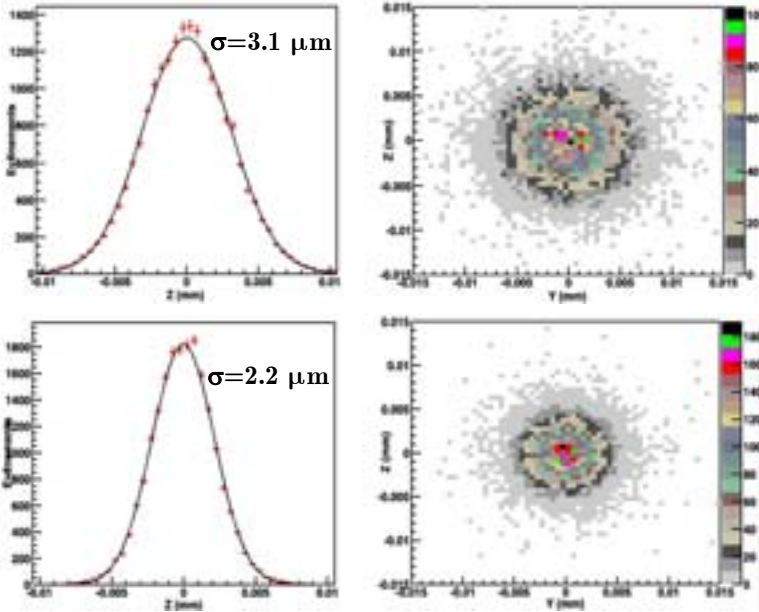


Fig. III.8 : Comparaison des profils de faisceau obtenus après traversée de 5 mm de gaz à 7 mbar (profils du haut) et de 3.5 mm de gaz à 10 mb (profils du bas). Dans les deux cas, la masse surfacique est de  $8.93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Simulations effectuées avec 20000 particules  $\alpha$  de 3 MeV. A l'épaisseur de gaz s'ajoute une fenêtre de 150 nm de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  et une couche d'air de 100  $\mu\text{m}$  afin

de reproduire les conditions expérimentales. Le pas de la simulation dans le gaz est de 350  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.3 Pertinence des simulations dans le gaz

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que GEANT4 semblait donner des résultats satisfaisants pour l'étude de la divergence angulaire de faisceaux d'ions de quelques MeV à l'échelle du micromètre. Cependant, les caractéristiques des deux détecteurs envisagés (matériau, densité, géométrie) étant très différentes, une étude de l'influence de la taille du pas et de la coupure en énergie était nécessaire. De plus, l'absence de données expérimentales permettant de valider les résultats de simulations pour ce type de géométrie nous a incité à la prudence quant à l'interprétation des prévisions des codes Monte-Carlo.

Différentes coupures en énergie pour le suivi des particules secondaires ont été testées. Nous n'avons pas mis en évidence d'influence notable de ce paramètre sur les distributions spatiales obtenues. La taille du pas, quant à elle, influe directement sur la forme des distributions projetées (fig. III.9).

On remarque cependant que la forme des distributions spatiales semble converger pour un nombre de pas dans le gaz supérieur à 2 (fig. III.9).

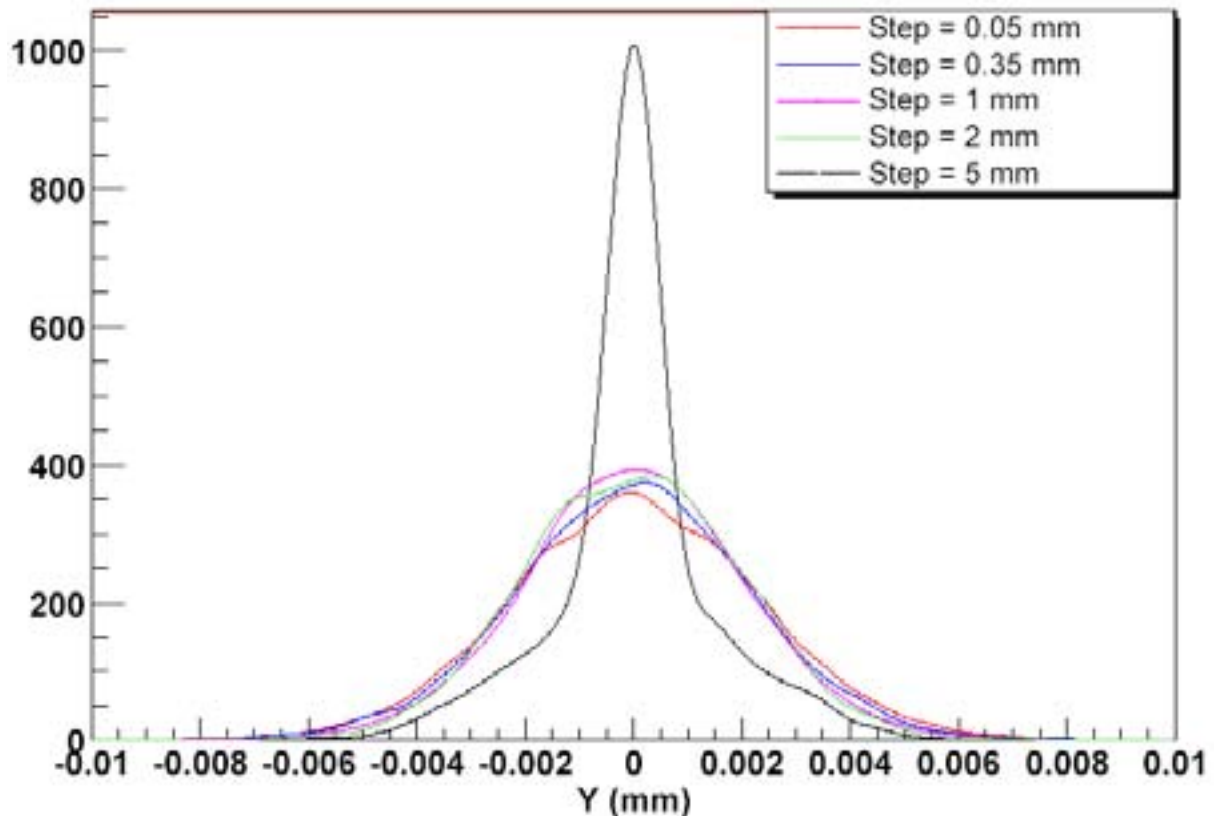


Fig. III.9 : Exemple de modification des distributions projetées en fonction de la taille du pas. Les simulation ont été réalisées avec un faisceau de 10000 particules  $\alpha$  de 3 MeV. La géométrie utilisée est identique à celle décrite précédemment

#### 5.2.4 Les très faibles épaisseurs

Les études théoriques du phénomène de diffusion de particules chargées dans la matière, présentées au début de ce chapitre, mentionnent toutes la coexistence de deux phénomènes : la diffusion simple et la diffusion multiple. Lorsqu'un faisceau d'ions parallèle traverse une fine couche de matériau, leur distribution dans le plan transverse est approximativement gaussienne, centrée sur l'axe du faisceau incident. Lorsque de très faibles masses surfaciques sont en jeu, le phénomène de diffusion simple prend de plus en plus d'importance aux « grands » angles. Cela se traduit sur la distribution par l'apparition d'ailes de diffusion de part et d'autre de la gaussienne centrale. Ces particules diffusées loin de l'axe du faisceau, bien que peu nombreuses, sont parfaitement visibles sur les implantations sur détecteurs de traces présentées au chapitre V.

La résolution spatiale finale sera donc limitée par ces ailes de diffusion qui devront être prises en compte dans la détermination de la largeur totale du faisceau (cf. chapitre V).

## **6. Conclusion**

La simulation du phénomène de diffusion coulombienne de particules chargées dans la matière est souvent limitée par les approximations introduites dans les modèles utilisés pour décrire l'évolution de ces particules de manière condensée. Les simulations détaillées quant à elles permettent de décrire avec une bonne précision ce phénomène mais sont très vite limitées lorsque les épaisseurs traversées augmentent.

GEANT4 semble être un outil approprié pour ce genre de simulation bien que des résultats expérimentaux nécessaires à la validation des modèles utilisés manquent encore. Une mise à jour régulière, effectuée par les spécialistes de la collaboration, permet cependant d'espérer une amélioration de la fiabilité de ce code. Celui-ci devrait en outre permettre la simulation de la ligne dans son ensemble et son extension à des études de microdosimétrie est en projet.

Malgré ces quelques limitations, les simulations numériques ont permis de dégager un certain nombre de tendances qui nous ont guidés dans la phase de développement instrumental.

## **Chapitre IV**

### **DEVELOPPEMENTS INSTRUMENTAUX : ETAGE D'IRRADIATION ET PROCEDURES**





L'aménagement de la ligne microfaisceau du CENBG en ligne d'irradiation ion par ion a nécessité un certain nombre de développements. L'étage terminal de la microsonde a dû être modifié dans son ensemble afin d'y inclure un système de microscopie par épi-fluorescence servant à visualiser les cellules en ligne, un étage de déplacement automatique de la cible et un ensemble de détection et d'extraction à l'air des particules. L'étage d'irradiation et l'électronique de traitement des signaux associée seront présentés dans la première partie de ce chapitre.

Le contrôle-commande des différents instruments et la gestion des phases d'irradiation et d'étalonnage du système ont été développés au CENBG. Le programme de contrôle sera présenté en détail dans la deuxième partie de ce chapitre.

## **1. L'étage d'irradiation**

Afin de conserver le potentiel analytique de la microsonde du CENBG, un étage d'irradiation amovible a été développé [72]. Cet étage vient s'insérer dans la chambre d'analyse dont les constituants ont été préalablement retirés. Le passage d'une configuration à l'autre se réalise en une heure environ. Avant de présenter l'organisation générale de cet étage d'irradiation, nous allons tout d'abord détailler chacun de ses constituants.

### **1.1 Détection et extraction des particules**

La détection des particules en géométrie de type transmission est l'un des points sensibles de la technique d'irradiation par ions isolés. Comme nous l'avons vu au paragraphe III.5, le choix du matériau et de la géométrie influe énormément sur la résolution spatiale finale du dispositif. Deux détecteurs en transmission ont été développés au CENBG, chacun des deux étant adapté à un type de particules (protons ou particules  $\alpha$ ) [73].

#### ***1.1.1 Le détecteur à scintillation***

Le premier détecteur développé pour la détection des particules en transmission est basé sur une feuille de scintillateur plastique mince couplée optiquement à deux photomultiplicateurs (PM) miniatures fonctionnant en coïncidence. La géométrie de ce détecteur est montrée sur la figure IV.1

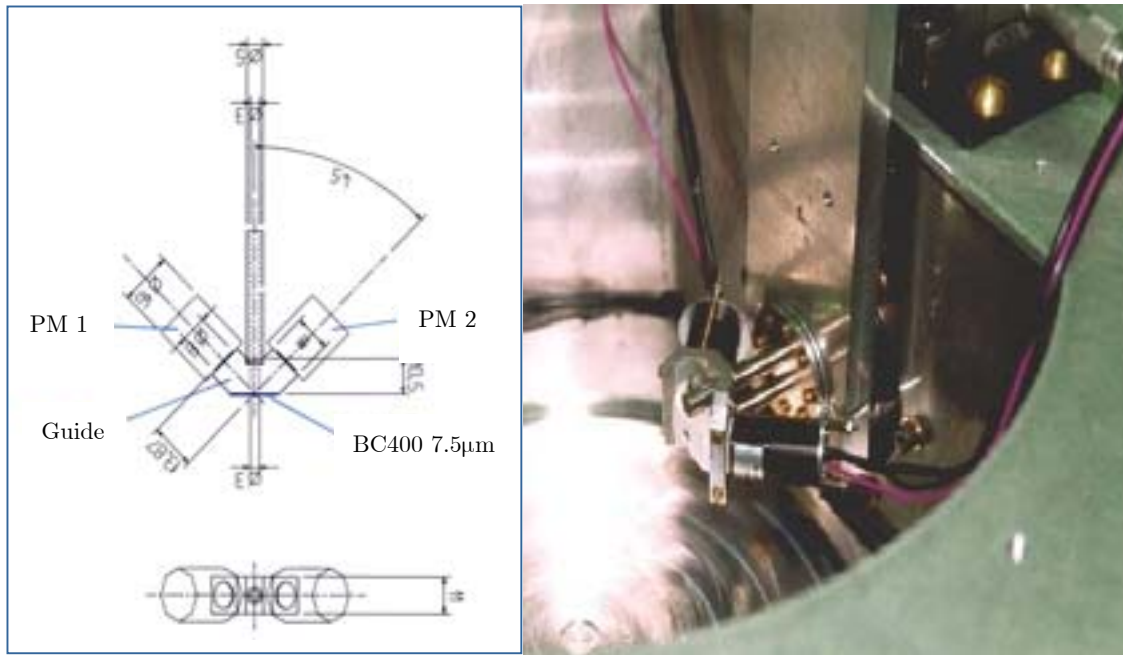


Fig. IV.1 : La figure de gauche montre un plan de coupe horizontal de l'ensemble de détection. La photo de droite est celle de l'étage d'extraction sur lequel est monté le détecteur.

Le scintillateur utilisé est une feuille de BC400<sup>®</sup> d'épaisseur 7.5 µm. Les principales caractéristiques de ce matériau sont résumées sur la figure IV.2.

#### Propriétés du BC400

Intensité lumineuse (% Anthracène)	65
Temps de montée (ns)	0.9
Temps de décroissance (ns)	2.4
Largeur de pulse (FWHM, ns)	2.7
Longueur d'atténuation (cm)	160
Longueur d'onde d'émission maximale (nm)	423
Nombre d'atomes H par cm <sup>3</sup> ( $\times 10^{22}$ )	5.23
Nombre d'atomes C par cm <sup>3</sup> ( $\times 10^{22}$ )	4.74
Nombre d'électrons par cm <sup>3</sup> ( $\times 10^{23}$ )	3.37

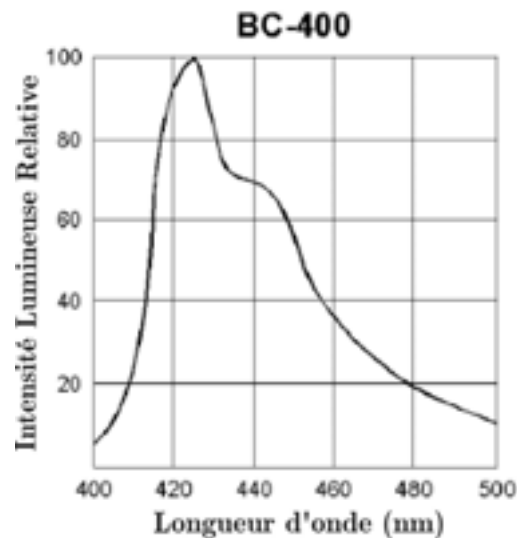


Fig. IV.2 : Caractéristiques de la feuille de BC400<sup>®</sup>. Source : Catalogue produits Bicron<sup>®</sup>

Cette feuille de scintillateur plastique est collée à l'aide de colle optique sur un guide de lumière en plexiglas. Deux photomultiplicateurs miniatures Hamamatsu de type R7400P (diamètre 16 mm, longueur 12 mm) sont couplés optiquement à ce guide et collectent la lumière émise au passage d'une particule en parallèle. Ces photomultiplicateurs sont composés de 8 étages de dynodes. La fenêtre est en borosilicate et la photocathode en matériau bi-alcalin.

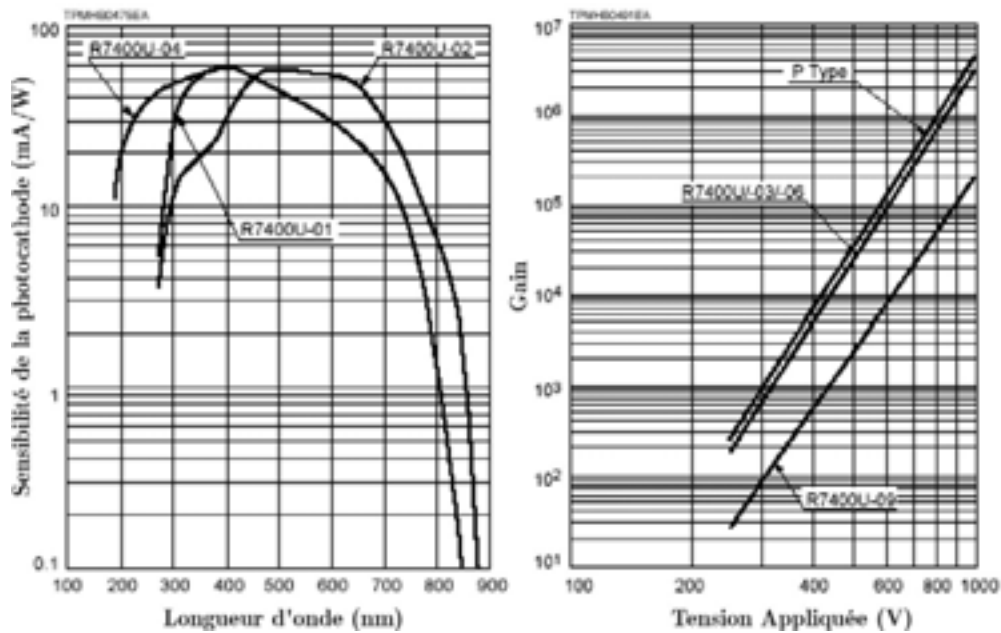


Fig. IV.3 : La figure de gauche montre les caractéristiques spectrales des photocathodes. La figure de droite représente l'évolution du gain de ces photomultiplicateurs en fonction de la tension appliquée.

La série de photomultiplicateurs R7400P (Photon Counting Type) dérive de la série R7400U indiquée sur la figure IV.3. La série R7400P présente un bas bruit de fond et un gain plus élevé. Les caractéristiques spectrales de ces deux séries sont identiques.

Lors de l'utilisation de cet ensemble de détection pour le contrôle du microfaisceau, une tension de polarisation de 600 V est généralement utilisée.

Les photomultiplicateurs et le matériau scintillant ont été choisis de manière à avoir une collection de signal maximum lors du passage d'une particule. Les longueurs d'ondes d'émission maximale du BC400<sup>®</sup> et de sensibilité maximale des photocathodes sont comparables.

L'étage d'extraction (fig. IV.1 droite) est constitué de deux tubes. Le tube supérieur se termine par un quartz luminescent permettant de visualiser le faisceau et de

vérifier sa focalisation. Le tube inférieur débouche dans le détecteur en transmission que les particules vont traverser avant de passer dans l'air. L'utilisateur peut positionner l'un ou l'autre des deux tubes d'extraction sur la trajectoire du faisceau grâce à des vis de déplacements micrométriques agissant dans le plan transverse.

Comme nous l'avons abordé au chapitre III, afin de limiter l'épaisseur de matière qu'auront à traverser les particules avant d'atteindre la cible, aucune fenêtre d'extraction supplémentaire n'a été rajoutée. La feuille de BC400<sup>®</sup> fait office de séparation entre le vide de la ligne de faisceau et la pression atmosphérique.

L'utilisation de la technique de coïncidence permet de rejeter au maximum les signaux parasites générés spontanément dans chacun des PM individuellement. Une efficacité de détection de  $99.5 \pm 0.5\%$  a été mesurée pour des flux incidents compris entre 300 et 3000 particules par seconde. Cette mesure a été effectuée sur une durée de plusieurs heures en plaçant un détecteur en silicium implanté directement à la sortie de la feuille de scintillateur. Le détecteur en silicium présente, dans cette gamme d'énergie, une efficacité de 100 %. Le rapport des nombres d'événements comptés sur chaque détecteur permet donc de calculer l'efficacité de détection du scintillateur.

### 1.1.2 Le détecteur à gaz

La construction d'un deuxième détecteur a été nécessaire pour le contrôle des particules  $\alpha$ . L'épaisseur de scintillateur BC400<sup>®</sup> est en effet trop importante comparée au parcours de ces particules dans ce même matériau (Fig. IV.4).

Parcours de différentes particules dans le BC400

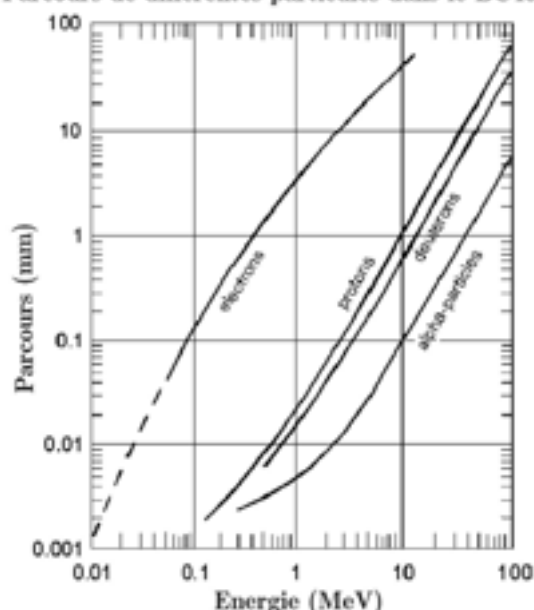
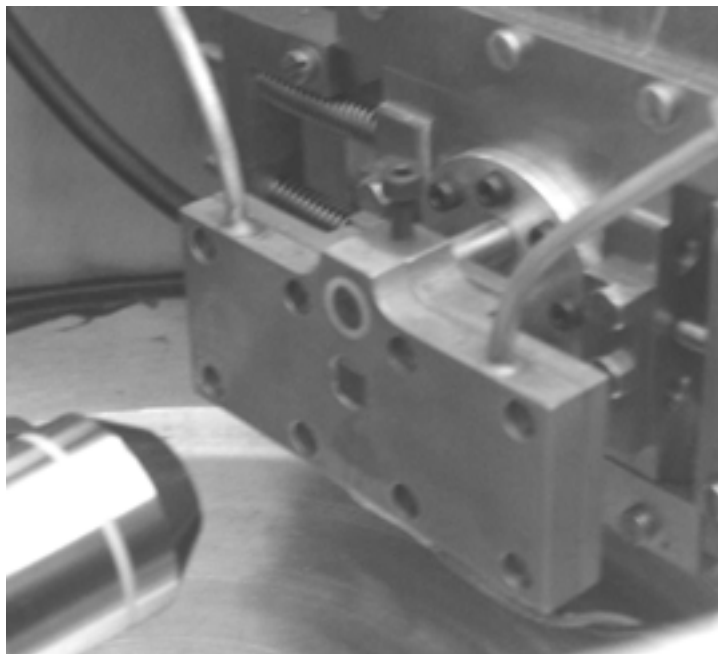
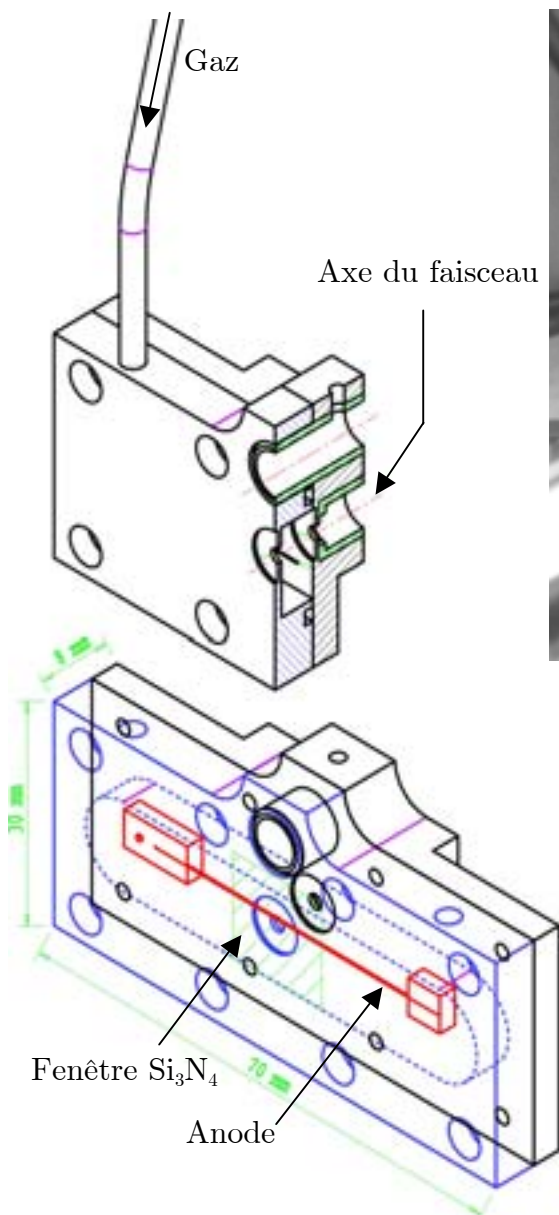


Fig. IV.4 : Parcours de différents ions dans du BC400<sup>®</sup> en fonction de leur énergie. Le parcours de particules  $\alpha$  de 3 MeV est de l'ordre de  $10 \mu\text{m}$ .

Il s'agit d'un détecteur à gaz contenant de l'isobutane à faible pression et basé sur une anode de type filaire dans le plan transverse (Fig. IV.5 et IV.6).



*Fig. IV.5 : A gauche : schéma technique du détecteur. On distingue l'anode et la fenêtre d'extraction. A droite : Photo du détecteur à gaz monté sur l'étage d'extraction. On distingue le quartz et la fenêtre de  $Si_3N_4$  sur la face avant ainsi que les tubes d'alimentation en gaz sur les côtés. L'objectif du microscope est également visible au premier plan.*

Pour les raisons évoquées au paragraphe III.5.2.1, ce détecteur ne possède pas de fenêtre d'entrée entre le vide de la ligne de faisceau et l'enceinte contenant l'isobutane (fig. IV.6). La fenêtre d'entrée a été remplacée par un collimateur de diamètre  $10\ \mu\text{m}$  qui permet de ne pas dégrader le vide de la ligne ( $5 \cdot 10^{-6}$  mbar). L'utilisation d'un collimateur comme fenêtre d'entrée dans le détecteur présente cependant un inconvénient. Le faisceau doit être maintenu fixe avec une grande précision de centrage sur l'ouverture et ne pourra donc pas être positionné sur les cellules en utilisant les plaques de balayage électrostatique. L'utilisation de ce

détecteur comme détecteur en transmission va donc imposer de déplacer mécaniquement le flacon de culture pour positionner chaque cellule dans l'axe du faisceau. La fenêtre d'extraction du faisceau réalisant l'interface entre l'isobutane et l'air est une fenêtre de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (Fabrication Service & Technology) de 150 nm d'épaisseur et de surface  $1 \times 1 \text{ mm}^2$ .

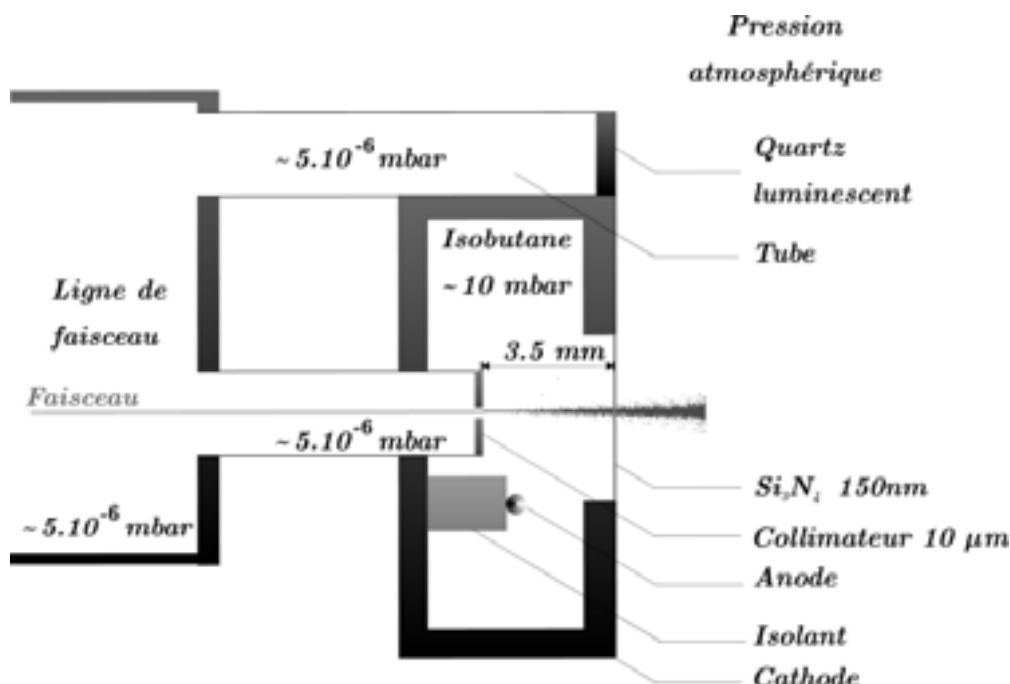


Fig. IV.6 : Coupe verticale du détecteur à gaz monté sur l'étage d'extraction.

Suites aux études sur la diffusion angulaire présentées au paragraphe III.5.2.2, le parcours des particules dans le gaz a été réduit de 5 mm à 3.5 mm dans une deuxième version du détecteur. La pression de fonctionnement a été augmentée à 10 mbar afin de conserver une bonne efficacité.

Une efficacité de détection de 99.5 % a été mesurée en employant la même méthode que pour le détecteur à scintillation. Cette efficacité dépend bien entendu de la pression de gaz dans le détecteur et de la tension de polarisation appliquée. Une tension optimale de 420 V appliquée entre l'anode (un fil d'or de diamètre 100 µm) et la cathode (les parois du détecteur) a pu être déterminée. Cette tension est limitée en raison des risques de claquages à l'intérieur du détecteur qui peuvent détériorer le préamplificateur. Pour les pressions usuelles, la tension limite de claquage a été mesurée à 430 V.

La caractérisation du mode de fonctionnement de ce détecteur est difficile en raison du peu de marge de manœuvre disponible sur chaque paramètre. En effet, aux

pressions utilisées, la tension de polarisation doit être supérieure à 380V pour obtenir un signal mesurable et inférieure à 430 V pour éviter les décharges électrostatiques.

Le contrôle de la pression dans le détecteur est réalisé en circuit ouvert à l'aide d'un débitmètre à très faible débit (gamme : 0.03 litre/heure à 0.3 litre/heure) et d'une pompe primaire. Les différents composants du circuit de gaz sont reliés par de tubes en Vinyl Swagelok<sup>®</sup> de 1 mm de diamètre intérieur. La mesure de pression est réalisée dans une cavité reliée par un tube de 60 cm à l'enceinte à gaz. En raison des pertes de charge dans les tubes, la pression lue et la pression effective dans le détecteur diffèrent. Un étalonnage a été réalisé (pour les pressions usuelles de fonctionnement) en remplaçant le détecteur par une enceinte de taille comparable munie d'une mesure de pression.

## **1.2 Traitement des signaux et commutation du faisceau**

Le signal généré dans le détecteur en transmission est traité et mis en forme dans une chaîne de modules électroniques de manière à compter les impulsions d'une part et dévier le faisceau d'autre part, lorsque le nombre requis de particules a atteint la cible. La chaîne d'électronique peut être divisée en deux parties :

- amplification du signal en provenance du détecteur et conversion en signal logique standard.
- exploitation de ces signaux logiques pour le comptage des particules et la commutation du faisceau.

### **1.2.1 Amplification et mise en forme**

Cette partie de la chaîne de traitement de signal convertit l'impulsion générée par le passage d'une particule dans le détecteur en signal standard TTL (0-5V) utilisable dans des modules de comptage.

Les signaux traités ainsi que les modules utilisés diffèrent d'un détecteur à l'autre. La série de figures qui suit synthétise l'organisation des différents modules ainsi que les différents signaux impliqués suivant la nature du détecteur en transmission utilisé. Les figures IV.8 et IV.9 illustrent le traitement du signal en provenance du détecteur à scintillation. Les figures IV.10 et IV.11 concernent le détecteur à gaz.

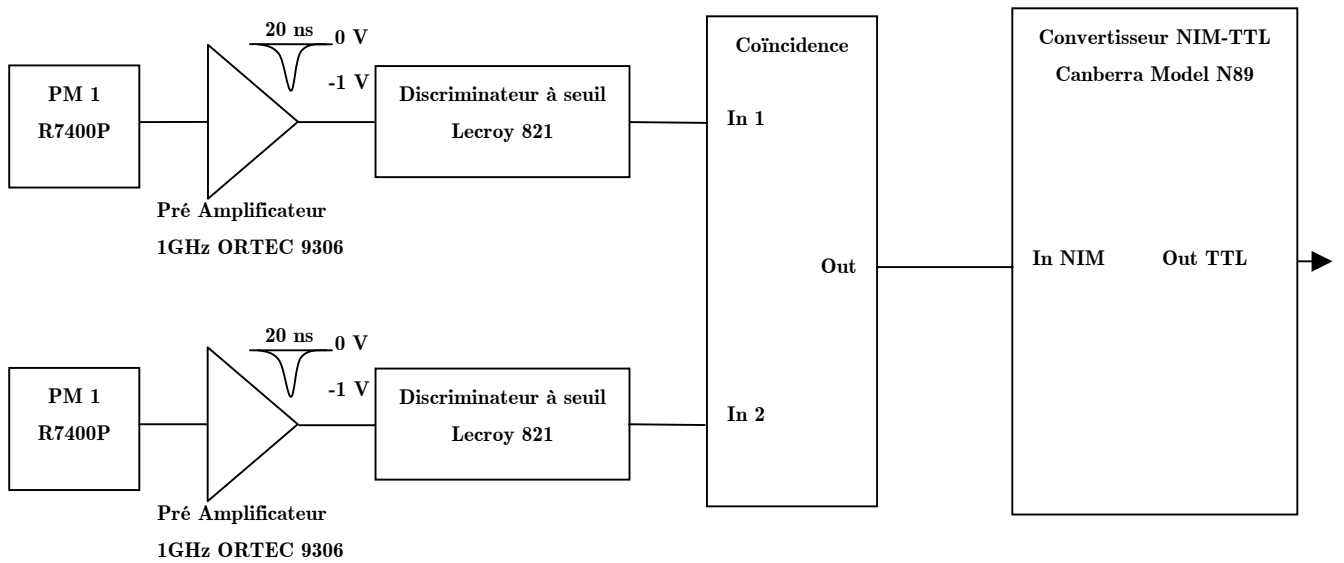


Fig. IV.8 : Traitement du signal en provenance des photomultiplicateurs. Le signal analogique est d'abord converti au standard NIM par les discriminateurs, puis en TTL pour être utilisé par la suite de la chaîne.

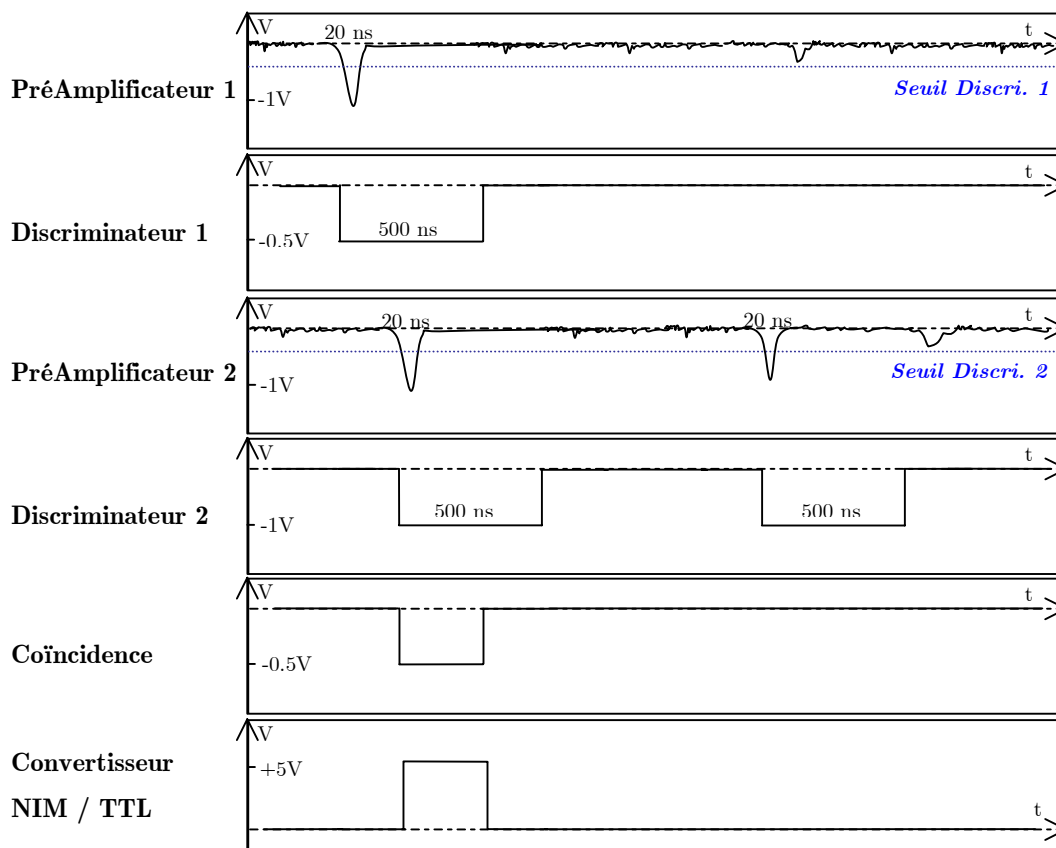


Fig. IV.9 : Schéma synoptique montrant la mise en forme du signal issu du détecteur à scintillation.



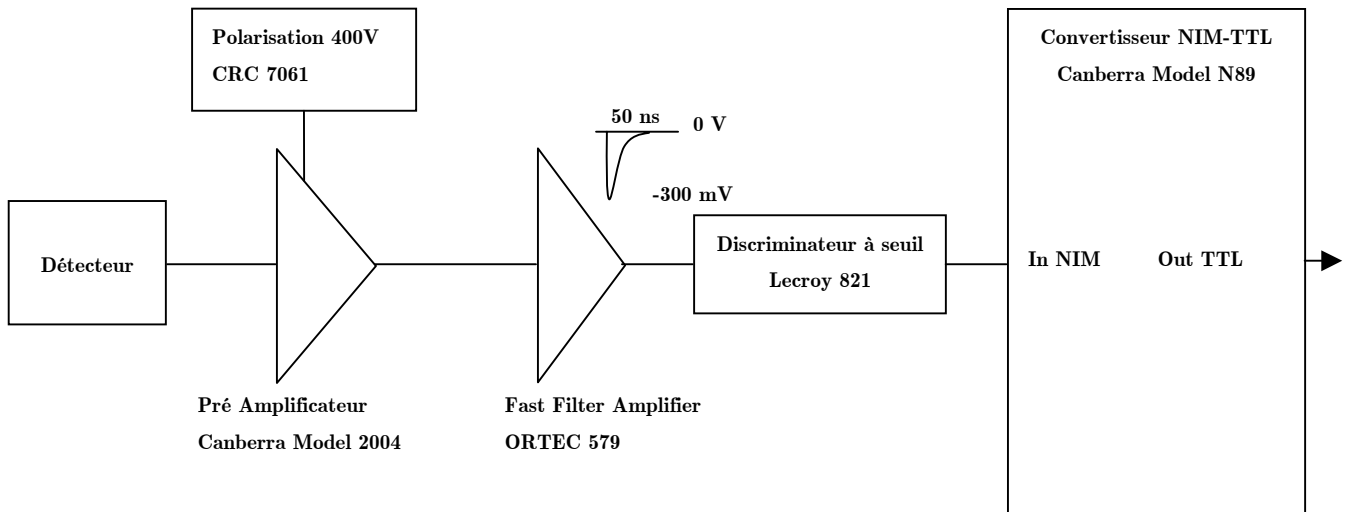


Fig. IV.10 : Traitement du signal en provenance du détecteur à gaz.

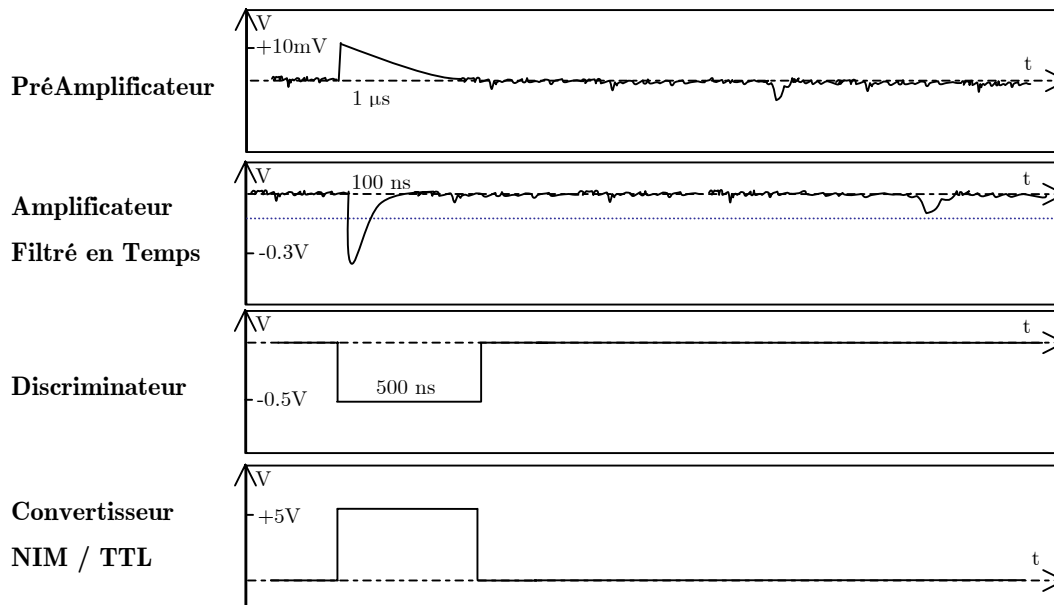


Fig. IV.11 : Schéma synoptique montrant la mise en forme du signal issu du détecteur à gaz.

Cette partie de la chaîne électronique permet de convertir le signal en provenance du détecteur en quelques dizaines de nanosecondes, ce qui est suffisant pour séparer deux particules successives. Une fois le signal logique généré, celui-ci va pouvoir être utilisé par les modules de comptage reliés au PC de contrôle. Le comptage et la commutation devront également être réalisés dans un délai inférieur à une microseconde.

### 1.2.2 Comptage et commutation

La seconde partie de la chaîne électronique est centrée sur deux cartes d'entrée-sortie connectées à un PC via un bus PCI (fig. IV.12). La première carte (ComputerBoards® CTR05) contient 5 compteurs logiques dont 4 peuvent être utilisés pour l'acquisition. Le cinquième compteur est utilisé comme générateur de délai. La deuxième carte (ComputerBoards® DDA06) contient un port d'entrées/sorties digital 24 bits et 6 canaux de sorties analogiques. Cette carte pilote la tension de balayage du faisceau (pour le positionnement) ainsi que la bascule (Lecroy 222) utilisée pour la commutation (on/off) du faisceau.

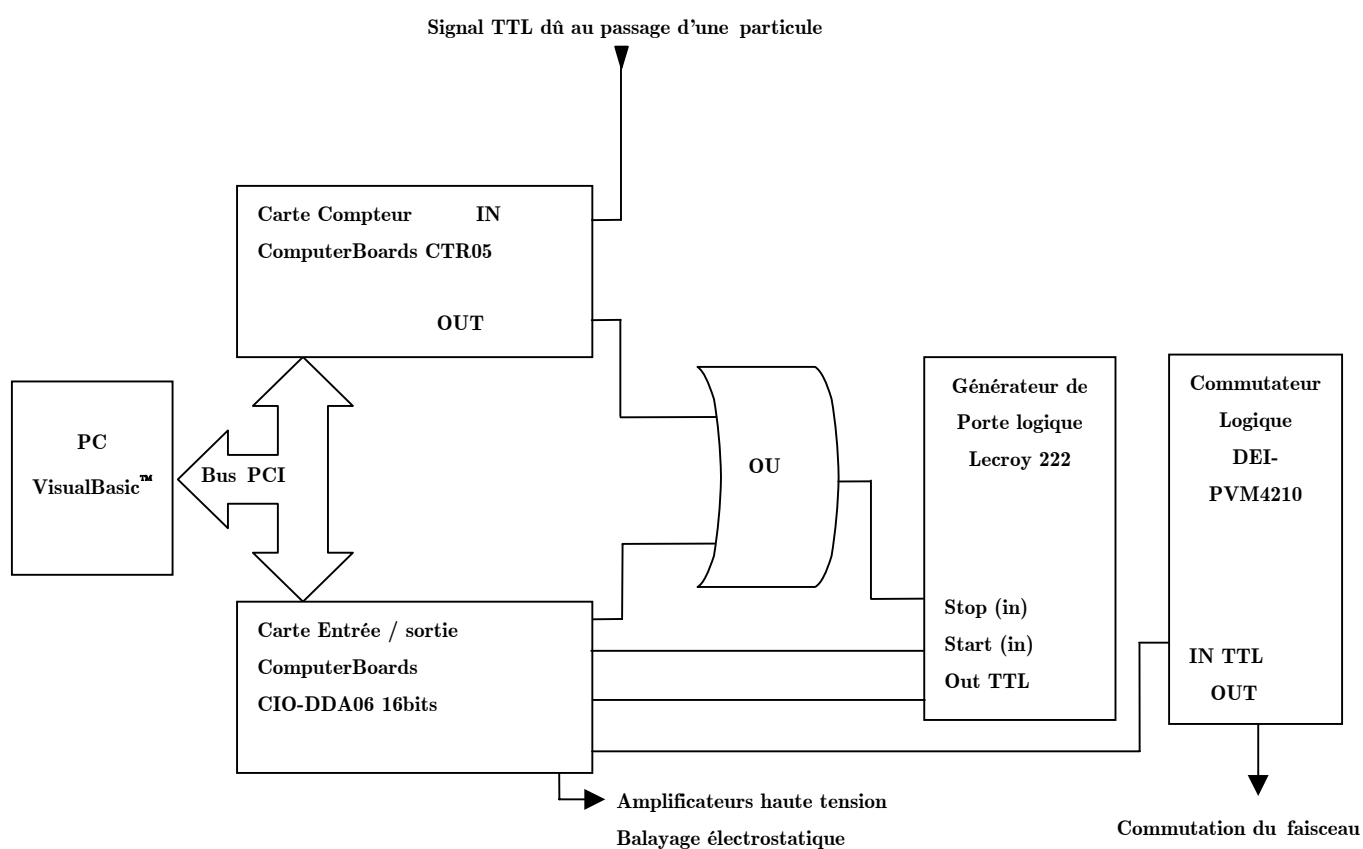


Fig. IV.12 : Schéma du montage électronique réalisant le comptage des particules et la commutation du faisceau.

En fonction des besoins de l'utilisateur, plusieurs fonctionnalités sont disponibles dans cette configuration. Nous reviendrons sur ce point lors de la présentation du programme de contrôle commande.

Le temps total de réaction du système est inférieur à une microseconde.

### 1.3 Microscope optique

Pour leur irradiation, la localisation précise des cibles cellulaires ou sub-cellulaires en ligne a nécessité le couplage d'un microscope à l'étage d'irradiation. Afin de distinguer clairement les cibles d'autres entités de taille comparable, les cellules doivent être marquées à l'aide d'un colorant vital. Cela permet par exemple de distinguer le noyau cellulaire en utilisant un colorant spécifique de la chromatine. La plupart de ces colorants émettent dans le domaine visible lorsqu'ils sont excités dans l'ultraviolet. En raison de la géométrie du système, le microscope utilisé sur l'étage d'irradiation est un microscope d'épi-fluorescence. C'est à dire que l'on illumine les objets à visualiser en ultraviolet à travers l'objectif du microscope (fig. IV.13).

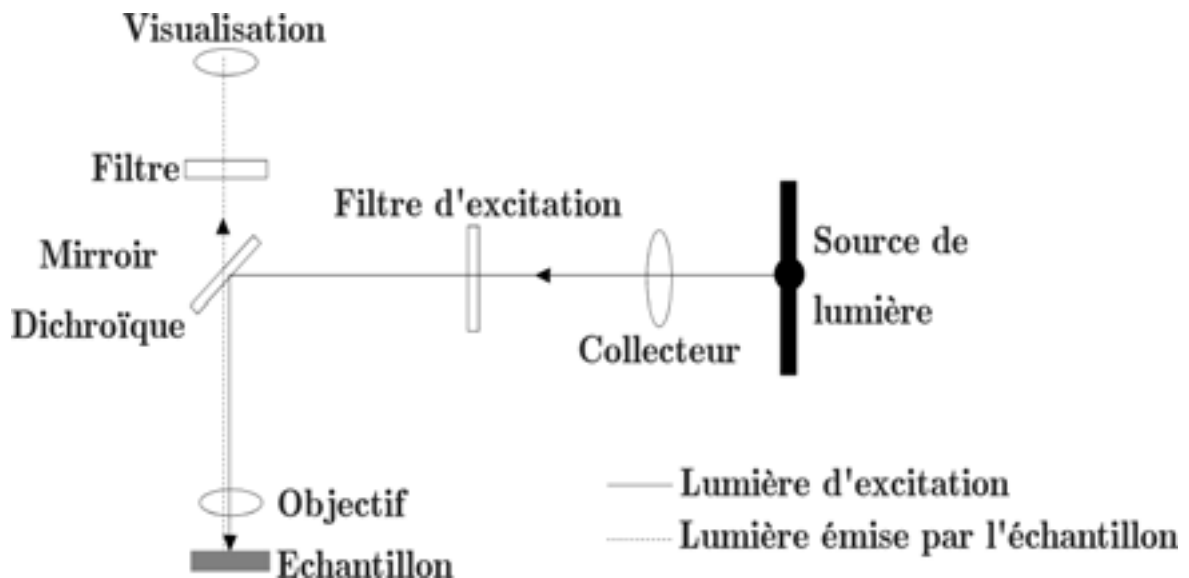


Fig. IV.13 : Schéma de principe de l'épi-fluorescence. L'échantillon est éclairé à travers l'objectif. Un filtre d'excitation permet la sélection des longueurs d'onde d'excitation. Un miroir dichroïque sépare la lumière émise par l'échantillon de la lumière d'excitation.

Sur le dispositif de visualisation des cellules en ligne, le contrôle de l'éclairage de l'échantillon se fait via un obturateur situé entre le filtre d'excitation et le miroir dichroïque. Cet obturateur est déplacé à l'aide d'un moteur à courant continu contrôlé automatiquement par le PC central. Le but est de limiter l'exposition des cellules aux rayonnements ultraviolets, délétères par essence.

### Excitation de l'échantillon

La source de lumière utilisée sur l'étage d'irradiation est une lampe à mercure de type Olympus U-ULH. Cette source possède de nombreuses raies d'émission dans le domaine ultraviolet comme le montre la figure IV.14. L'utilisation d'un miroir dichroïque permet l'éclairage de l'échantillon et la collection de la lumière émise par l'échantillon à travers l'objectif.

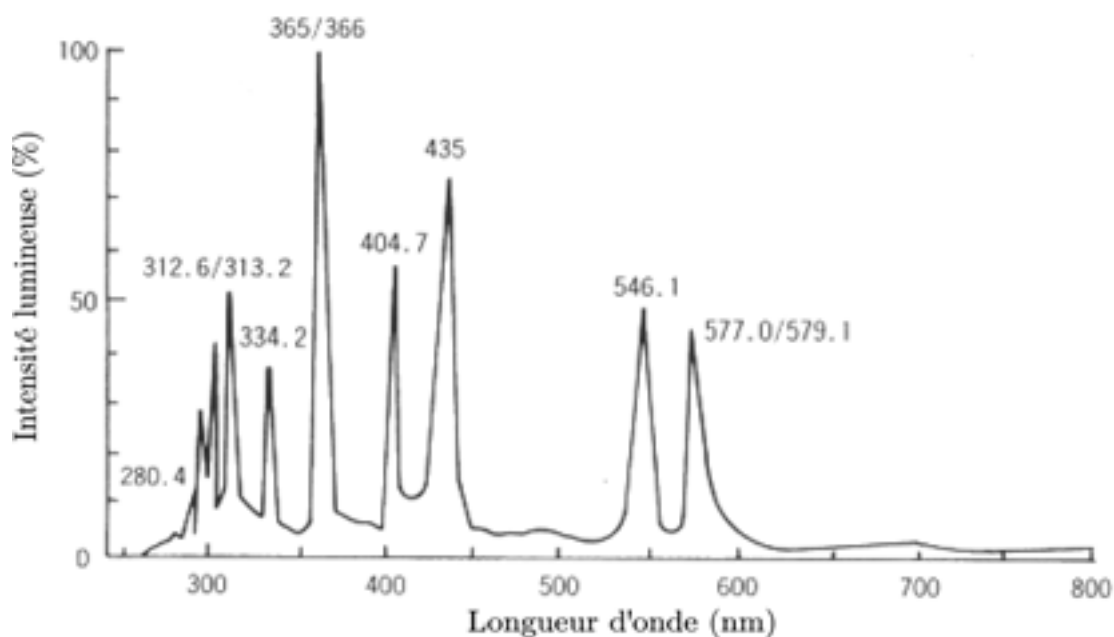


Fig IV.14 : Spectre d'émission typique d'une lampe à mercure.

Le filtre d'excitation, de type U-MNU à bande étroite, permet de limiter cette excitation au proche ultraviolet (360 - 370 nm). Le taux de transmission de ce filtre en fonction de la longueur d'onde est représenté figure IV.15.

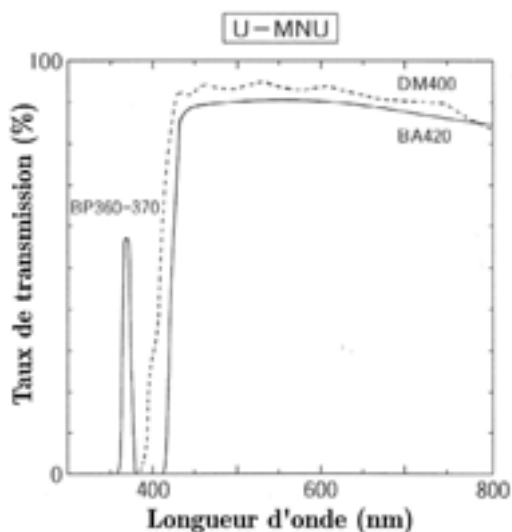


Fig. IV.15 : Caractéristique spectrale du filtre d'excitation. Celui-ci permet d'isoler la principale raie d'émission de la lampe dans les ultraviolets (360-370 nm).

### Acquisition d'image

L'acquisition d'images numériques se fait à l'aide d'une caméra CCD haute résolution SPOT JR fournit par Diagnostic Instruments®. Le capteur CCD est de type Kodak KAF-0400 CCD, 1315×1033 pixels, refroidi à  $-12^{\circ}\text{C}$  par effet Peltier. La figure IV.16 montre l'évolution de l'efficacité quantique du CCD en fonction de la longueur d'onde.

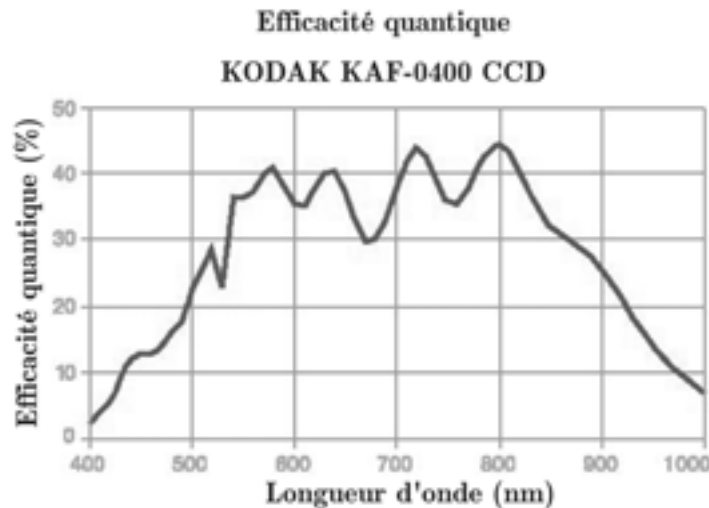


Fig. IV.16 : Evolution de l'efficacité quantique du CCD de la caméra SPOT JR en fonction de la longueur d'onde. On remarque une diminution importante dans le bleu. L'efficacité à ces longueurs d'ondes a été améliorée sur la dernière génération de CCD.

### Grossissement

Les cellules à irradier sont en généralensemencées sur des surfaces de quelques  $\text{mm}^2$ . Afin de pouvoir localiser chaque cellule, un certain nombre de champs de microscope doivent être explorés. Le choix de l'objectif résulte d'un compromis entre précision souhaitée, temps d'acquisition vidéo, taille du champ et distance de travail. En effet, les objectifs à fort grossissement présentent généralement une ouverture plus faible, ce qui augmente considérablement le temps d'acquisition d'une image. En outre, plus le grossissement est important, plus la taille du champ sera faible, ce qui obligera l'acquisition d'un nombre de champs plus élevé pour couvrir la totalité de l'échantillon. La distance de travail se trouve également réduite lorsque l'on augmente le grossissement, ce qui peut poser problème lorsque les cellules sont visualisées à travers le milieu de culture.

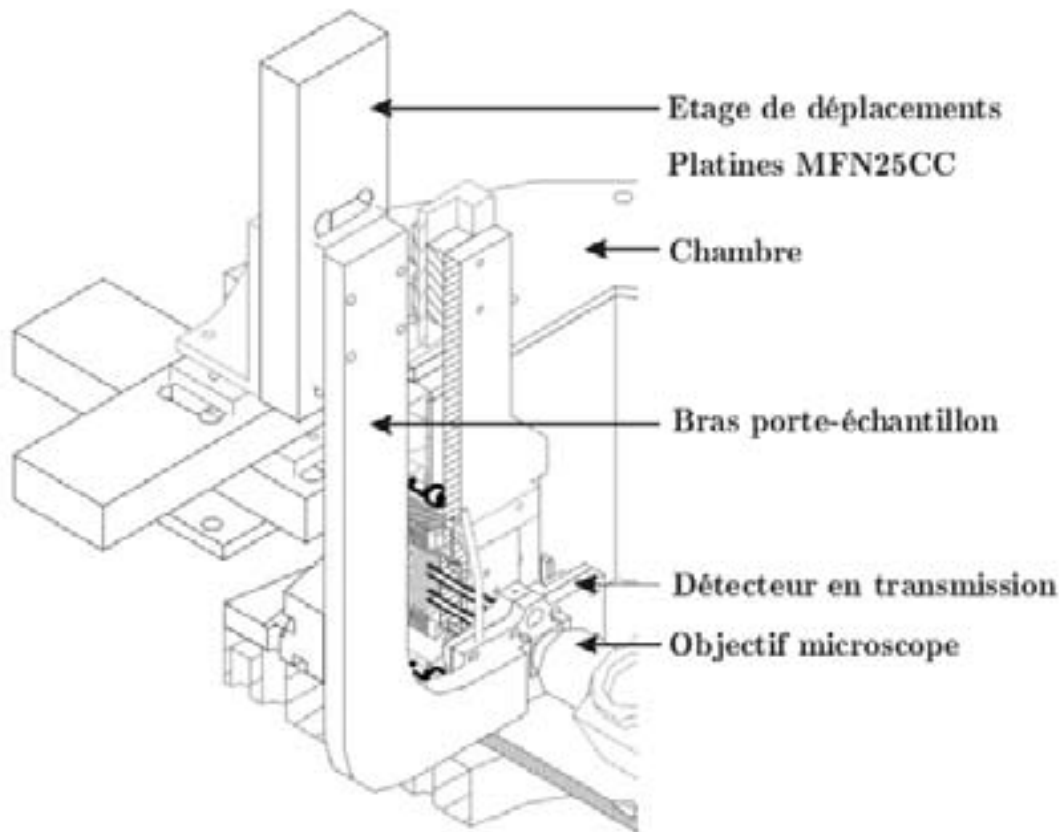
L'objectif le plus couramment utilisé est un objectif Olympus<sup>®</sup> de type UPLFL 10× adapté à la microscopie de fluorescence. Un objectif de type LCPLFL 20× est également adaptable pour une localisation plus précise.

L'ensemble du microscope est supporté par des platines de déplacement micrométrique lui permettant de se déplacer dans un plan vertical perpendiculaire à l'axe du faisceau. La mise au point se fait à l'aide d'un vérin motorisé (Newport<sup>®</sup> 850G) alimenté par un contrôleur (Newport<sup>®</sup> ESP300 1 axe) connecté au PC de contrôle (via un port GPIB). Ce type de contrôleur est également utilisé pour la gestion des déplacements de la cible. Il sera présenté plus en détail au paragraphe 1.4. Ce système motorisé permet notamment de faire la mise au point sur les échantillons sans avoir à toucher l'étage d'irradiation afin de ne pas le déplacer par rapport au faisceau. Il peut permettre, en outre, une mise au point automatique.

#### **1.4 Déplacements de la cible**

Le positionnement d'un grand nombre de cellules (entre 500 et 1500 par puits de culture) en face du point de sortie du faisceau a nécessité l'automatisation du système de déplacement mécanique. L'étage supportant l'échantillon a donc du être motorisé. Les platines de déplacements micrométriques utilisées sont des platines de translation entraînées par un moteur à courant continu intégré (M-MFN25CC, Newport<sup>®</sup>). Le guidage du mouvement est assuré par un double chemin de billes. Ces platines, qui ont une course maximum de 25 mm, sont entraînées par une vis d'un pas de 0.5 mm. Un codeur optique à 48 points/tour, placé sur l'axe du moteur à courant continu, permet une lecture de position. La résolution du mouvement, c'est à dire le plus petit mouvement théorique qu'il est possible d'effectuer avec ce système, est liée à la résolution du codeur optique qui est ici de 0.05  $\mu\text{m}$ .

Ces platines motorisées ont été assemblées afin de constituer un étage de déplacement permettant de positionner l'échantillon suivant les trois axes XYZ, Z étant parallèle à l'axe du faisceau. Cet étage a été déporté hors de la chambre pour des raisons d'encombrement. Il permet de déplacer un bras sur lequel est fixé le puits d'irradiation contenant les cellules (fig. IV.17)



*Fig. IV.17 : L'étage de déplacement de la cible. Le puits de culture est disposé sur le bras entre le détecteur en transmission et l'objectif du microscope.*

Les déplacements sont gérés par un contrôleur 3 axes de type Newport® ESP300 Motion Controller (ESP : Enhanced System Performance), permettant soit un contrôle direct via des commandes situées sur la façade avant, soit un contrôle indirect, commandé par un PC, via un port GPIB. Ce contrôleur est muni d'un processeur DSP 60 MHz 32 bits à virgule flottante qui permet une grande précision de synchronisation et des calculs efficaces de trajectoire. Le protocole de communication entre le PC de commande et l'ESP300 sera détaillé plus loin (paragraphe 2).

La précision de positionnement du porte-échantillon est un paramètre crucial pour l'application envisagée. A cela deux raisons :

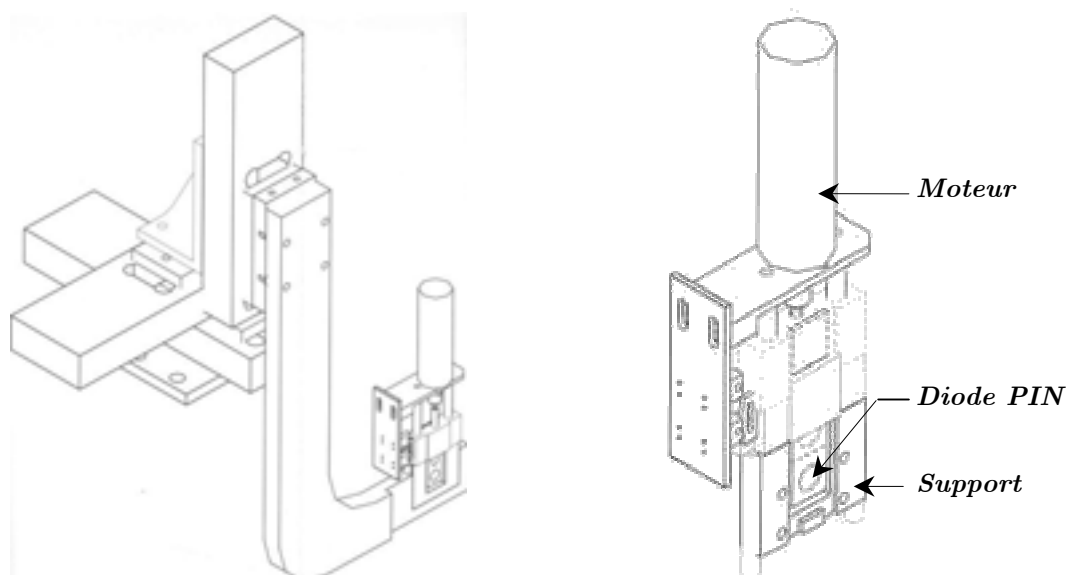
- le positionnement des cellules dans le faisceau avec une précision du micromètre est indispensable dans le mode d'irradiation en faisceau fixe puisqu'il conditionne la précision du tir.

- Lors de la phase d'étalonnage en position du faisceau, les correspondances entre les différents repères sont calculées en prenant les valeurs de déplacements mécaniques, fournies par le contrôleur, comme référence de longueur.

Les tests d'irradiation sur détecteur de traces qui seront présentés au chapitre V reflètent la précision globale du dispositif d'irradiation. Celle-ci inclut la précision de positionnement des platines micrométriques.

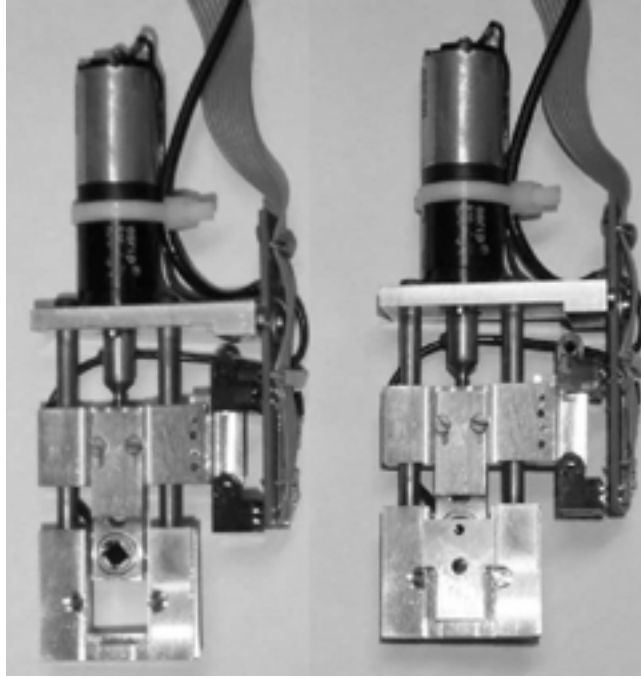
### 1.5 Le dispositif d'étalonnage

Afin de réaliser la phase d'étalonnage du système d'irradiation qui sera présentée au paragraphe 2.2, un dispositif de repérage en position du faisceau extrait à l'air a été mis au point (fig. IV.18). Celui-ci vient se positionner à la place du puits de culture. La face avant de ce dispositif est un collimateur. Une diode PIN utilisée comme détecteur de particules est située derrière le collimateur sur un support mobile entraîné par un moteur à courant continu. Le détecteur PIN peut être placé en position basse pour détecter les particules en transmission à travers le collimateur ou en position haute pour permettre une visualisation optique du même collimateur grâce à l'objectif du microscope.



*Fig. IV.18 : Dispositif d'étalonnage monté sur le bras porte-échantillon (à gauche). A droite : dispositif seul. La position haute est représentée en pointillés, la position basse en traits pleins. Le collimateur (non représenté) se fixe sur la partie avant.*





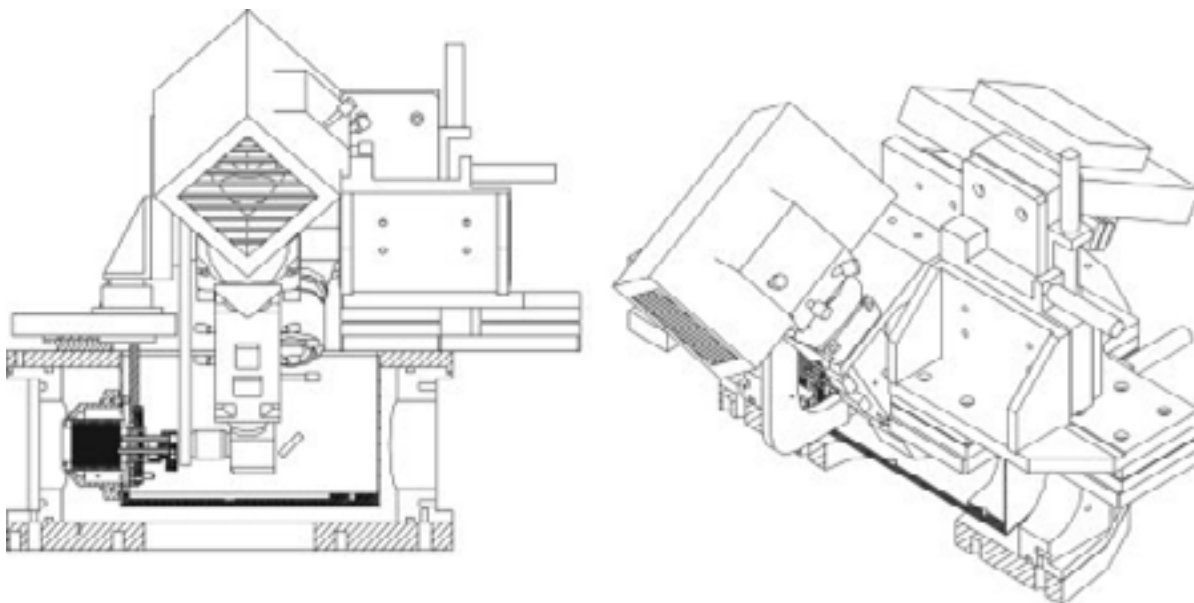
*Fig. IV.19 : Photographie de la face avant du support d'étalonnage. Sur l'image de gauche, le collimateur a été retiré. La diode PIN est en position haute sur les deux images. Sur l'image de droite, le collimateur a été inséré devant la diode PIN.*

L'optimisation du nombre de particules transmises à travers un tel collimateur permet de repérer la position d'un faisceau de quelques micromètres avec une précision inférieure à  $1\ \mu\text{m}$ . Il suffit ensuite de visualiser ce même collimateur pour repérer la position du faisceau dans le champ du microscope. C'est le centre du collimateur.

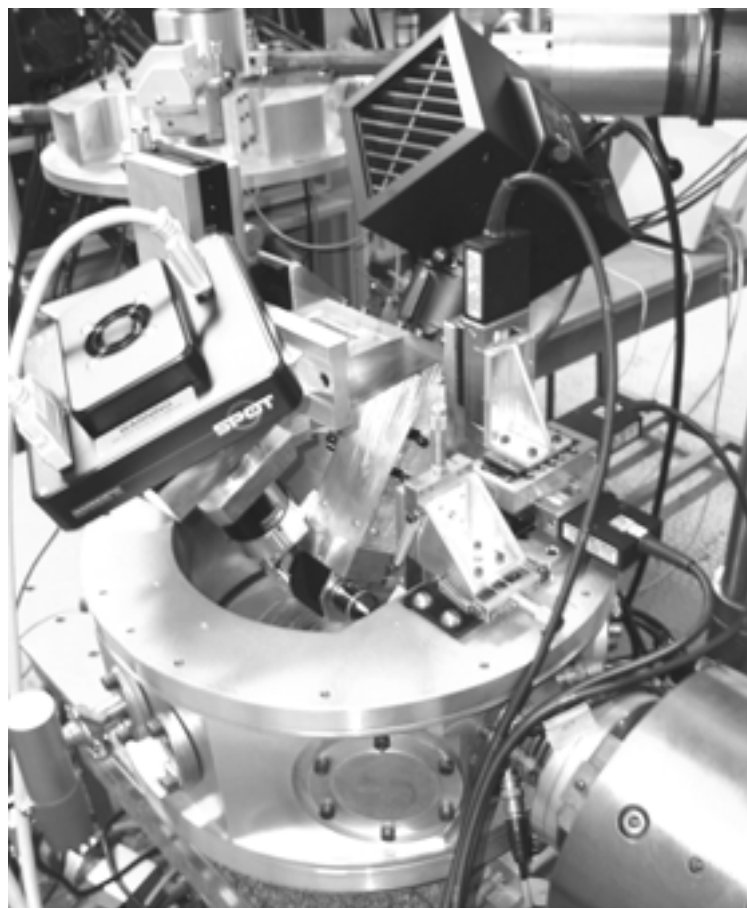
Cette technique est utilisée dans la procédure d'étalonnage qui sera décrite en détail dans le paragraphe 2.2.

## **1.6 L'étage d'irradiation**

Le peu de place disponible à l'intérieur de la chambre a imposé une contrainte forte pour l'assemblage des différents éléments. La plupart des instruments ont dû être déportés hors du volume de la chambre initiale pour des raisons d'encombrement. Une vue globale du dispositif dans sa version actuelle est présentée sur les figures IV.20 et IV.21.



*Fig. IV.20 : Vue en coupe de la chambre d'irradiation (gauche) et vue en perspective de cette même chambre (droite). Sur la vue en coupe, on distingue la lampe UV au premier plan ainsi que l'étage d'extraction situé en face de l'objectif du microscope. La vue 3D dévoile la caméra CCD ainsi que l'agencement des platines de déplacement micrométrique supportant le microscope.*



*Fig. IV.21 : Photographie de l'étage d'irradiation. On distingue la caméra CCD SPOT au premier plan à gauche et la lampe UV à droite. Les platines de déplacement de la cible et de positionnement de l'étage d'extraction sont visibles. On distingue également l'objectif du microscope au fond de la chambre.*

Comme nous l'avons vu, ce dispositif comporte plusieurs instruments qu'il est nécessaire de piloter de manière automatique. Tous ces instruments sont reliés au PC de commande.

## 1.7 Le puits d'irradiation

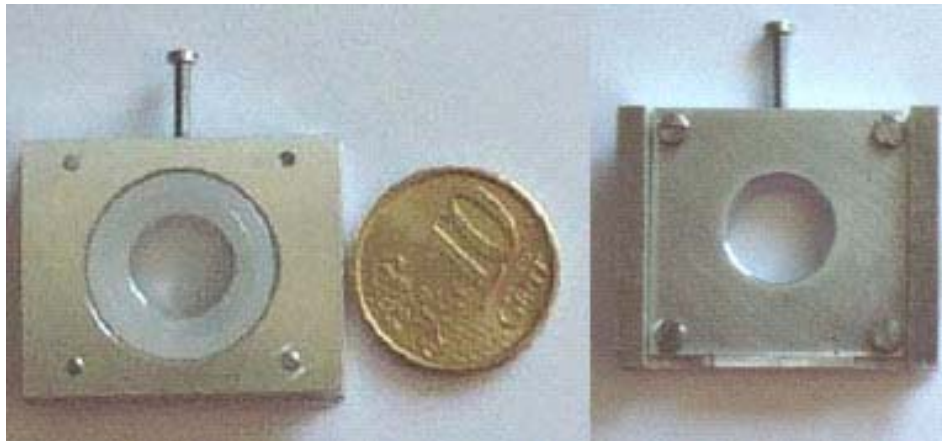
Quelques heures avant l'irradiation, les cellules sontensemencées sur une surface de quelques  $\text{mm}^2$  dans des puits développés spécifiquement. L'ensemble est placé dans les conditions de culture habituelles, ce qui se traduit par une bonne adhésion sur le support de culture. Les cellules sont ensuite colorées dans le même puits à l'aide d'un colorant vital environ une heure avant d'être irradiées. Juste avant d'être placés sur la ligne d'irradiation, les puits sont scellés après changement de milieu nutritif.

Les contraintes dont il a fallu tenir compte pour développer ces puits sont multiples :

- Les cellules devaient adhérer sur un support pour éviter tout mouvement, aussi léger soit-il, pendant l'irradiation.
- Le support devait être suffisamment mince afin de ne dégrader ni la résolution spatiale du faisceau, ni l'énergie des ions incidents. Il devait être transparent pour permettre un éclairage en transmission lors d'un pré-repérage en lumière visible.
- Le matériau employé pour ce support ne devait pas émettre de lumière de fluorescence sous illumination UV afin d'éviter tout bruit de fond lors du repérage des cellules colorées.
- Les matériaux employés pour le support de culture, la boîte elle-même et les joints d'étanchéité devaient ne pas être cytotoxiques.
- En fonction du type cellulaire étudié, une bonne adhésion des cellules devait être obtenu sur le support de culture, éventuellement avec l'aide d'un facteur d'adhésion.
- La géométrie des puits devait être compatible avec le fait que le milieu serait conservé lors de l'irradiation et ce afin d'éviter tout stress supplémentaire des cellules dû à une possible déshydratation. L'épaisseur de ce milieu devait rester cependant assez faible pour permettre une bonne visualisation des cellules avec un objectif de distance frontale raisonnable. Pour la même raison, le puits devait être fermé par une lame transparente et mince.

- A terme, le système pourrait être thermostaté à 37°C, température habituelle de maintien des cellules en culture. Cette possibilité n'est pas implémentée dans la première version du dispositif d'irradiation.
- La pression dans le puits devait être ajustable afin d'éviter une courbure trop importante du support de culture, ceci afin de faciliter la mise au point du microscope sur la totalité du champ étudié.
- La lame de liquide formée par le puits de culture devait être aussi proche que possible d'une lame à faces parallèles (entre le support de culture et la lame qui scelle le puits) afin d'éviter une erreur de visée trop importante due aux problèmes de parallaxe.

Le puits finalement choisi est un mini-puits de culture de 10 mm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur. Ce puits est fermé d'un côté par une feuille mince de polypropylène (d'épaisseur 4  $\mu\text{m}$ ) tendue à l'aide d'un anneau et sur laquelle adhèrent les cellules. L'autre face du puits est fermée par une lamelle de microscopie circulaire en verre de 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. C'est à travers cette lamelle que les cellules seront visualisées par le microscope. L'étanchéité est assurée par un joint en silicone écrasé sous la pression de quatre vis (Fig. IV. 22). Ces vis permettent de régler le parallélisme entre support de culture et lamelle ainsi que la pression dans le puits.



*Fig. IV.22 : Le puits de culture monté sur son support d'aluminium, conçu pour s'insérer sur le bras porte-échantillon. La face avant (à gauche) est fermée par une feuille de polymère mince affectant le moins possible le parcours des particules. La partie arrière est fermée par une lamelle de verre permettant de diffuser le moins possible la lumière en provenance des cellules. On distingue les quatre vis (à droite) qui permettent la fermeture du puits sur sa partie arrière.*

Après la phase d'irradiation, le système autorise la récupération des cellules qui sont décollées de leur support à l'aide d'un traitement spécifique. Elles pourront ensuite être réensemencées dans des boîtes de culture classiques afin de subir les tests de microbiologie appropriés.

## **2. Le programme $\mu$ Irad**

La gestion des différents instruments et procédures a été centralisée dans un seul programme de contrôle [74] : le programme  $\mu$ Irad. Ce dernier a été écrit en Visual Basic™ 6.0, selon une architecture orientée objet. Des classes indépendantes regroupent les routines permettant le contrôle de chaque instrument (caméra CCD, platines de déplacement motorisées, dispositif de balayage, etc ...). Des instances de ces classes peuvent ensuite être utilisées lors des procédures automatiques d'étalonnage et d'irradiation. L'environnement Visual Basic™ permet de créer une interface accueillante pour l'utilisateur sous forme de menus déroulants et de fenêtre de type Windows™.

La présentation de ce programme sera divisée en trois parties principales. Nous verrons tout d'abord les outils développés pour le contrôle des différents instruments indépendamment les uns des autres. La phase d'étalonnage du système, très importante pour atteindre la précision souhaitée sera ensuite détaillée. Nous terminerons en présentant les diverses méthodes mises au point pour l'irradiation proprement dite.

### **2.1 Les outils informatiques**

#### ***2.1.1 La caméra optique***

La prise d'images optiques servant à localiser les cellules de la cible est réalisée par une caméra CCD connectée au PC de commande via une carte entrée-sortie fournie par Diagnostic Instruments®. Des bibliothèques de fonctions compatibles avec Visual Basic™ sont fournies avec la carte sous forme de fichiers DLL (Dynamic Link Library). Un module de contrôle spécifique a été mis au point afin d'accéder aux différents paramètres de réglages de la caméra :

- Temps d'acquisition (calculé automatiquement ou imposé par l'utilisateur)
- Résolution de l'image (regroupement de pixels par 1, 4, 9 ou 16)

- Filtres de couleurs utilisés lors de l'acquisition
- Codage de l'image (8 ou 24 bits)

Une option de contrôle de l'obturateur de la source UV a également été ajoutée. Celle-ci permet l'ouverture automatique de l'obturateur lors de la prise d'image afin de minimiser autant que possible l'exposition des cellules aux ultraviolets.

### **2.1.2 *Le manipulateur***

Le contrôleur ESP300 qui gère les déplacements de l'échantillon est commandé via un port GPIB. Le dialogue entre PC et contrôleur se fait sous la forme de chaînes de caractères ASCII.

Le manipulateur est un module qui permet de gérer les déplacements micrométriques du porte-échantillon. Des consignes en position peuvent y être entrées par l'utilisateur. Une commande permettant d'envoyer les platines X et Y en butée matérielle est également disponible. Cette opération est indispensable pour définir les références du repère mécanique et ainsi utiliser des jeux de coordonnées reproductibles d'une expérience à l'autre.

Un retrait fixe selon l'axe Z (parallèle à l'axe du faisceau) peut également être imposé par l'utilisateur avant chaque déplacement dans le plan XY. Cette option donne la possibilité de positionner le support de culture au contact de la fenêtre d'extraction afin de minimiser l'élargissement du faisceau engendrée par l'épaisseur d'air résiduelle.

Une deuxième fenêtre de contrôle grossier du manipulateur permet d'effectuer des déplacements rapides dans le plan XY. Cet outil est très utile pour les phases préliminaires de centrage.

### **2.1.3 *Contrôle du faisceau et caméra ionique***

La position du faisceau peut être contrôlée avec une précision inférieure au micromètre dans le plan transverse (X, Y) grâce aux plaques électrostatiques de balayage. Cette capacité de balayage, développée initialement sur la microsonde pour l'imagerie pixel par pixel (cf. chapitre II), est utilisée ici dans bon nombre de procédures.

Le contrôle du faisceau est géré par deux outils principaux :

- Un outil de définition des paramètres du balayage électrostatique.

- Un outil, appelé « caméra ionique », regroupant plusieurs opérations élémentaires (comptage de particules, irradiation avec un certain nombre de particules, imagerie STIM et recherche automatique de position).

L'outil de paramétrage du balayage permet à l'utilisateur de définir l'énergie des ions, et les coefficients du balayage selon les deux axes X et Y dans le plan transverse. Ces deux coefficients (un pour chaque axe) dépendent uniquement de la configuration des plaques de balayage et des gains des amplificateurs.

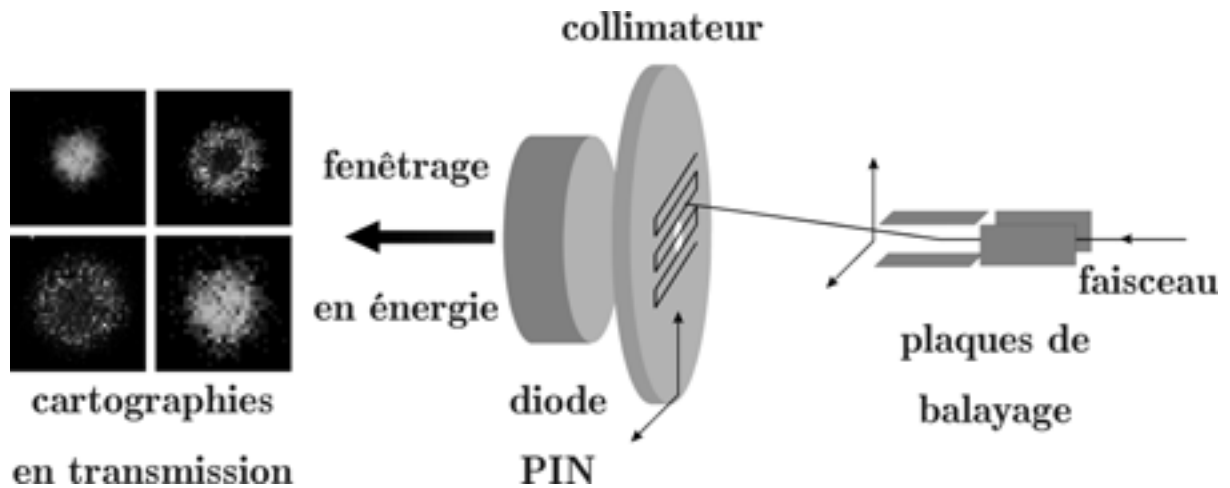
La caméra ionique est une ressource un peu plus complexe permettant l'acquisition d'un signal logique lié au passage de chaque particule du faisceau via divers détecteurs de particules. Un mode imagerie est disponible en couplant le contrôle en position du faisceau dans le plan transverse à l'acquisition du signal correspondant pixel par pixel. Cette acquisition d'images peut se faire soit en mode cible fixe / faisceau balayé, soit en mode faisceau fixe / cible déplacée mécaniquement devant le faisceau.

Les opérations gérées par la caméra ionique nécessitent le contrôle du manipulateur, des outils de balayages du faisceau et des compteurs de la carte Computer Boards® CTR05. Chaque opération nécessite un certain nombre de paramètres :

- Imagerie ionique en transmission :

Cette opération permet de faire l'acquisition d'images selon la méthode de microscopie ionique en transmission simplifiée à quatre canaux issus d'une fenêtrage sur quatre gammes d'énergie du spectre des particules. Ces quatre canaux correspondent aux quatre compteurs de la carte Computer Boards® CTR05. Le fenêtrage en énergie n'est pas réalisé à partir d'un spectre acquis via des codeurs comme c'est le cas pour les acquisitions STIM classiques. Il est réalisé simplement à partir du réglage des seuils des quatre discriminateurs alimentés par le signal d'un détecteur. Ce mode de fonctionnement est très utilisé pour l'acquisition d'image en transmission sur un collimateur (fig. IV.23).

Les différents paramètres à définir sont : le mode de balayage (mécanique ou électrostatique), la taille de balayage, la position du centre du balayage (exprimée dans le repère ou sera effectué le mouvement : électrostatique ou mécanique) le nombre de pixels et la durée de comptage sur chaque pixel.



*Fig. IV.23 : Principe de l'imagerie en transmission d'un collimateur. L'acquisition pixel par pixel se fait soit en déplaçant le faisceau, soit en déplaçant le collimateur. L'acquisition se fait sur 4 canaux. Les gammes d'énergie correspondantes sont déterminées par les seuils de 4 discriminateurs.*

- Recherche de position :

Cette opération permet d'aligner automatiquement le faisceau au centre d'un collimateur. Le principe est le suivant : le faisceau est balayé sur un collimateur (ou inversement suivant le mode de balayage choisi) afin de réaliser une image en transmission de ce collimateur. Une fois l'image terminée, le barycentre du collimateur est automatiquement déterminé et une deuxième image (recentrée et réduite) est acquise. Les coordonnées du barycentre déterminées à partir de cette image sont ensuite stockées (fig. IV.24). Ces coordonnées correspondent soit à la position du collimateur dans le repère du faisceau si le faisceau a été balayé soit aux coordonnées du faisceau dans le repère mécanique dans le cas où le collimateur a été déplacé mécaniquement.

Cette opération est très utilisée au cours des phases d'étalonnage.



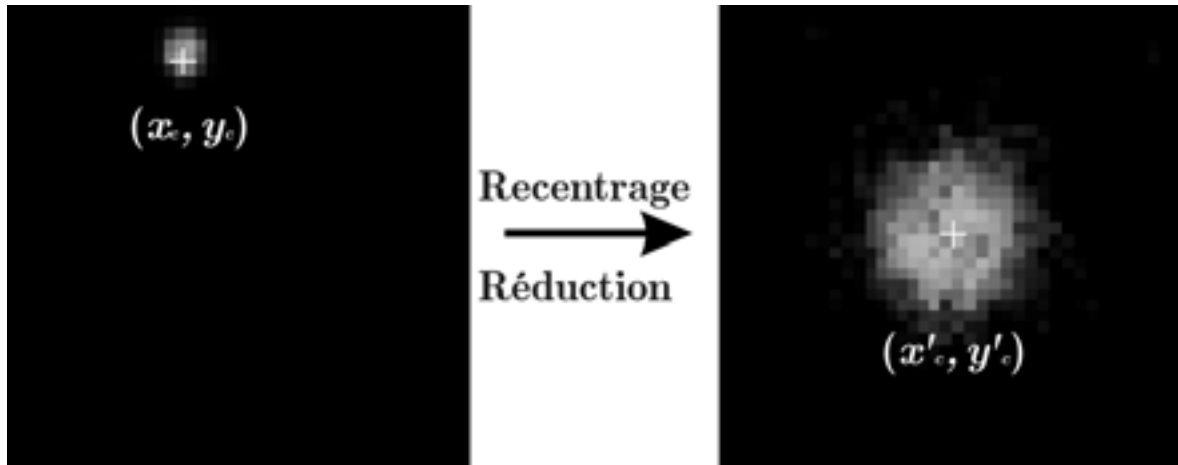


Fig. IV.24 : Principe de la recherche automatique de position. Une première image en transmission est acquise afin de localiser grossièrement le collimateur. Les coordonnées barycentre de ce collimateur, notées  $(x_c, y_c)$ , sont déterminées par les routines de traitement d'image. Une seconde image de taille plus réduite et centrée sur  $(x_c, y_c)$  est ensuite acquise. Les coordonnées du barycentre du collimateur  $(x'_c, y'_c)$  sont recalculées avec une plus grande précision.

- Coups par seconde :

Une fonction « échelle de comptage » a été implémentée. Elle permet de mesurer simultanément les taux de comptage de quatre détecteurs, faisceau et manipulateur fixe. Cette fonctionnalité est très utile pour vérifier le centrage du faisceau sur le collimateur d'entrée du détecteur à gaz ainsi que pour estimer rapidement l'efficacité du détecteur en transmission contrôlant le faisceau en mode ion par ion. Les positions du manipulateur et du faisceau sont accessibles à l'utilisateur lors de ce comptage.

- Comptage :

L'opération de comptage est identique à la précédente à cela près que le nombre de particules détectées s'accumule jusqu'à ce que l'utilisateur arrête la mesure. Cette fonctionnalité est aussi utilisée pour les mesures d'efficacité de détection.

- Irradiation :

Cette opération permet de délivrer un nombre d'ions prédéterminé par l'utilisateur en un point précis soit dans le repère faisceau soit dans le repère mécanique. Les procédures d'irradiation automatique et semi-automatique font appel à cette

opération élémentaire. Dans ce cas, les coordonnées de chaque cible sont transmises à la routine d'irradiation. L'utilisateur doit prédéfinir un nombre d'ions et indiquer un canal de détection qui correspond au détecteur en transmission.

- Gravure sur CR39 :

Comme nous le verrons au chapitre V, l'implantation de particules sur détecteur de trace CR39 est un bon moyen de vérifier le bon fonctionnement du dispositif. Une procédure permettant d'implanter automatiquement un nombre d'ions prédéterminé selon un motif régulier a été ajouté à la caméra ionique afin de pouvoir vérifier la résolution spatiale du faisceau à l'air au début de chaque séance d'irradiation.

#### *2.1.4 Le traitement d'image*

Pour la reconnaissance et la localisation précise des cellules à partir des images optiques acquises par la caméra CCD, des outils de traitement d'image ont été implémentés. Ces outils sont issus des fonctions élémentaires du kit de développement Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). On peut les séparer en deux catégories distinctes : l'amélioration de l'image acquise et la reconnaissance de formes. Pour plus de clarté dans la présentation, commençons par définir quelques termes relatifs au traitement d'image.

##### *2.1.4.1 Préliminaire*

Le but de ce paragraphe est de rappeler quelques notions simples sur les images numériques de type bitmap.

Une image numérique est composée d'un tableau de pixels dont la teinte peut être codée de différentes manières. Nous utiliserons ici trois types d'images :

- des images noir et blanc : chaque pixel est codé sur 1 bit, soit noir soit blanc.
- des images en niveaux de gris : chaque pixel est alors codé sur 8 bits. L'intensité du pixel peut alors varier de 0 à 255, chaque valeur correspondant à une teinte de gris particulière.
- des images en vraies couleurs : chaque pixel est codé sur 24 bits (RVB) séparés en trois octets codant chacun pour une couleur élémentaire : Rouge, Vert et Bleu.

Ces images numériques contiennent par ailleurs des objets que l'on peut définir comme un ensemble de pixels en contact que l'on peut regrouper selon certains critères (taille de l'ensemble, intensité, forme ...)

#### 2.1.4.2 Amélioration de l'image optique acquise

Afin de réaliser une reconnaissance efficace des objets présents sur l'image optique acquise, une amélioration de la qualité de cette image est souvent nécessaire. On distinguera ici l'image optique « acquise » de l'image optique « améliorée » sur laquelle s'opérera la reconnaissance de formes. Quatre outils élémentaires ont été mis à la disposition de l'utilisateur.

- Suppression du bruit de fond

Dans une image numérique issue d'un capteur CCD, un certain nombre de pixels peuvent présenter des valeurs aberrantes avec une intensité très différente de celle de leurs voisins immédiats. Afin de lisser ces anomalies, une fonction de suppression de bruit est mise à la disposition de l'utilisateur. Elle permet notamment d'éviter des pixels brillants ne correspondant à aucun objet physique.

Le principe de cet opérateur est le suivant :

L'image est examinée par région de  $n \times n$  pixels. L'intensité du pixel central est comparée à la moyenne de l'intensité de cette région. Si l'écart dépasse un seuil de sensibilité fixé par l'utilisateur, l'intensité du pixel central est ramenée à la valeur moyenne. Sinon, l'intensité du pixel reste inchangée. Chaque pixel est examiné de cette manière. La valeur  $n$  définit la taille de la région élémentaire. Elle est choisie par l'utilisateur.

- Extraction du fond

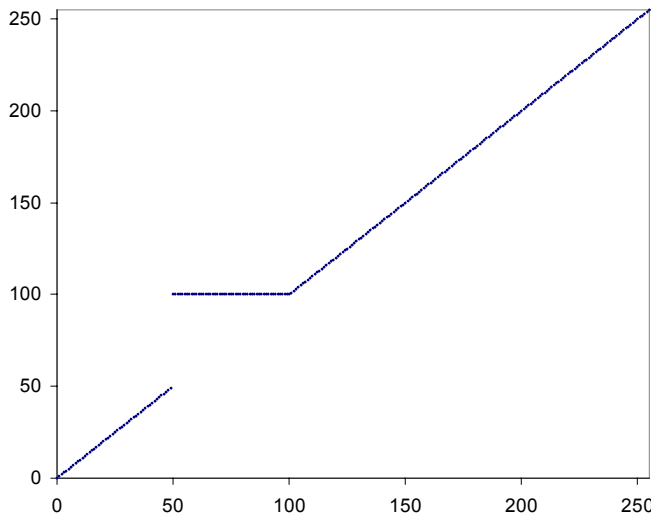
Les images acquises en fluorescence sur des cultures cellulaires comportent parfois un fond d'une intensité non négligeable, dû à de la diffusion dans le milieu et/ou à une émission de fluorescence parasite du support de culture ou du milieu lui-même. Cela peut arriver si des temps d'acquisition importants sont utilisés. La présence de ce fond peut gêner le calcul du seuil qui servira à la reconnaissance de forme (voir paragraphe 2.1.4.3).

Un outil permettant d'extraire ce fond est donc disponible.

- Amélioration du contraste

Dans les cultures cellulaires à irradier, la coloration des cellules n'est en général pas homogène. En effet la fixation du colorant par la cellule dépend de sa position dans le cycle cellulaire. Cette coloration hétérogène complique grandement la reconnaissance

automatique de forme dans la mesure où les cellules les plus colorées sont représentées par des pixels saturés. Les cellules les moins colorées le sont par des pixels de faible intensité qui seront mal reconnus par les opérateurs de reconnaissance de forme. Les outils fournis par Image-Pro Plus permettent d'appliquer une table de transformation (LUT : Look Up Table) à une image. Une table LUT contient les correspondances entre les intensités des pixels avant et après traitement. Un exemple est donné sur la figure IV.25.



*Fig IV.25 : Exemple de Look Up Table applicable à image codée sur 8 bits. Les pixels d'intensité inférieure à 50 et supérieure à 100 resteront inchangés. Les pixels d'intensité comprise entre 50 et 100 auront tous une intensité de 100 après traitement. L'intensité de chaque pixel est comprise entre 0 et 255.*

Pour le traitement des images où les noyaux des cellules ont été colorés, le meilleur résultat a été obtenu en amplifiant les pixels de faible intensité correspondant à des objets réels sans modifier ceux présentant déjà un intensité suffisante.

Le profil de LUT appliqué aux images de cellules est du type :

$$\left\{ \begin{array}{l} \bullet 0 \leq i < Seuil \quad \Rightarrow i' = i \\ \bullet Seuil \leq i < Seuil + 100 \Rightarrow i' = i + A \cdot \sin\left(\frac{\pi}{100}(i - Seuil)\right) \\ \bullet Seuil + 100 \leq i < 255 \quad \Rightarrow i' = i \end{array} \right\}$$

Avec :

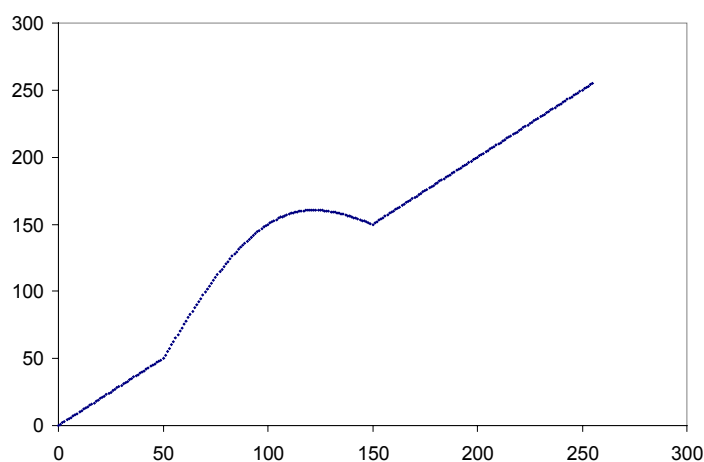
$i$  : intensité avant transformation

$i'$  : intensité après transformation

*Seuil* : seuil en intensité imposé par l'utilisateur

*A* : amplification maximale imposé par l'utilisateur

Le profil de cette table LUT est représenté figure IV.26. L'utilisation d'une fonction sinus permet une amplification continue et relativement douce dans la région considérée. Concernant la largeur de la zone amplifiée, une valeur de 100 a donné satisfaction sur l'ensemble des images. Il a été choisi d'appliquer cette valeur par défaut afin de minimiser le nombre de paramètres à fixer par l'utilisateur.



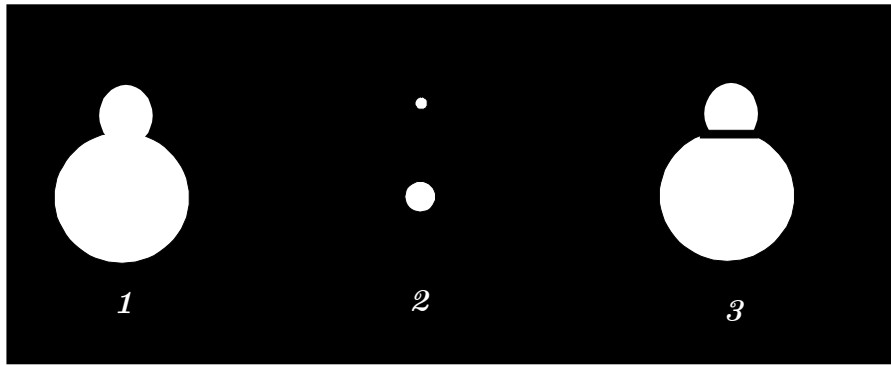
*Fig IV.26 : Profil de table LUT appliquée aux images de fluorescence de cellules (Seuil = 50 ; A = 50). Pour une image codée sur 8 bits, les niveaux de gris sont modifiés. Pour une image codée sur 24 bits (vraies couleurs), les trois couleurs sont amplifiées.*

- Séparation des objets accolés

Les images de cellules en culture dont les noyaux ont été colorés comportent souvent des objets très proches voire en contact (noyaux de cellules en division ...). Un opérateur permettant de séparer ces objets est donc indispensable. La librairie Image-Pro Plus contient un certain nombre de fonctions de filtrage, dont un filtre de type « WaterShed » qui a été choisi pour résoudre ce problème.

Le principe de ce filtre est le suivant :

Les objets présents sur l'image sont érodés suivant une évolution radiale jusqu'à la limite de disparition. Une fois cette limite atteinte, la surface des objets est augmentée jusqu'à ce qu'ils retrouvent leur taille initiale avec l'interdiction pour deux objets d'entrer en contact. Le fonctionnement de ce filtre est représenté schématiquement sur la figure IV.27.



*Fig. IV.27 : Principe du filtre watershed. L'étape 1 représente les objets initialement en contact. L'étape 2 schématise l'érosion. L'étape 3 montre le résultat du filtre.*

Le filtre de séparation des objets ne fonctionne que sur des images binaires (noir et blanc). Un seuil de binarisation de l'image doit donc être défini par l'utilisateur. Le résultat retourné par cette fonction est un masque noir et blanc qu'il faut appliquer à l'image originale.

#### *2.1.4.3 Reconnaissance de forme*

Une fois l'amélioration de l'image terminée, la reconnaissance des objets à irradier et la localisation de leur barycentre doivent être effectuées. Les fonctions disponibles dans le kit de développement permettent une reconnaissance automatique de ces objets. L'utilisateur doit cependant spécifier quelques paramètres tels que l'intervalle de taille dans lequel se trouve les objets à identifier. Il est à noter que seule la taille minimale est prise en compte lors de la localisation des objets présents sur l'images. La taille maximale n'est spécifiée que pour déterminer si un objet doit être irradié ou non. Un objet dont le barycentre est localisé mais dont la taille excède le seuil maximum ne sera pas considéré comme une cible. Cette précaution permet d'éviter d'irradier deux cellules accolées qui n'auraient pas été séparées. Les cas litigieux sont résolus en fin d'irradiation par l'intervention de l'utilisateur qui marque manuellement chacune des deux cellules.

## 2.2 Les procédures d'étalonnage

L'obtention d'une précision d'irradiation de l'ordre du micromètre requiert un étalonnage minutieux du dispositif. Dans la mesure où les cibles sont localisées dans le champ de la caméra CCD, il faut déterminer la position du faisceau dans ce champ et étalonner ses déplacements ainsi que ceux du puits de culture. Tout d'abord, les coefficients relatifs de passage dans les différents repères (repère lié au déplacement mécanique du puits de culture, repère de balayage du faisceau et repère lié au champ du microscope, cf. figure IV.28) doivent être déterminés.

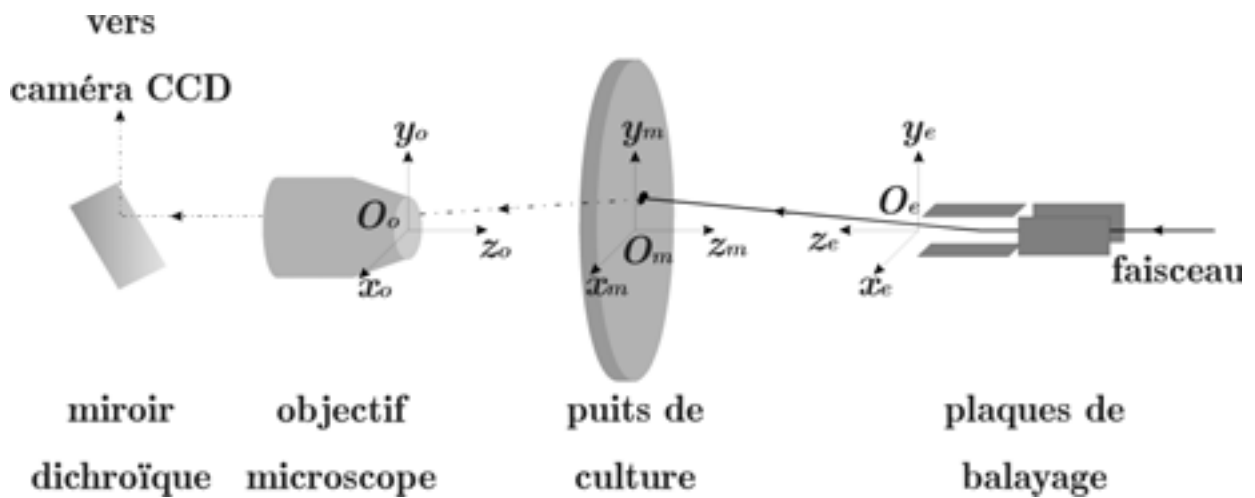


Fig. IV.28 : Les différents repères du dispositif. On distingue le repère  $\{O_e, x_e, y_e, z_e\}$ , lié au balayage électrostatique du faisceau, le repère  $\{O_m, x_m, y_m, z_m\}$ , lié au déplacement mécanique du puits d'irradiation contenant les cellules et le repère  $\{O_o, x_o, y_o, z_o\}$ , lié au champ de la caméra CCD.

En effet, les cibles sont repérées dans le repère du microscope et sont irradiées en positionnant soit le faisceau soit le manipulateur. Un système de coordonnées de référence est donc nécessaire. Ensuite, afin de pouvoir aligner les objets à irradier et le point d'extraction du faisceau, la position absolue du faisceau dans un repère de référence doit être déterminée. Les procédures d'étalonnage décrites ci-après permettent de réaliser ces opérations dans les deux modes de fonctionnement du dispositif.

### 2.2.1 Mode faisceau fixe

Dans ce mode de fonctionnement, les repères optique (champ du microscope) et mécanique (déplacement du manipulateur) sont utilisés pour l'irradiation. Les cibles sont localisées dans le repère optique et le manipulateur se déplace ensuite afin de positionner chaque cible devant le point de sortie du faisceau. La procédure comporte alors trois opérations successives.

#### 2.2.1.1 Corrélation des repères optique et mécanique

Afin d'établir une correspondance entre le repère optique (noté  $\{O_o, x_o, y_o\}$ ) et le repère mécanique (noté  $\{O_m, x_m, y_m\}$ ), la méthode utilisée est la suivante :

Un objet de référence (typiquement le collimateur du dispositif d'étalonnage) est fixé sur le manipulateur et est centré grossièrement dans le champ caméra par l'utilisateur. Le point choisi sera par ailleurs l'origine du repère mécanique. Le manipulateur est ensuite déplacé point par point sur un réseau rectangulaire dont l'utilisateur a défini le nombre de points avant en début de procédure. A chaque position, les coordonnées de l'objet de référence sont relevées dans le repère optique (grâce à une opération de reconnaissance de forme automatique) et dans le repère mécanique. Cette opération est illustrée sur la figure IV.29.

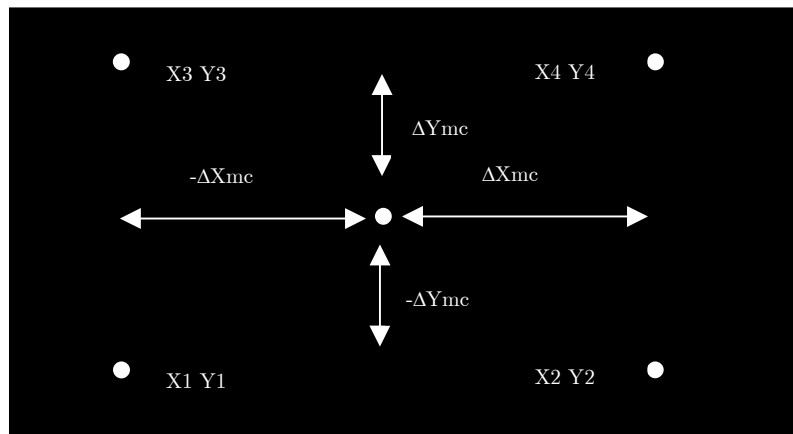


Fig. IV.29 : Procédure de corrélation des repères optique et mécanique. Les points blancs correspondent aux différentes positions du collimateur de référence éclairé en transmission. L'exemple représenté ici compte 4 points d'étalonnage. Un nombre de points plus important peut être choisi pour une meilleure précision.



Sur la figure IV.29, les coordonnées notées  $X_i, Y_i$  sont les coordonnées des points dans le repère optique et les valeurs  $\Delta X_{mc}, \Delta Y_{mc}$  sont les amplitudes des déplacements mécaniques effectués entre le point central (choisi arbitrairement) et les points d'étalonnage.

La correspondance entre les deux repères se calcule comme suit :

$$\begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix}_o = \begin{pmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix}_m + \begin{pmatrix} B_1 \\ B_2 \end{pmatrix}$$

Les coefficients  $A_{ij}$  et  $B_i$  sont les coefficients d'étalonnage calculés à partir des valeurs relevées précédemment.

$\begin{pmatrix} B_1 \\ B_2 \end{pmatrix}$  correspondent aux coordonnées de l'origine du repère mécanique dans le repère

optique  $x_o O_o y_o$

$\begin{pmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{pmatrix}$  est la matrice de rotation liant les deux repères.

Au cours de la procédure automatique d'étalonnage, les coefficients sont calculés deux fois. Ils le sont tout d'abord à l'aide des valeurs brutes relevées selon la procédure décrite ci-dessus. La taille du champ caméra, déterminée grossièrement en début d'expérience, est ensuite affinée en prenant comme base l'amplitude des déplacements mécaniques effectués. Enfin, les coefficients sont recalculés à partir des nouvelles valeurs des coordonnées optiques.

Le repère mécanique est considéré par la suite comme le repère de référence. Toutes les coordonnées nécessaires à l'irradiation seront converties pour être exprimées dans ce repère.

### 2.2.1.2 Extraction du faisceau

Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 1.1.2, le mode de fonctionnement en faisceau fixe est imposé par la présence, en entrée du détecteur à gaz, d'un collimateur de 10  $\mu\text{m}$ . Pour extraire les ions à l'air à travers ce détecteur, il est indispensable d'aligner la trajectoire du faisceau et le centre de ce collimateur. Plutôt que de positionner mécaniquement le détecteur afin de placer son collimateur d'entrée sur la trajectoire des ions, il a été choisi de positionner le faisceau à l'aide des plaques de balayage électrostatiques, ce qui plus précis. Pour cela, il est nécessaire de connaître la position du centre du collimateur d'entrée dans le repère du faisceau.

Cette position est déterminée grâce à la procédure de recherche automatique présentée au paragraphe 2.1.3. Une fois les coordonnées de ce collimateur connues, le faisceau sera maintenu dans cette position pour toute opération d'étalonnage ultérieure et pendant l'irradiation.

### *2.2.1.3 Détermination de la position absolue du faisceau*

Une fois que le repère de référence est établi et que le faisceau passe à travers le détecteur, la position du point d'extraction des particules doit être déterminée dans ce repère de référence.

Cette procédure utilise le dispositif d'étalonnage décrit au paragraphe 1.5. Elle comporte deux sous-étapes :

- Le positionnement du collimateur d'étalonnage en face du point de sortie du faisceau. Pour ce faire, une procédure de recherche automatique de position avec balayage mécanique du collimateur devant le faisceau est utilisée.
- Une fois ce collimateur positionné, le taux de comptage en transmission sur la diode PIN peut être vérifié et comparé à celui du détecteur en transmission afin de contrôler le bon alignement. La diode PIN est ensuite escamotée et la position du collimateur dans le repère optique est déterminée en l'éclairant en transmission.

Cette étape est la plus sensible de la procédure, une erreur de localisation du faisceau se répercute intégralement par un décalage systématique du faisceau par rapport aux cibles lors de l'irradiation.

### *2.2.2 Mode faisceau balayé*

Dans ce mode de fonctionnement, les trois repères (optique, mécanique et électrostatique) sont utilisés au cours de l'irradiation. En effet, chaque champ de microscope est visualisé en positionnant le manipulateur et les cellules sont ensuite irradiées à l'intérieur du champ en cours en positionnant le faisceau.

Les coefficients corrélant les trois repères sont donc indispensables.

Deux méthodes de détermination de ces coefficients ont été implémentées.

### 2.2.2.1 Méthode utilisant un quartz luminescent

Lorsque cette option d'étalonnage est utilisée, les coefficients liant les repère optique et mécanique, notés  $\{A_{i,j}^{om}; B_i^{om}\}$ , et ceux liant les repères optique et électrostatique, notés  $\{A_{i,j}^{oe}; B_i^{oe}\}$  sont déterminés.

Les  $\{A_{i,j}^{om}; B_i^{om}\}$  sont calculés en employant la même méthode que celle décrite dans le paragraphe 2.2.1.1. Les dimensions du champ microscope sont également affinées.

Les  $\{A_{i,j}^{oe}; B_i^{oe}\}$  sont déterminés selon le même principe en positionnant le faisceau en différents points du quartz luminescent et en relevant les positions des points lumineux dans le repère optique. En suivant la même méthode que pour les dimensions du champ de la caméra, les coefficients de balayage mentionnés au paragraphe 2.1.3 sont également affinés.

### 2.2.2.2 Méthode utilisant un collimateur

Une deuxième méthode permettant de ne pas passer par la visualisation du faisceau sur un quartz luminescent a été mise à disposition de l'utilisateur. Lorsque cette méthode est choisie, les coefficients liant les repère optique et mécanique, notés  $\{A_{i,j}^{om}; B_i^{om}\}$ , et ceux liant les repères mécanique et électrostatique, notés  $\{A_{i,j}^{me}; B_i^{me}\}$ , sont déterminés.

La méthode de calcul des  $\{A_{i,j}^{om}; B_i^{om}\}$  est identique à celle décrite précédemment.

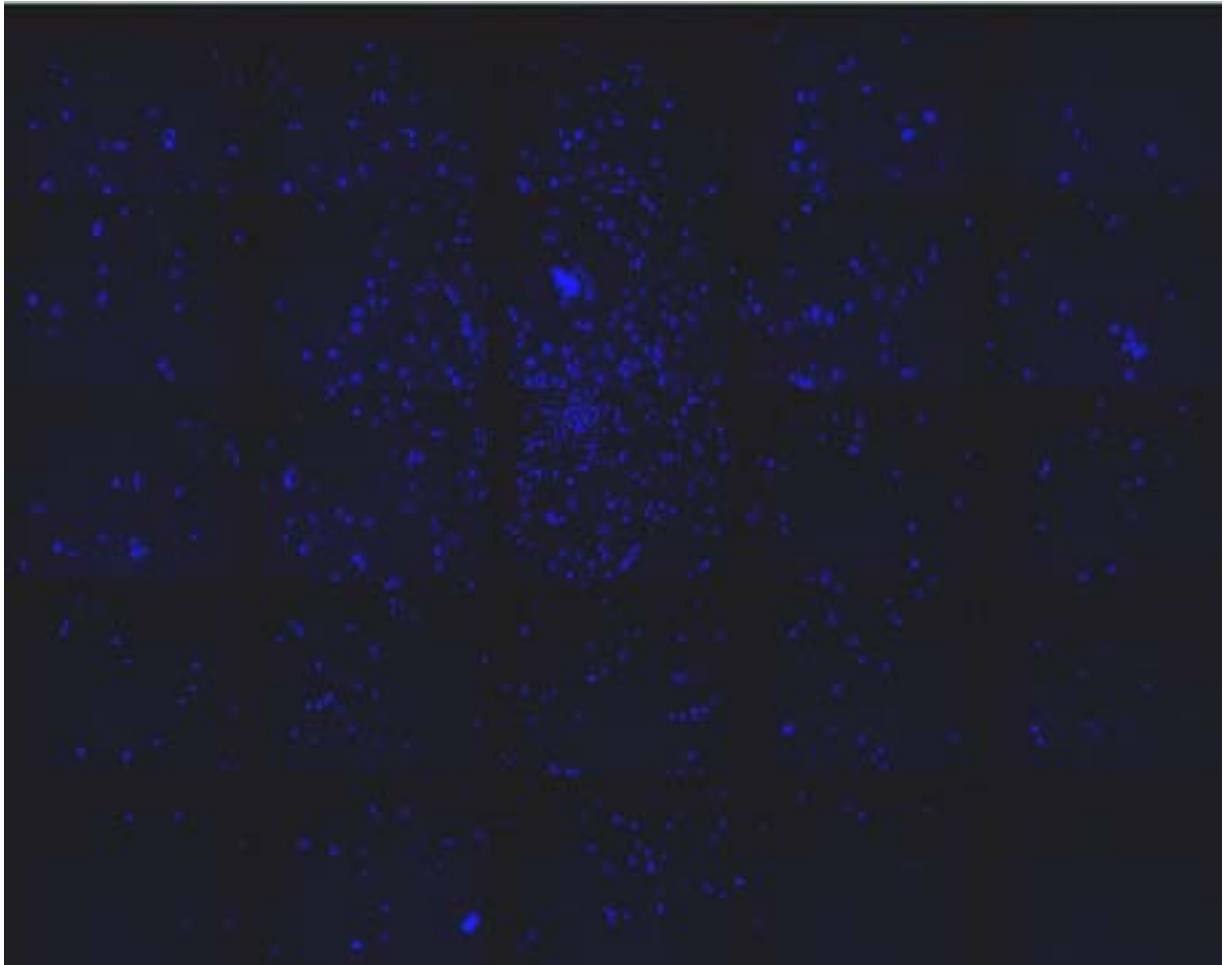
Les  $\{A_{i,j}^{me}; B_i^{me}\}$  sont déterminés de la manière suivante :

Le manipulateur est positionné à différentes positions décrivant un réseau rectangulaire. Pour chaque position mécanique, une recherche automatique de position du collimateur fixé sur le manipulateur est effectuée en balayant le faisceau. Pour chaque point d'étalonnage les positions exprimées dans le repère mécanique et dans le repère électrostatique sont relevées. Les coefficients  $\{A_{i,j}^{me}; B_i^{me}\}$  sont finalement calculés et les valeurs des coefficients de balayage affinées.

### 3. Les procédures d'irradiation

#### 3.1 La mosaïque

La taille d'un champ de microscope étant inférieure à la taille de l'échantillon, une mosaïque composée de plusieurs de ces champs doit être constituée. Cet outil permet notamment à l'utilisateur de sélectionner les zones d'intérêt (contenant les cellules à irradier) et de rejeter les zones de l'échantillon ne contenant pas de cellules (fig. IV.30).



*Fig. IV.30 : Exemple de mosaïque 5×5 champs (4800×3850 μm). 2500 cellules ont étéensemencées ; les noyaux cellulaires sont marqués avec du colorant Hoechst 33342.*

Chaque cellule adhérente sur le support de culture est localisée par un ensemble de coordonnées (fig. IV.31):

- Les coordonnées  $\{X_{Champ}; Y_{Champ}\}$  du champ considéré dans le repère mécanique.
- Les coordonnées  $\{x_{opt}; y_{opt}\}$  du barycentre de la cellule dans le repère optique (déterminées par la reconnaissance de forme).
- Les coordonnées  $\{x_{irr}; y_{irr}\}$  du barycentre de la cellule dans le repère d'irradiation (mécanique ou électrostatique).

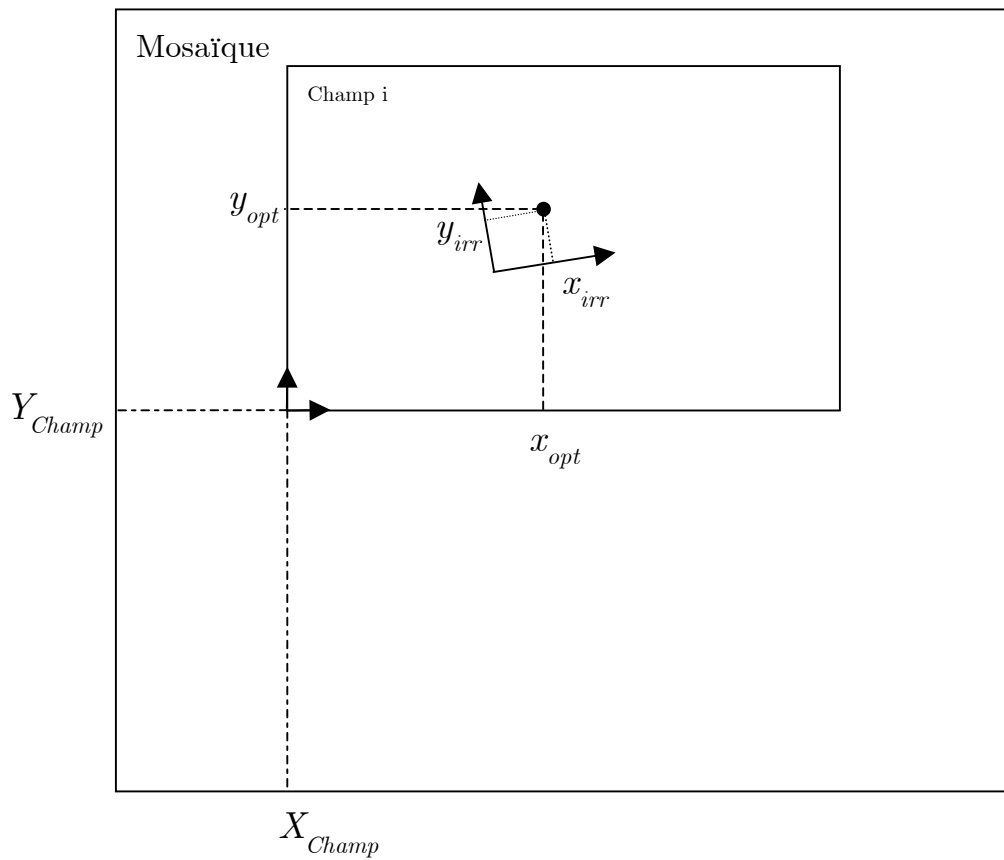


Fig. IV.31 : Repérage des cibles dans la mosaïque. Les couples de coordonnées  $\{x_{opt}; y_{opt}\}$  et  $\{x_{irr}; y_{irr}\}$  sont liés par les coefficients d'étalonnage.  $\{X_{Champ}; Y_{Champ}\}$  sont lues directement sur le codeur de l'ESP300.

### **3.2 Irradiation manuelle directe**

Dans cette configuration, l'utilisateur marque lui-même les cellules à irradier. Pour cela, un simple marquage souris sur l'image acquise, affichée à l'écran, provoque l'alignement du faisceau avec les coordonnées du point marqué. Cette fonctionnalité est également utilisée en fin d'irradiation automatique ou semi-automatique pour l'irradiation des cellules ayant échappé à la reconnaissance automatique. L'étude de certains phénomènes (tel que l'effet bystander), qui passe par l'irradiation sélective de quelques cellules parmi une population, requiert ce genre d'outils. Pour des études passant par un grand nombre de cellules à irradier, des procédures automatisées s'avèrent cependant indispensables.

### **3.3 Irradiation semi-automatique**

Au cours de cette procédure, l'utilisateur prend en charge le choix des champs à irradier. Une fois un champ sélectionné (par un marquage souris du champ correspondant de la mosaïque), l'amélioration de l'image et la reconnaissance des cibles en présence s'effectuent automatiquement. Si l'utilisateur est satisfait, il peut alors exécuter une irradiation automatique de toutes les cibles de ce champ. En revanche, si la reconnaissance automatique des cibles n'est pas satisfaisante, l'utilisateur peut ajuster les paramètres de traitement d'images et relancer une reconnaissance automatique. En fin d'irradiation, l'utilisateur peut revenir en mode « irradiation directe » afin de valider manuellement les cellules non reconnues automatiquement.

### **3.4 Irradiation automatique**

Les études de radiobiologie à l'échelle cellulaire requièrent souvent l'irradiation d'un grand nombre de cellules. Une procédure d'irradiation entièrement automatique a donc été développée :

Avant de lancer l'irradiation automatique, l'utilisateur visualise la mosaïque et peut invalider les champs ne contenant pas de cellule. Une fois cette opération de repérage effectuée, l'irradiation peut débuter. Tous les champs (validés) d'une ligne de la mosaïque sont photographiés et les coordonnées des objets reconnus dans chaque champ sont stockées. Une fois toutes les cibles de cette ligne reconnues, les champs correspondants sont revisités et les cibles sont irradiées automatiquement. Ce

fonctionnement ligne par ligne a été adopté afin d'éviter de couper l'alimentation des photomultiplicateurs lors de l'ouverture de l'obturateur UV pour l'acquisition d'image sur chaque champ.

En fin d'irradiation, le programme signale à l'utilisateur la présence d'objets reconnus mais non irradiés en raison de leur taille excessive. L'utilisateur peut alors revisiter les champs afin d'irradier manuellement les cibles non reconnues.

#### **4. Conclusion**

Grâce aux aménagements techniques présentés ici, la microsonde nucléaire du CENBG peut être utilisée pour l'irradiation à pression atmosphérique. Comme nous venons de le voir, le contrôle d'une ligne microfaisceau focalisée nécessite une phase d'étalonnage complexe qui n'est pas forcément nécessaire pour les dispositifs collimatés. En effet, la position du collimateur de sortie de ligne est fixe dans ce cas là et la référence faisceau aisée à déterminer. Cependant, une limite théorique de résolution spatiale, due à la diffusion sur le bord du collimateur, restreint les performances que l'on peut attendre de ce genre de dispositif.

Le développement d'outils de contrôle spécifiques et d'un étalonnage automatique a constitué l'une des principales difficultés de la mise au point de ce dispositif. Cependant, ce n'est qu'à ce prix que des durées d'irradiation raisonnables pourront être atteints.

Les tests et la validation de ce dispositif seront présentés au chapitre suivant.





**Chapitre V**

**VALIDATION DU DISPOSITIF**

**ET**

**RESULTATS EXPERIMENTAUX**



La résolution d'un système d'irradiation ion par ion à l'échelle cellulaire doit être inférieure à la taille d'un noyau cellulaire (i.e. 10  $\mu\text{m}$ ). Le dispositif doit être capable de délivrer un nombre exact de particules sur cible, aligner l'axe du faisceau et la cible avec une précision de l'ordre du micromètre et générer le moins de stress possible pour les cellules en dehors de l'irradiation proprement dite.

Ces divers points ont été testés. Nous présenterons ici les performances du dispositif tout d'abord en termes de résolution spatiale après extraction à l'air et de contrôle du nombre d'ions délivrés sur cible. Nous montrerons ensuite les résultats obtenus concernant la précision globale du système. Enfin, les protocoles de culture utilisés et les premières irradiations sur des lignées cellulaires seront présentés.

## 1. Performances du dispositif

### 1.1 Résolution spatiale et taille du faisceau

Le terme de résolution spatiale d'un microfaisceau d'ions renvoie généralement à la largeur à mi-hauteur ( $\text{FWHM} = 2.354\sigma$ ,  $\sigma$  étant l'écart type) de la distribution spatiale gaussienne des particules dans le plan transverse. Cette définition est tout à fait adaptée à la description des performances d'un microfaisceau lorsqu'il est utilisé pour faire de l'imagerie à haut flux. Les quelques pour cent des particules assez loin de l'axe du faisceau ne génèrent qu'un faible « halo » qui ne dégrade pas la qualité de l'image. Lorsque les ions du faisceau sont répartis selon une distribution gaussienne, seulement 76.1% d'entre eux traversent une surface circulaire ayant pour diamètre la largeur à mi-hauteur de cette distribution (figure V.1). Si le microfaisceau est utilisé pour des irradiations à l'échelle cellulaire avec un nombre exact d'ions, chaque ion atteignant la cible doit être pris en compte. La taille totale du faisceau sur cible est alors le paramètre rendant le mieux compte des performances du dispositif.

Comme illustré sur la figure V.1, 99.7 % des événements répartis selon une distribution gaussienne sont compris dans un intervalle  $[\mu - 3\sigma, \mu + 3\sigma]$ ,  $\mu$  étant la valeur moyenne de la distribution et  $\sigma$  son écart type. La taille totale du faisceau correspond donc à une largeur de  $6\sigma$ , soit  $2.549 \times \text{FWHM}$ .

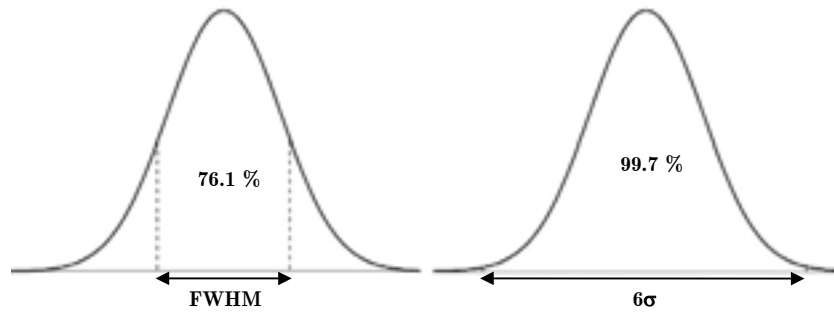


Fig. V.1 : Aires de distributions gaussiennes sur plusieurs intervalles d'intégration. Des événements obéissant à cette loi de distribution ont environ une chance sur quatre d'être en dehors d'un intervalle correspondant à la largeur à mi-hauteur centré sur la moyenne. La quasi totalité des événements sont compris dans un intervalle de largeur  $6\sigma$  centré sur la valeur moyenne.

## 1.2 Mesures de la résolution du microfaisceau

La mesure de la taille du faisceau au niveau de la cible a été réalisée de deux manières. Tout d'abord par l'acquisition de cartographie en transmission sur des grilles de microscopie (cf. chapitre II).

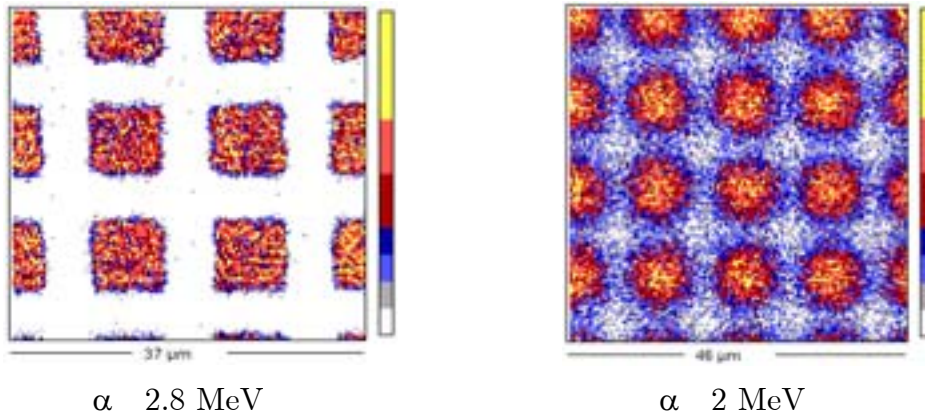
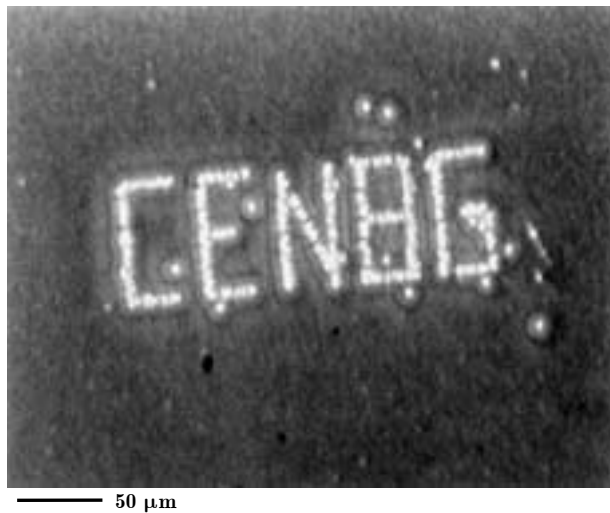
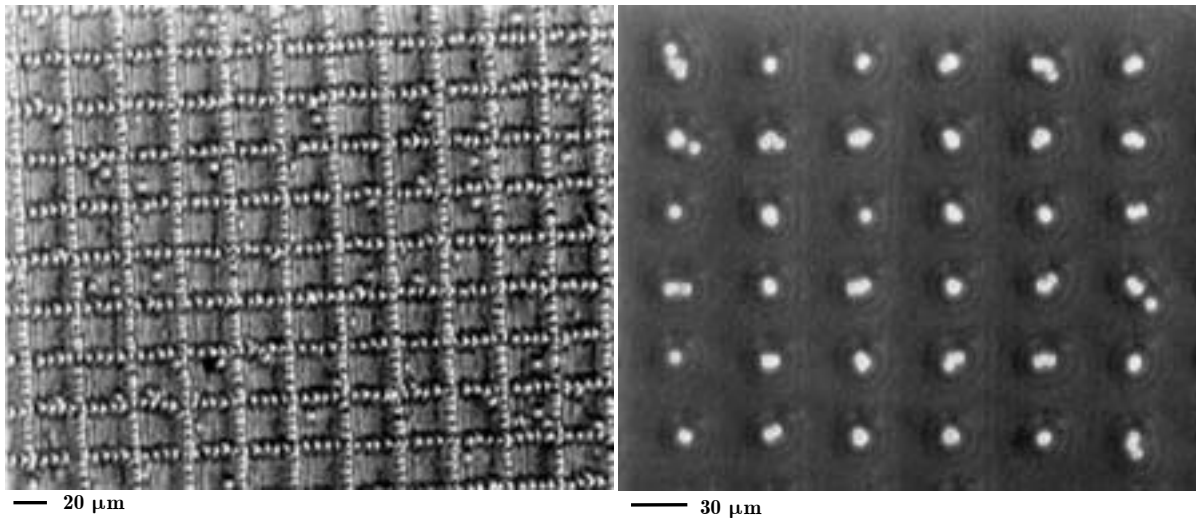


Fig. V.2 : Cartographies obtenues par la méthode STIM sur une grille de microscopie sous vide (à gauche) et après extraction à travers une fenêtre de  $Si_3N_4$  de 150 nm (à droite). Le motif de la grille a une largeur de  $12.7 \mu m$ . Dans ce cas la largeur à mi-hauteur est de  $0.9 \mu m \pm 0.1 \mu m$  sous vide et  $2.95 \mu m \pm 0.4 \mu m$  à l'air, ce qui correspond à des dimensions totales de faisceau de  $2.3 \mu m \pm 0.2 \mu m$  et  $7.5 \mu m \pm 1 \mu m$  respectivement. A l'air, la grille était situé à  $300 \mu m$  de la fenêtre d'extraction.

La deuxième méthode utilisée est l'implantation des ions dans des détecteurs solides de traces (type CR39). Ces détecteurs se présentent sous la forme de feuilles de polymère solides de 500 micromètres d'épaisseur. Le passage d'une particule chargée dans ce polymère fragilise la structure de celui-ci tout au long de la trace. Après une attaque chimique à l'hydroxyde de potassium (KOH ; 12 mol/l à 80°C pendant 15 minutes), le point d'impact de chaque ion est visible en microscopie par contraste de phase (figure V.3).



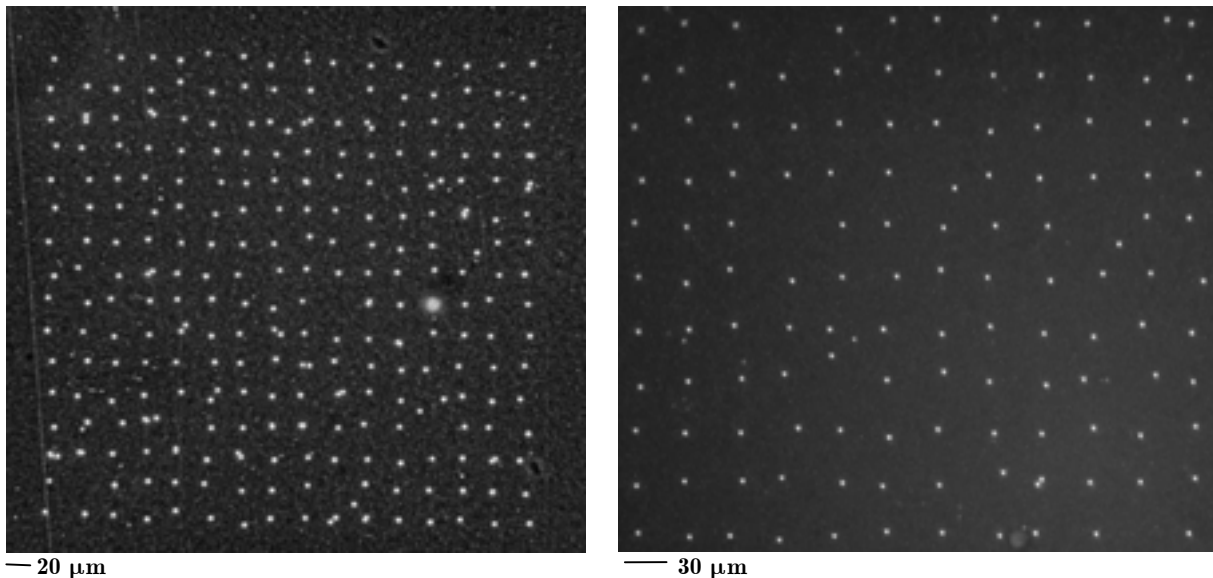
*Fig. V.3 : Tests de résolution sur détecteurs de traces. Les deux gravures de gauche ont été réalisées avec des particules  $\alpha$  de 2.5 MeV sous vide. La gravure de droite a été réalisée avec des particules  $\alpha$  de 2 MeV extraites à l'air à travers une fenêtre de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  de 150 nm d'épaisseur. La feuille de CR39 était située à 300  $\mu\text{m}$  de la fenêtre de sortie. Sur la gravure à l'air, le faisceau a été*

*positionné sur chaque point une durée suffisante pour que trois ions en moyenne soient implantés. Dans les deux cas le faisceau est positionné à l'aide des plaques de balayage.*

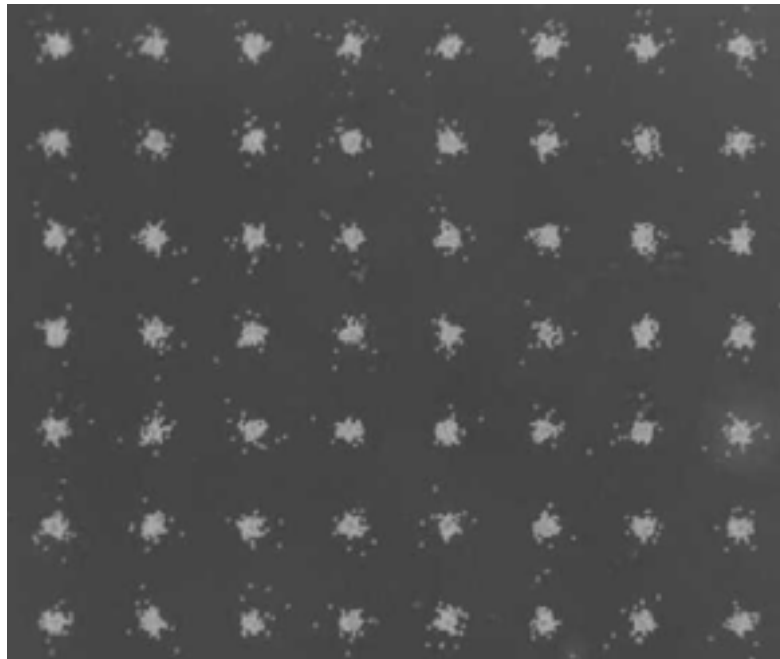
### 1.3 Contrôle du nombre d'ions délivrés

Afin d'évaluer l'efficacité du contrôle de la ligne microfaisceau en mode ion par ion, nous avons implanté des ions isolés selon un réseau régulier dans des détecteurs solides de traces. Cette méthode permet de visualiser chaque particule extraite à l'air à travers le détecteur en transmission. Les deux détecteurs utilisés ont été testés de cette manière (figure V.4).

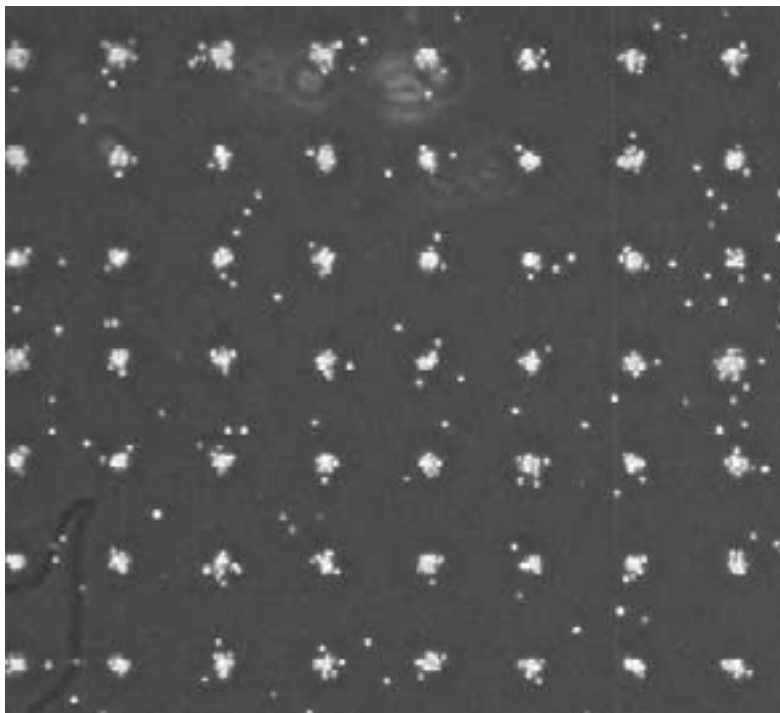
En utilisant cette technique, il est possible de déterminer la taille totale du faisceau en implantant un grand nombre d'ions à chaque position du réseau régulier (figure V.5). Les ailes de diffusion entourant la distribution gaussienne centrale et les particules diffusées sur les bords des collimateurs de la ligne apparaissent également, en général assez loin des positions ciblées.



*Figure V.4 : Implantation d'ions isolés sur détecteur de traces. La gravure de gauche à été réalisée en mode faisceau balayé avec des protons de 3 MeV extraits à travers la feuille de scintillateur. L'écart entre les points du réseau est de 20  $\mu\text{m}$ . Dans ce cas, 1.6 % des points du réseau n'ont pas reçu de particule et on recense 6 % de double impacts. La gravure de droite à été réalisée en mode faisceau fixe avec des particules  $\alpha$  de 3 MeV extraites à travers le détecteur à gaz. L'écart entre les points du réseau est de 30  $\mu\text{m}$ . Dans ce cas, 2.3 % des points du réseau n'ont pas reçu de particule et on recense moins de 1 % de double impacts.*



40  $\mu\text{m}$



40  $\mu\text{m}$

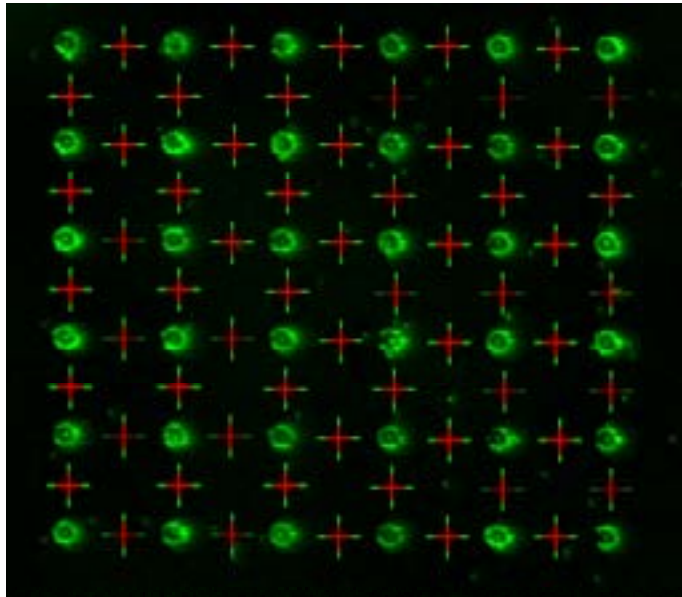
*Fig. V.5 : Test de résolution sur détecteur de traces. La gravure du haut a été réalisée en mode faisceau fixe avec des particules  $\alpha$  de 3 MeV extraites à travers le détecteur à gaz. 100 particules ont été implantées tous les 40  $\mu\text{m}$ . Dans ce cas, 95 % des ions sont localisés dans un cercle de diamètre 10  $\mu\text{m}$ . La gravure du bas a été réalisée en mode faisceau balayé avec des protons de 2.8 MeV extraits à travers la feuille de scintillateur. 100 protons ont été implantés tous les 40  $\mu\text{m}$ . Dans ce cas, 95 % des ions sont localisés dans un cercle de diamètre 7.5  $\mu\text{m}$*

## 1.4 Précision globale

La précision globale du système d'irradiation reflète sa capacité à aligner l'axe du faisceau et le barycentre de chaque objet cible. Cette précision dépend de plusieurs paramètres :

- La précision du système de microscopie et de reconnaissance de forme
- La précision du système de positionnement mécanique
- La précision du système de positionnement du faisceau

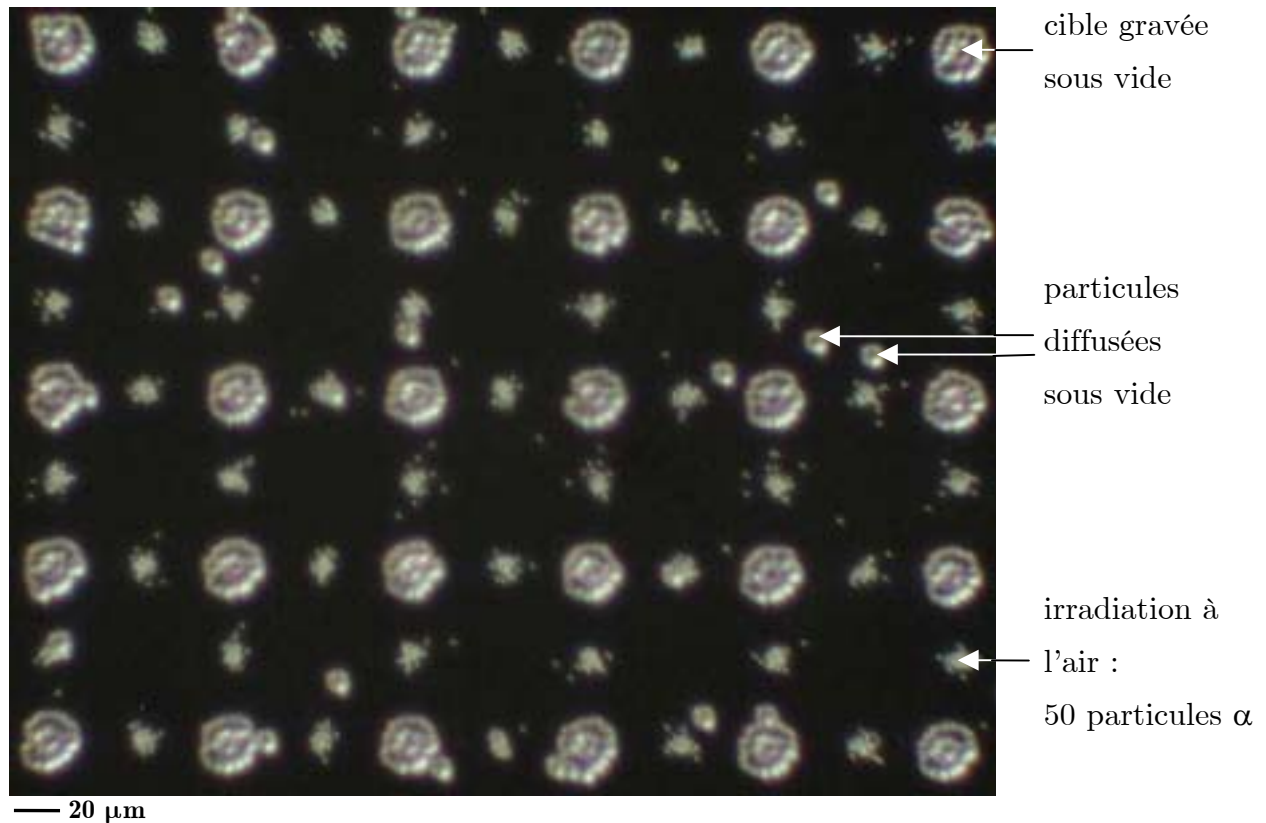
Afin de mesurer la précision globale du dispositif nous avons utilisé la méthode décrite dans la référence [75]. Des particules  $\alpha$  ont tout d'abord été implantées sous vide dans une feuille de détecteur de traces selon des motifs circulaires régulièrement espacés. Ces motifs ont été révélés une première fois par attaque chimique. Ce détecteur de trace a ensuite été placé sur le porte-échantillon, les motifs circulaires révélés pouvant ainsi servir de références optiques pour une irradiation ciblée (figure V.6).



*Fig.V.6 : Visualisation de cercles révélés sur CR39 avec le microscope de la chambre d'irradiation. Le diamètre des cercles est de  $20\ \mu\text{m}$  après révélation, l'écart entre deux cercles est de  $80\ \mu\text{m}$ . Les croix vertes désignent les positions calculées automatiquement entre deux cercles adjacents. Les croix rouges désignent les points effectivement irradiés.*



Des ions sont ensuite implantés à mi-distance entre les cercles afin de distinguer leurs traces de celles précédemment révélées. La plaquette est finalement révélée une seconde fois (figure V.7).



*Fig.V.7 : Détermination de la précision globale d'irradiation. 50 particules  $\alpha$  de 3 MeV ont été implantées à mi-distance entre deux cercles adjacents. La distance entre les cercles est de 80  $\mu\text{m}$ . 13 particules diffusées sur les bords de collimateurs lors de la première implantation sous vide apparaissent. Comme les traces constituant les cercles, celles-ci ont été révélées deux fois et sont par conséquent plus larges. Ce test a été effectué en mode faisceau fixe à travers le détecteur à gaz.*

Le test présenté sur la figure V.7 permet d'estimer à la fois la taille totale du faisceau à son arrivée sur la cible et la précision globale d'irradiation. Dans le cas d'un faisceau fixe traversant le détecteur à gaz (particules  $\alpha$  ou protons), nous avons déterminé que 95 % des ions étaient confinés dans un cercle de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre sur cible. Une précision globale de  $\pm 2 \mu\text{m}$  a été mesurée.

Le système d'irradiation en mode faisceau fixe a été développé en priorité en raison des premières applications envisagées (voir paragraphe 2) qui nécessitent surtout

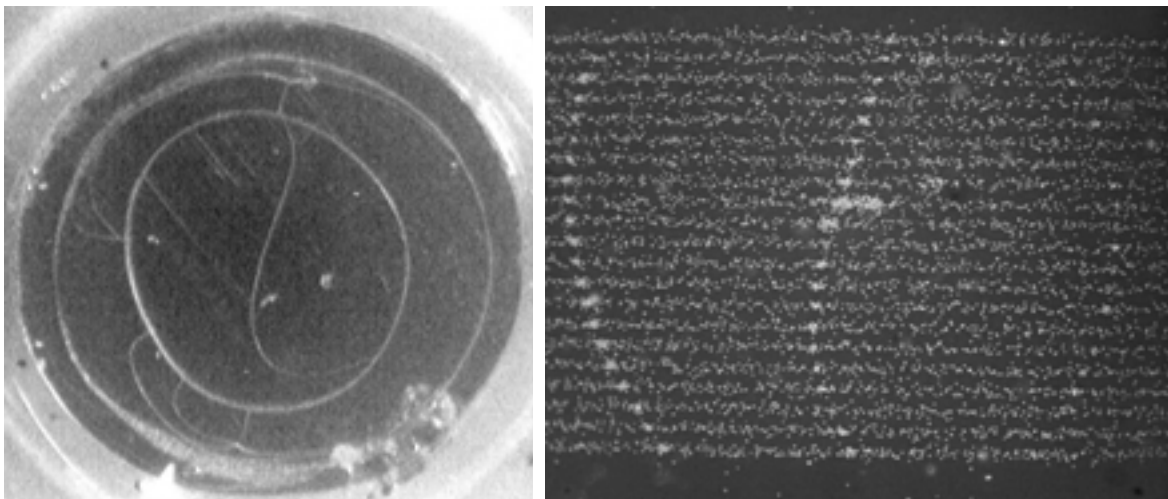
l'utilisation de particules  $\alpha$ . En outre, le détecteur à gaz présente l'avantage de fonctionner avec les deux types de particules. La précision globale n'a pas encore été mesurée dans le mode faisceau balayé basé sur le détecteur à scintillation. Des difficultés expérimentales, spécifiques à l'utilisation de ce détecteur, ont en effet compliqué le développement de ce mode de fonctionnement.

## 1.5 Difficultés expérimentales

Au cours de la phase de test du dispositif sous faisceau, et notamment lors de l'utilisation du détecteur à scintillation, un certain nombre de difficultés expérimentales sont apparues. Nous allons ici détailler les deux principales.

### 1.5.1 *Délaminage de la feuille de scintillateur*

Après plusieurs mises sous vide, la fenêtre de BC400<sup>®</sup> a tendance à se détériorer sous l'effet des contraintes mécaniques. La pression différentielle appliquée (1 atmosphère) provoque un délaminage du scintillateur (fig. V.8).



*Fig. V.8 : Problèmes de tenue mécanique de la feuille de scintillateur. La photo de gauche montre la feuille après plusieurs mises sous vide. Une détérioration de la fenêtre due aux contraintes mécaniques apparaît clairement. La photo de droite montre une implantation de protons dans du CR39. Le nombre d'ions sur cible était contrôlé par le scintillateur. Les impacts sont espacés de 2  $\mu\text{m}$  horizontalement et 20  $\mu\text{m}$  verticalement. Un plus grand nombre d'ions a été implanté à l'endroit des défauts, prouvant ainsi une baisse locale de l'efficacité de détection.*

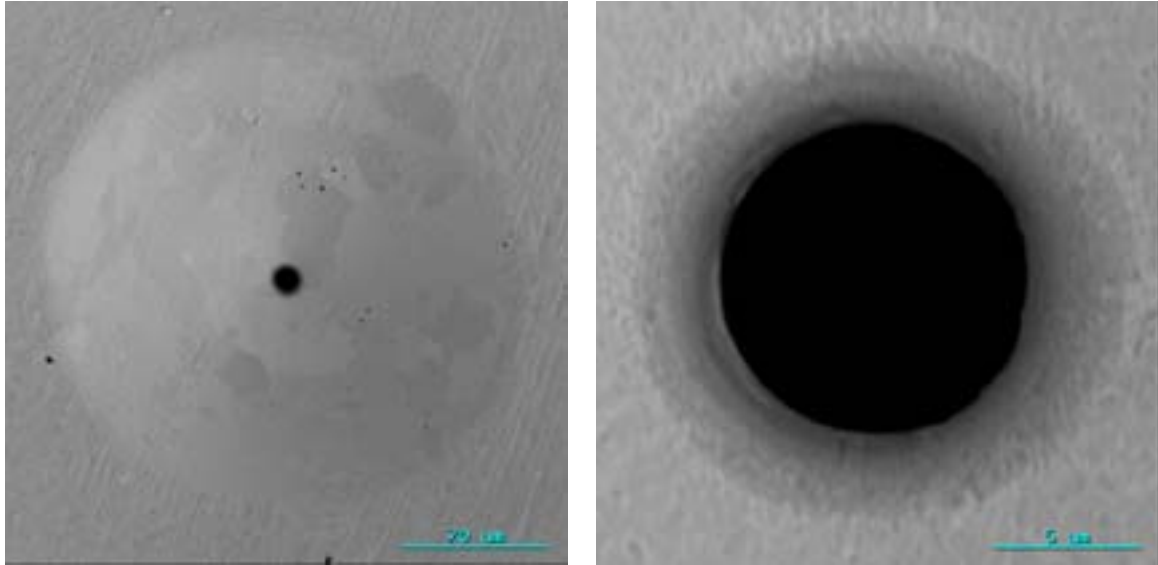
Pour résoudre ce problème, il est envisagé de soutenir la feuille de scintillateur à l'aide d'une feuille de Mylar<sup>®</sup> de 1.5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Ce polymère est en effet beaucoup plus résistant que le BC400<sup>®</sup>. Des tests de tenue mécanique au vide ont été effectués avec succès. L'efficacité de cette configuration de détection reste à tester sous faisceau.

### **1.5.2 Diffusion sur les bords de collimateurs**

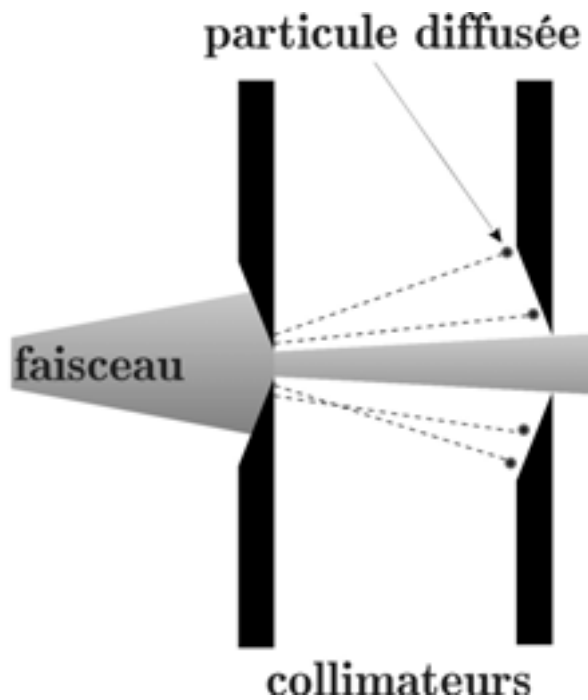
L'observation d'un collimateur similaire à ceux utilisés sur la ligne de faisceau (collimateur objet et diaphragme d'ouverture) en microscopie électronique (fig V.9) a révélé une géométrie en forme de double cônes imbriqués (fig. V.11a). Les particules du faisceau peuvent traverser les bords de ces collimateurs là où ils sont le plus mince (fig. V.11b et V.11c). C'est le cas notamment pour les protons qui ont un pouvoir de pénétration dans la matière supérieur aux particules  $\alpha$ . Ces ions adoptent ensuite des trajectoires aberrantes dans l'optique de focalisation et arrivent sur la cible à des positions aléatoires.

Lorsque le détecteur à gaz est utilisé, ce phénomène n'est pas problématique. En effet, les particules diffusées sont stoppées par le collimateur d'entrée. En revanche, lorsque le détecteur en transmission permet le passage des ions sur une surface importante, comme c'est le cas pour le scintillateur, les ions atteignent effectivement la cible.

La construction d'un dispositif anti-diffusion (« anti-scattering »), constitué de deux collimateurs successifs (figure V.10) permettant de s'affranchir des particules diffusées, est envisagée. Certaines lignes collimatées sont équipées de tels dispositifs [38].



*Fig. V.9 : Images d'un collimateur de 10  $\mu\text{m}$  obtenu par microscopie électronique. On distingue le cône le plus large (diamètre  $\sim 200 \mu\text{m}$ ) sur l'image de gauche. Le deuxième cône (diamètre 15  $\mu\text{m}$ ) est visible sur l'image de droite.*



*Fig. V.10 : Principe d'un dispositif anti-diffusion. Les particules diffusées sur les bords du premier collimateur sont stoppées dans le second. L'espacement entre les deux collimateurs et l'ouverture du second sont choisis en fonction de la divergence du faisceau.*

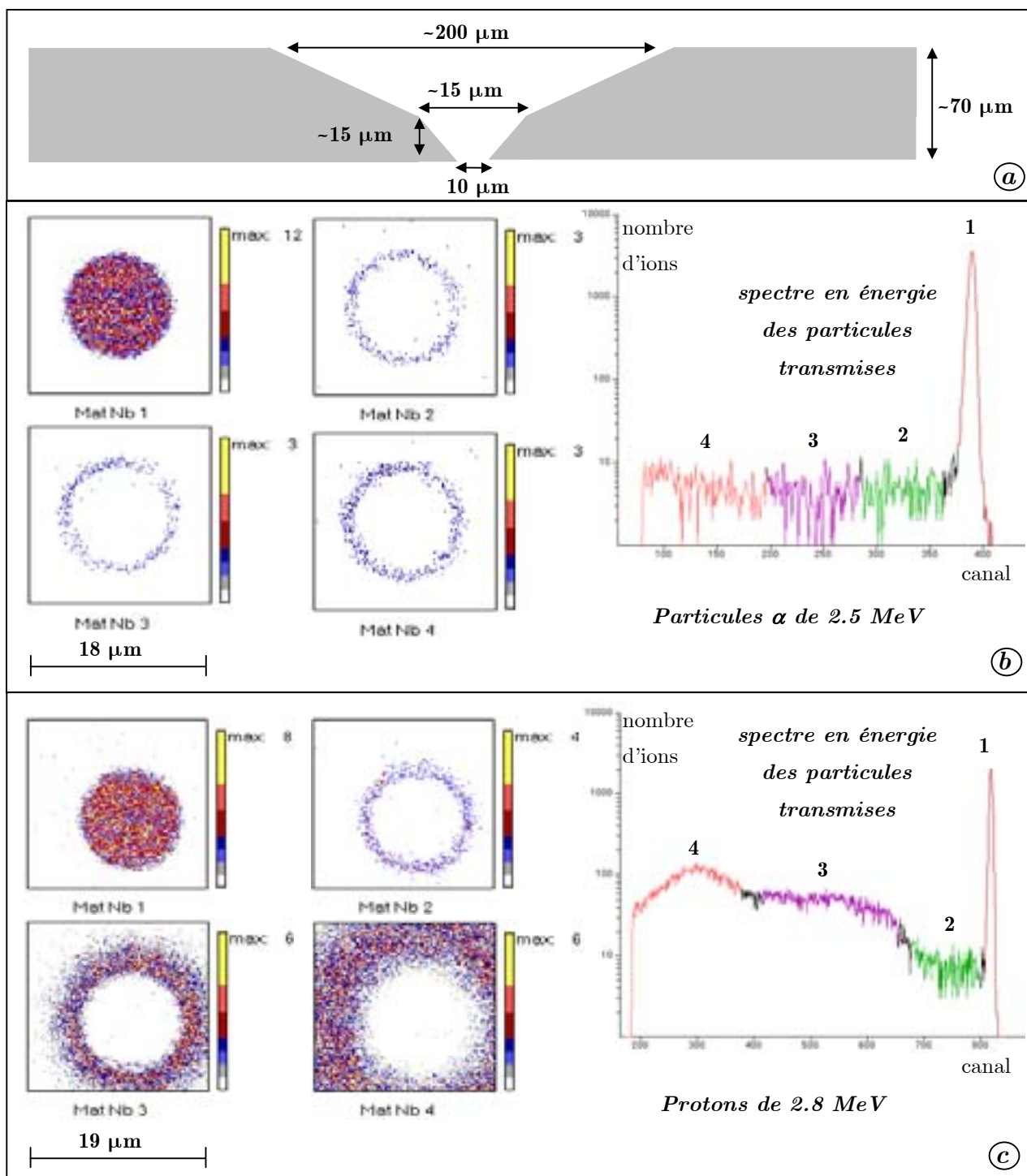


Fig. V.11 : Distribution des ions transmis à travers un collimateur de platine iridié de diamètre  $10\ \mu\text{m}$  similaire aux collimateurs utilisés sur la ligne microfaisceau (b et c). Ce type de collimateur présente une géométrie composée de deux cônes imbriqués. Cette structure est schématisée sur la figure a. Les protons traversent le collimateur jusqu'à  $20\ \mu\text{m}$  du centre de celui-ci. Les particules  $\alpha$ , quant à elles, sont beaucoup moins sujettes à ce phénomène.

Nous avons implémenté la géométrie du collimateur décrite sur la figure V.11a dans GEANT4 afin de reproduire les distribution observées expérimentalement [70]. La figure V.12 montre un exemple des résultats obtenus dans le cas de protons de 2.8 MeV.

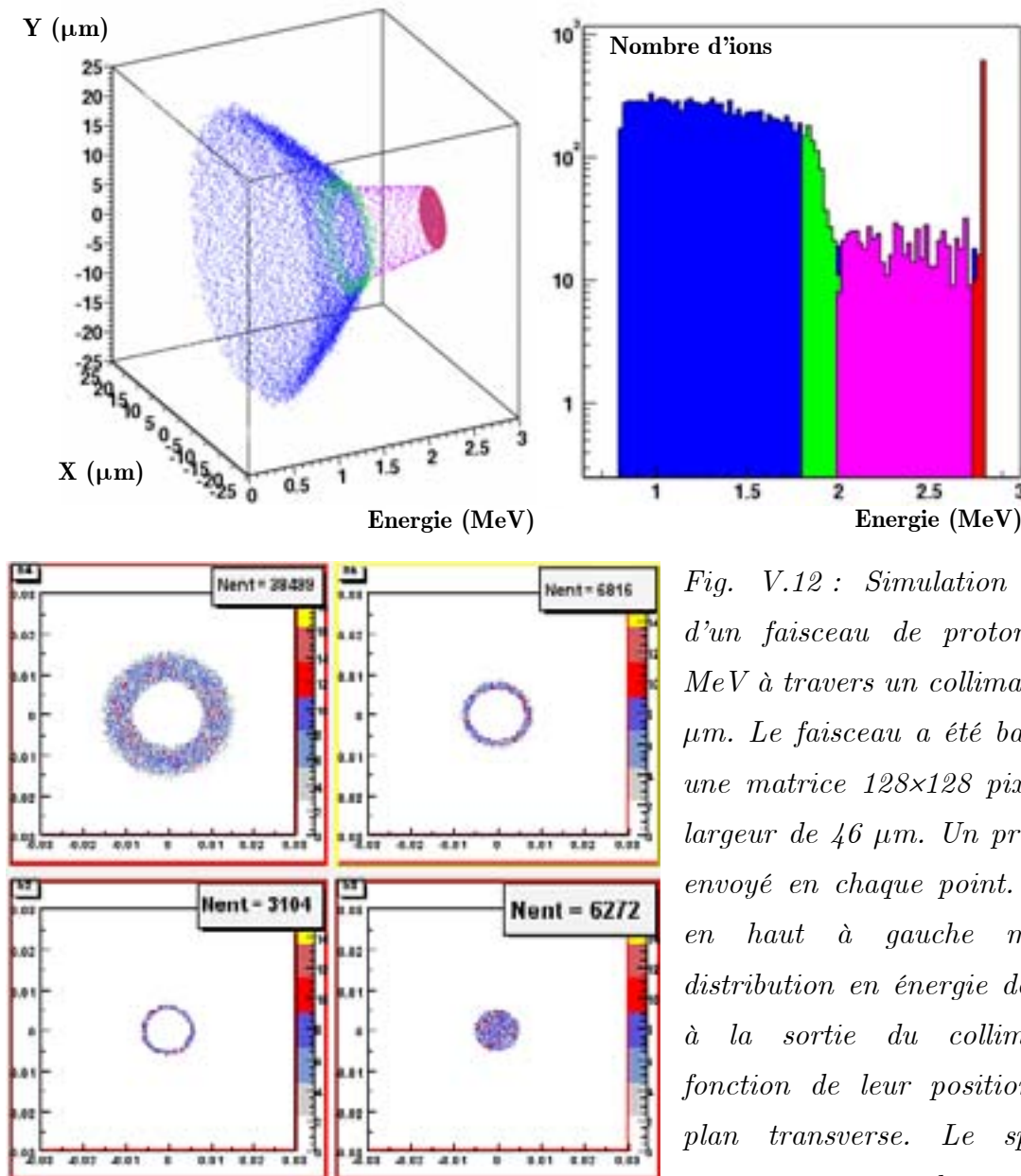


Fig. V.12 : Simulation GEANT4 d'un faisceau de protons de 2.8 MeV à travers un collimateur de 10  $\mu\text{m}$ . Le faisceau a été balayé selon une matrice  $128 \times 128$  pixels, d'une largeur de 46  $\mu\text{m}$ . Un proton a été envoyé en chaque point. La figure en haut à gauche montre la distribution en énergie des protons à la sortie du collimateur en fonction de leur position dans le plan transverse. Le spectre en énergie correspondant est montré

sur la figure de droite. Les quatre fenêtrages en énergie correspondent sont les mêmes sur les deux figures. Les distributions en position et en énergie du faisceau primaire étaient gaussien avec des écarts types de 3 keV et 0.425  $\mu\text{m}$  respectivement. La figure en bas à gauche montre les distributions des ions dans le plan transverse. Le balayage est également de 46  $\mu\text{m}$  et 10 protons ont été délivrés en chaque pixel. Sur les 163840 protons délivrés, seulement 54691 traversent le collimateur.

Les résultats obtenus par simulation ne reproduisent qu'approximativement les résultats expérimentaux, en raison notamment des approximations introduites lors de la modélisation de la géométrie du collimateur. En effet, le profil en épaisseur d'un tel collimateur semble plus complexe que celui utilisé dans la simulation. La microscopie électronique ne permet pas de mesurer précisément ce profil.

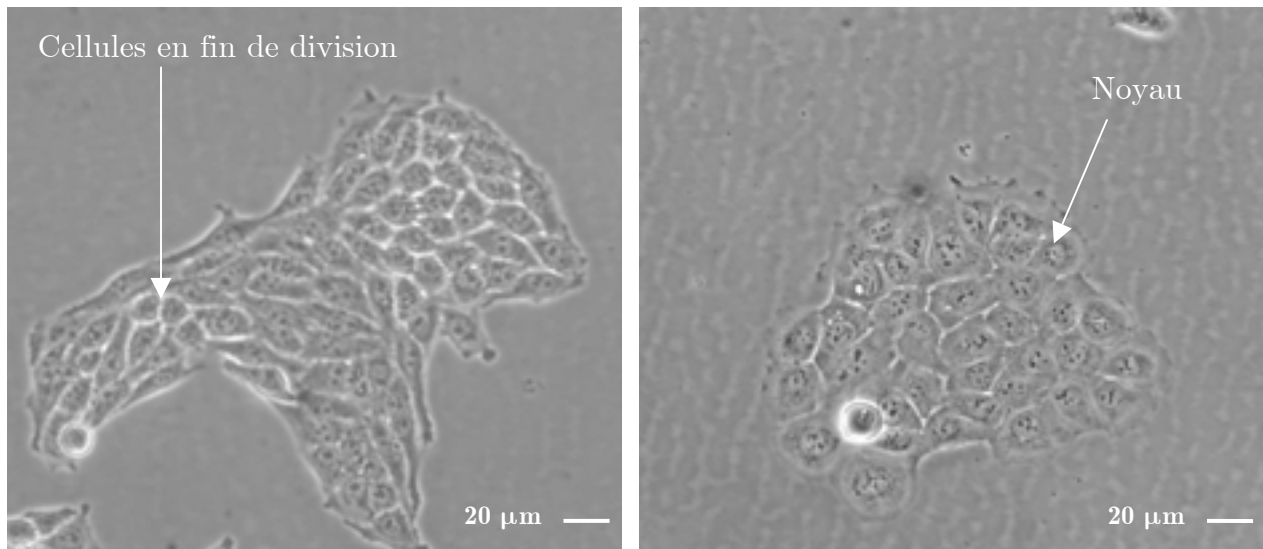
Une fois cette géométrie mieux connue, les simulations devraient permettre de mettre au point une géométrie optimale pour un système anti-diffusion.

## **2. Mise au point des protocoles de culture**

### **2.1 Conservation des lignées cellulaires**

Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Durant la période d'incubation, les cellules sont conservées dans un milieu nutritif composé de 90% de DMEM (milieu nutritif) + HEPES + PST (antibiotiques), 10% de sérum (facteur de croissance) et 1% de glutamine (acide aminé non présent dans le DMEM). Deux lignées sont cultivées en vue des premières études de radiobiologie : la lignée HaCaT de kératynocytes humains transformés établie spontanément à partir de peau humaine adulte [76] et une lignée de carcinome utérin HeLa (fournie par le Laboratoire d'Imagerie Fonctionnelle Sub-Cellulaire de l'Apoptose, unité INSERM de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie de Bordeaux).

Environ 87500 cellules sontensemencées dans les flacons de culture (3500 cellules/cm<sup>2</sup>). Après une semaine d'incubation, lorsque la monocouche cellulaire occupe 80% de la surface de la boîte, un passage est effectué. Cela permet d'éviter que les cellules n'arrivent à 100% de confluence et ainsi de les conserver en phase exponentielle de croissance.



*Fig. V.13 : Photographies en contraste de phase de colonies cellulaires. Les cellules sont issues de la lignée HaCaT à gauche et HeLa à droite. Les cellules sont adhérentes dans un flacon de culture T25 classique. Le noyau, un peu plus clair, se distingue du cytoplasme. On distingue également des organites cellulaires (points noirs).*

## **2.2 Configuration du puits d'irradiation**

Comme nous l'avons abordé au paragraphe IV.1.7, le développement d'un puits de culture spécifique est l'un des points critiques de la mise au point d'un système d'irradiation à l'échelle cellulaire. Ce développement a dû se faire en prenant en compte deux types de contraintes :

- les contraintes provenant des phénomènes physiques (microscopie en fluorescence, passage des particules chargées à travers le support de culture, ...)
- les contraintes provenant de phénomènes biologiques (cytotoxicité des matériaux utilisés, adhésion des cellules, ...)

Différentes configurations du puits d'irradiation ont donc été testées.

### **2.2.1 Tests des différents composants**

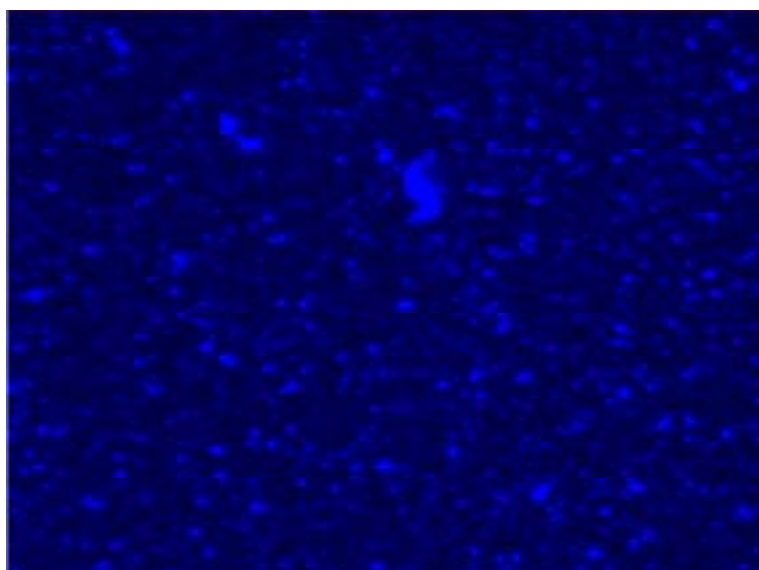
- *Le support de culture*

Le support de culture doit répondre à trois exigences (cf. paragraphe IV.1.7): être suffisamment mince pour perturber le moins possible le faisceau, ne pas être



cytotoxique et émettre un minimum de lumière parasite lorsque les cellules sont observées en fluorescence. Trois polymères ont été envisagés pour supporter les cellules pendant l'irradiation : le Mylar<sup>®</sup>, le polypropylène et le polycarbonate. Ces trois polymères ont été choisis car ils sont disponibles sous forme de feuille de quelques micromètres d'épaisseur.

La meilleure adhésion des cellules HaCaT a été obtenue sur des films de Mylar<sup>®</sup>. Cependant ce polymère émet de la lumière bleue lorsqu'il est éclairé dans l'ultraviolet (figure V.14), il ne peut donc pas être utilisé comme support de culture pour l'irradiation lorsque le colorant utilisé émet lui aussi dans le bleu.



*Fig. V.14 : Image en fluorescence d'un film de Mylar<sup>®</sup> de 3.5 µm seul. La durée d'exposition était de 15 secondes.*

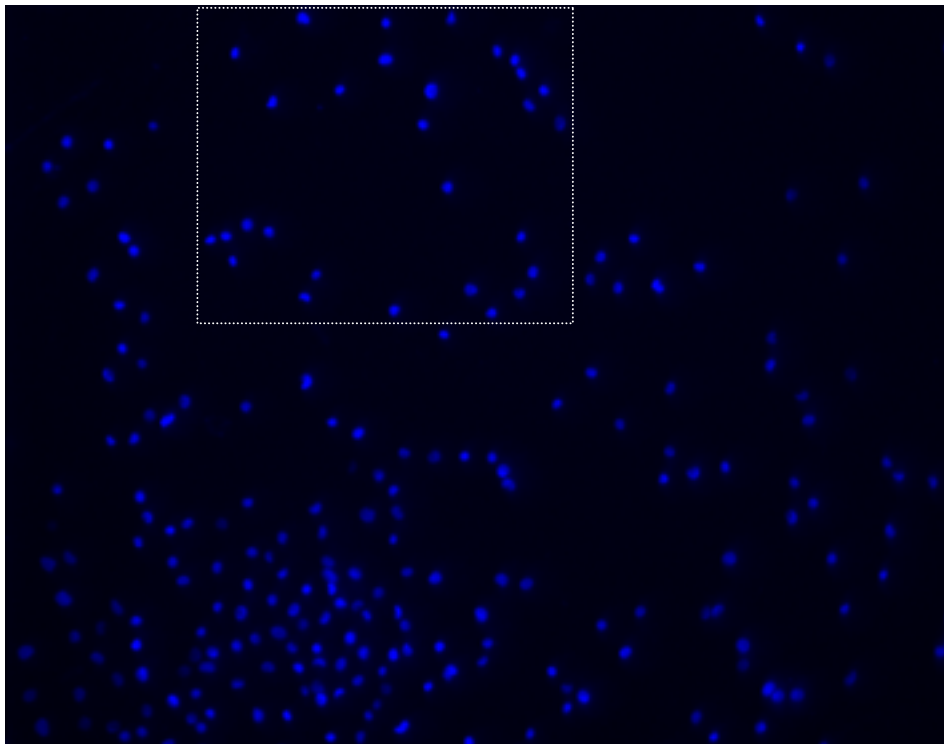
Les films de polycarbonate et de polypropylène, quant à eux, n'émettent pas de lumière parasite mais se sont avérés ne pas être propices à l'adhésion cellulaire de la lignée HaCaT. Le polypropylène cependant, a été traité avec un facteur d'adhésion pour permettre la culture des cellules.

- *Le milieu*

Le milieu DMEM utilisé pour la culture des cellules n'est pas le mieux adapté pour l'imagerie en fluorescence. En effet celui-ci génère un bruit de fond important sur les images acquises. Cet important fond est sans doute dû à la diffusion de la lumière émise par les cellules et/ou la fluorescence du milieu lui même. C'est pourquoi un milieu de type KBM, qui s'est révélé ne produire que très peu de bruit de fond a été finalement choisi. Celui-ci présente une composition comparable à celle du DMEM, exception faite du rouge de phénol.

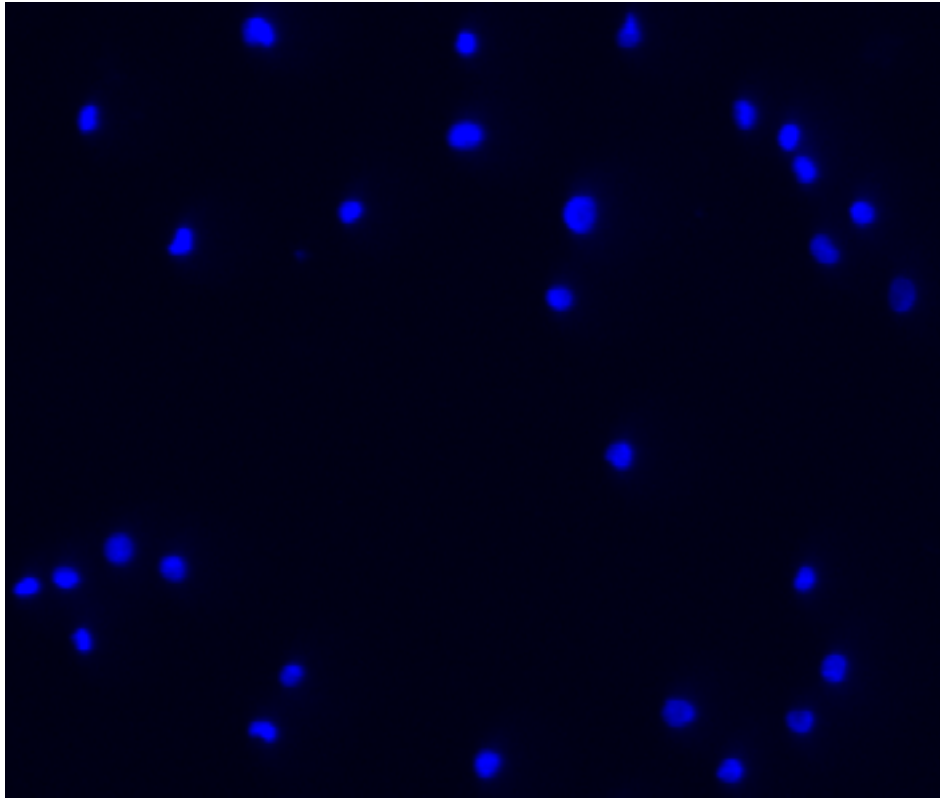
- *La fermeture du puits*

Les lamelles de microscopie en verre ont été choisies en raison de leurs bonnes propriétés optiques. En effet celles-ci ne fluorescent pas et ne diffuse pas la lumière. L'étanchéité du puits est assurée par un joint en silicone (cf. paragraphe IV.1.7). Afin de s'assurer que ce dernier ne libérait pas de substances cytotoxiques dans le milieu, des cellules ont été cultivées en conditions classiques et en présence de silicone. Nous n'avons observé aucun effet délétère de ce type matériau sur les cellules à condition que le joint soit réalisé quelques heures avant la mise en contact avec les cellules.



*Fig. V.15 : Image de cellules HaCaT en fluorescence (en haut, dimensions :  $960 \times 770 \mu\text{m}$ ) acquise en ligne à travers le milieu de culture KBM (grossissement :  $\times 10$  ; Exposition : 5 s). Les cellules sont colorées avec  $1 \mu\text{M}$  de Hoechst 33342. Les noyaux cellulaires se distinguent aisément et le fond est quasiment nul.*

La configuration finalement retenue (cf. paragraphe IV.1.7) permet d'obtenir un bon contraste sur les images optiques de fluorescence (figures V.15 et V.16) qui ne comporte quasiment pas de fond lumineux. Ces images autorisent une reconnaissance de forme efficace.



*Fig. V.16 : Image de cellules HaCaT en fluorescence. Cette image est un zoom correspondant au cadre de la figure V.15. Aucun traitement de l'image n'a été effectué.*

### **2.2.2 Protocole de préparation retenu**

La surface du film mince de polypropylène est tout d'abord traitée avec le facteur d'adhésion Cell-Tak™. 1500 cellules sont ensuite déposées dans une goutte de 15  $\mu$ l ramassée au centre du puits. L'ensemble est laissé au repos dans l'incubateur pendant deux heures afin de laisser les cellules adhérer. Le puits est ensuite rempli avec 210  $\mu$ l de KBM. 25  $\mu$ l de colorant Hoechst 33342 sont ajoutés une heure avant irradiation. Ce colorant permet de visualiser les noyaux cellulaires par microscopie de fluorescence. Après irradiation, les cellules sont décollées du support de polypropylène à l'aide de trypsine et réensemencées dans des boîtes de culture classiques. Les effets de l'irradiation peuvent ensuite être étudiés par les méthodes de microbiologie classiques (formation de colonies, induction de micro-noyaux ...).

A chaque puits irradié est associé un puits de contrôle préparé de la même manière mais non irradié. Ce puits est exposé aux mêmes conditions (température, coloration,

exposition aux ultraviolets) que le puits irradié et servira de référence pour l'interprétation des résultats.

### **3. Irradiations de cellules en culture**

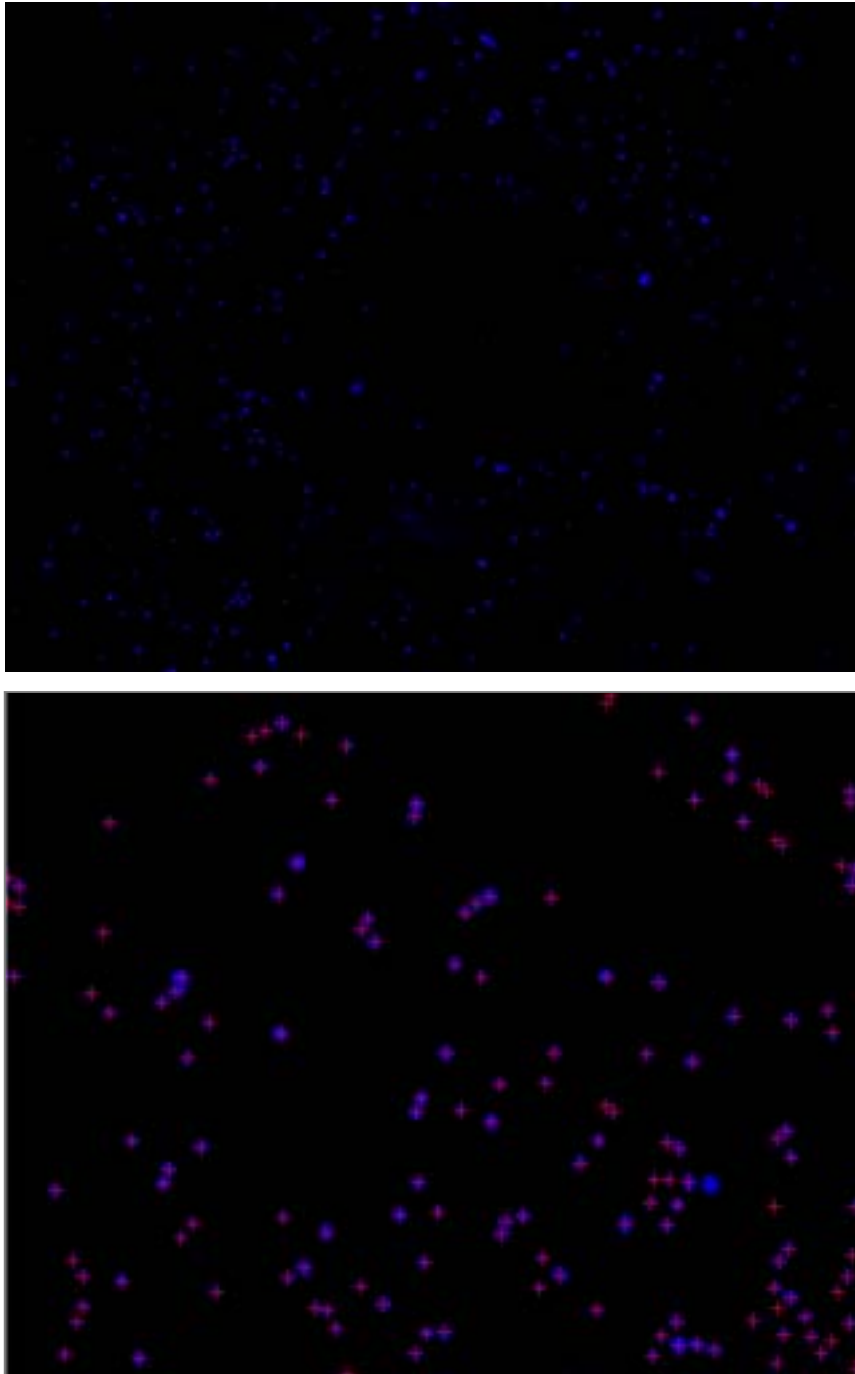
#### **3.1 Validation du dispositif pour des études en radiobiologie**

Les premières expériences vont consister en une comparaison des taux de survie clonogénique obtenus par irradiation classique (macrofaisceau) et par irradiation microfaisceau. Les noyaux cellulaires seront exposés à un nombre de particules  $\alpha$  correspondant à des doses absorbées allant de 0 à 5 Gray.

Des tests préliminaires ont été effectués sur des cellules de la lignée HaCaT. A cette occasion, une fréquence d'irradiation de 2000 cellules par heure a été atteinte lorsque le puits d'irradiation est déplacé mécaniquement. La figure V.17 montre un exemple de mosaïque acquise pendant ces irradiations. La procédure d'irradiation semi-automatique a été utilisée. Les cellules présentes dans chaque champ ont été irradiées automatiquement. Les quelques cellules non reconnues ont été irradiées manuellement.

Après l'irradiation, les cellules sont réensemencées dans les flacons de culture classiques et le nombre de colonies formées est compté. Le taux de survie peut ainsi être mesuré.

Ces expériences ayant déjà été réalisées par d'autres groupes [28], elles devraient permettre de valider le système d'irradiation dans son ensemble ainsi que les protocoles choisis pour la culture des cellules et leur récupération.



*Fig. V.17 : Image acquises en fluorescence de cellules HaCaT dont le noyau est marqué avec du colorant Hoechst 33342. L'image du haut est une mosaïque 4×5 champs (~3800×3800  $\mu\text{m}$ ). Celle-ci permet de repérer les limites de la goutte où sont ensemencées les cellules. L'image du bas est l'un des champs de la mosaïque où les cellules ont été irradiées automatiquement. Les cellules irradiées sont marquées d'une croix rouge. La cellule non reconnue a ensuite été irradiée manuellement.*

#### **4. Conclusion**

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la ligne d'irradiation par microfaisceau du CENBG est opérationnelle pour commencer les premières études de radiobiologie.

D'un point de vue technique, seul le mode de fonctionnement en mode faisceau fixe a pu être validé à ce jour. Le passage en mode faisceau balayé va encore demander quelques développements techniques et notamment une validation de la procédure d'étalonnage et une résolution des problèmes de délaminage de la fenêtre de scintillateur. Une fréquence d'irradiation nettement plus élevée sera toutefois atteinte une fois ces développements effectués.

L'irradiation de cellules par microfaisceau requiert par ailleurs le développement de protocoles de culture cellulaire spécifiques dépendants des lignées utilisées. Notamment concernant l'adhésion des cellules sur des films minces et leur coloration. Ces protocoles ont été mis au point en prenant en compte à la fois des contraintes d'ordre physique et biologique.

## **CONCLUSION**





Les travaux décrits dans ce mémoire constituent l'un des premiers exemples d'adaptation d'une microsonde nucléaire focalisée en ligne d'irradiation par ions isolés. Une part importante des développements a consisté en un aménagement de la ligne microfaisceau du CENBG tout en préservant ses caractéristiques essentielles à la microanalyse classique. Le but était de pouvoir délivrer un nombre de particules bien maîtrisé sur des cellules en culture avec une précision de quelques micromètres. Les résultats présentés dans la dernière partie de ce manuscrit montre que l'objectif a été atteint puisqu'une première version du dispositif fonctionne de manière routinière en mode faisceau fixe, avec des performances comparables à celles des dispositifs existants collimatés.

Les premières irradiations cellulaires ont été réalisées voici quelques mois et le système est en cours de validation par la comparaison des taux de survie clonogénique obtenus après des irradiations alpha par microfaisceau et par faisceau classique. Dans un deuxième temps, un programme de recherche traitant de la mort cellulaire programmée (apoptose) et de la signalisation associée va être lancé. Dans les études envisagées, le but est de coupler l'irradiation à l'échelle de la cellule individuelle à l'étude de la réponse à l'irradiation par des techniques de spectroscopie mises en oeuvre également sur des cellules uniques.

Sur le plan instrumental, un étage d'irradiation spécifique a dû être développé afin de remplacer la chambre d'analyse sous vide de la microsonde. Celui-ci a été équipée d'un système de détection en transmission permettant le contrôle du nombre d'ions délivrés ainsi qu'un dispositif d'extraction à l'air du faisceau, indispensable à l'irradiation de cellules vivantes. Un système de visualisation des cellules ainsi qu'un étage de déplacement micrométrique du puits d'irradiation étaient également indispensables à la localisation en ligne de chaque cible et à son alignement précis avec l'axe du faisceau. Le contrôle des différents instruments ainsi que des phases automatiques d'étalonnage et d'irradiation est assuré par un programme de contrôle-commande développé spécifiquement.

Ce travail a été également l'occasion de valider des codes de simulation Monte-Carlo (GEANT4) à l'échelle du micromètre. Les premiers résultats sont probant et nous ont fourni une aide précieuse pour les développements instrumentaux. La prise en compte

de phénomènes parasites dans le transport des faisceaux d'ions est maintenant possible, en particulier la diffusion multiple sur les molécules de gaz résiduel ou sur les bords des collimateurs. Les outils développés devraient permettre dans un futur proche l'optimisation des performances de la ligne d'irradiation, notamment au niveau du système de détection en transmission.

Bien que la ligne d'irradiation microfaisceau développée au cours de ce travail soit maintenant opérationnelle, il ne fait en effet aucun doute que des améliorations sont nécessaires. Les capacités de balayage électrostatique de la ligne microfaisceau n'ont, pour l'instant, pas pu être exploitées pleinement. Le développement d'un système de détection permettant ce balayage, aussi bien avec un faisceau de protons que de particules  $\alpha$  doit être réalisé. Cette tâche est déjà bien initiée en mode proton mais doit être étendue au mode alpha. Ce n'est qu'à ce prix que des fréquences d'irradiation optimales pourront être obtenues pour réaliser des études où un nombre très important de cellules irradiées doit être atteint. L'amélioration de la résolution spatiale à l'air doit être également une tâche de fond qu'il ne faut pas mésestimer. Les techniques de détection d'électrons secondaires, sur leur principe, semblent les mieux adaptées pour ce type d'application. Elles ne présentent cependant pas encore une efficacité suffisante pour la détection de particules légères dans le domaine du MeV.

Le dispositif d'acquisition d'images de fluorescence en ligne devra lui aussi être amélioré afin de diminuer les temps d'exposition aux ultraviolets ainsi que les concentrations de colorant utilisées. L'apparition de nouvelles caméras CCD, de plus en plus sensibles, devraient permettre cette amélioration. L'ajout d'un système d'amplification lumineuse pourra également être envisagé, bien que celui-ci risque d'introduire des distorsions des images qu'il faudra prendre en compte. Enfin, la mise en place d'un nouvel accélérateur ultra stable au CENBG va permettre d'optimiser la résolution du dispositif ainsi que sa fiabilité.

## **BIBLIOGRAPHIE**



- [1]. Zirkle R.E., Bloom W., *Science* **117**, 487 (1953)
- [2]. Folkard M., Vojnovic B., Prise K.M., Bowey A.G., Locke R.J., Schettino G., Michael B.D. : A charged particle microbeam : I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles. *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (4), 375-385 (1997)
- [3]. Folkard M., Vojnovic B., Hollis K.J., Bowey A.G., Watts S.J., Schettino G., Prise K.M. , Michael B.D. : A charged particle microbeam : II.A single particle micro-collimation and detection system. *Int. J. Radiat. Biol.* **72** (4), 387-395 (1997)
- [4]. Miller R.C., Marino S.A., Brenner D.J., Martin S.G., Richards M., Randers-Pehrson G., Hall E.J. : The biological effectiveness of radon progeny alpha particles. II. Oncogenic transformation as a function of linear energy transfer. *Radiation Research* **142**, 54-60, (1995)
- [5]. Nelson J.M., Brooks A.L., Metting N.F., Khan M.A., Bushbom R.L., Duncan A., Miick R., Braby L.A. : Clastogenic effect of defined number of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells. *Radiation Research* **145**, 568-574, (1996)
- [6]. Hall E.J. : Radiobiology for the radiologist. Fifth edition. *Lippincott Williams & Wilkins* (2000)
- [7]. International Commission on Radiation Units and Measurements : Recommendations. **Report 60**, Pergamon Press, (1991)
- [8]. Kellerer A.M. : Invisible threat – The risk of ionising radiation. *Nuclear science in Europe : impact, applications, interactions*. Nuclear Physics European Collaboration Committee (NuPECC) report, 159-174, (June 2002)
- [9]. Hall E.J. : Radiation, the two-edged sword : cancer risks at high and low doses. *Cancer Journal* **6**, 343-350, (2000)

- [10]. Masse R. : Rayonnements ionisants. *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences, Sciences de la vie, Paris*, **323**, 633-640, (2000)
- [11]. ICRP : 1990 recommendations of the International Commission on Radiological Protection, Publication 60, *Annals of the ICRP* **21**, n°1-3, Pergamon Press, Oxford (1990)
- [12]. National Research Council, Health effects of exposure to radon : BEIR VI, National Academy Press, Washington D.C. (1998).
- [13]. Nagasawa H., Little J.B. : Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Research* **52**, 6394-6396, (1992)
- [14]. Deshpande A., Goodwin E.H., Bailey S.M., Marrone B.L., Lenhert B.E. : Alpha particle induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts : evidence of an extranuclear target. *Radiation Research*, **145**, 260-267, (1996)
- [15]. Tausher-Sholtz G., Kraft G., Michael B., Belli M. : The in-flux of nuclear science to radiobiology. *Nuclear science in Europe : impact, applications, interactions*. Nuclear Physics European Collaboration Committee (NuPECC) report, 129-136, (June 2002)
- [16]. Zhou H., Randers-Pehrson G., Suzuki M. Waldren C.A., Hei T.K. : Genotoxic damage in non irradiated cells : contribution from the bystander effect. *Radiation Protection Dosimetry* **99**, 227-232, (2002)
- [17]. Geard C.R., Jenkins-Baker G., Marino S.A., Ponnaiya B. : Novel approaches with track segment alpha particles and cell co-cultures in studies of bystander effect. *Radiation Protection Dosimetry* **99**, 223-236, (2002)
- [18]. Lenhert B.E., Goodwin E.H. : Extracellular factor(s) following exposure to  $\alpha$  - particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Research* **57**, 2164-2171, (1997)

- [19]. Mothersill C., Seymour C.B : Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes : evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiation Research* **149**, 256-262, (1998)
- [20]. Prise K.M., Belyakov O.G., Folkard M., Michael B.D. : Studies of bystander effects in human fibroblasts using charged particle microbeam. *International Journal of Radiation Biology* **74**, 793-798, (1998)
- [21]. Sawant S.G., Randers-Pehrson G., Metting N.F., Hall E.J. : Adaptative response and the bystander effect induced by radiation in C3H 10T1/2 cells in culture. *Radiation Research* **156**, 177-180, (2001)
- [22]. Folkard M., Vojnovic B., Prise K.M., Michael B.D. : The application of charged particle microbeam in radiobiology. *Nucl. Instr. & Meth. B* **188**, 49-54, (2002)
- [23]. Mothersill C, Seymour C. : Radiation-induced bystander effect : past history and future direction. *Radiation Research* **155**, 759-767, (2001)
- [24]. Ballarini F., Biaggi M., Ottolenghi A., Sapora O. : Cellular communication and bystander effects : a critical review for modelling low-dose radiation action. *Mutation Research* **501**, 1-12, (2002)
- [25]. Österreicher J., Prise K.M., Michael B.D., Vogt J., Butz T., Tanner J.M. : Radiation-induced bystander effects. *Strahlenther und Onkologie* **179**, 69-77, (2003)
- [26]. Braby L.A., Brooks A.L., Meeting N.F. : Cellular effects of individual high linear energy transfer particles and implications for tissue response at low doses. *Radiation Research* **148**, S108-S114, (1997)
- [27]. Olivieri G., Bodycote J., Wolff S. : Adaptative response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* **223**, 594-597, (1984)

- [28]. Miller R.C., Randers-Pehrson G., Geard C.R., Hall E.J., Brenner D.J. : The oncogenic transforming potential of the passage of single  $\alpha$  particles through mammalian cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**, 19-22, (1999)
- [29]. Wu L.J., Randers-Pehrson G., Xu A., Waldren C.A, Geard C.R., Yu Z.L., Hei T.K. : Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4959-4964, (1999)
- [30]. Kamiya T., Yokota W., Kobayashi Y., Cholewa M., Krochmal M.S., Laken G., Larsen I.D., Fiddes L., Parkhill G., Dowsey K. : Development of an automated single cell irradiation system combined with a high energy heavy ion microbeam system. *Nucl. Instr. & Meth. B* **181**, 27-31, (2001)
- [31]. Prise K.M., Newman H.C., Schettino G., Folkard M., Michael B.D. : Low dose studies of cell survival with microbeams, bystander versus cell killing. *Radiation Research* **158**, 383, (2002)
- [32]. Prise K.M., Belyakov O.V., Newman H.C., Patel S., Schettino G., Folkard M., Michael B.D. : Non-targeted effects of radiation : bystander responses in cell and tissue model. *Radiation Protection Dosimetry* **99**, 223-226, (2002)
- [33]. Belyakov O.V., Folkard M., Mothersill C., Prise K.M., Michael B.D. : Bystander-induced apoptosis and premature differentiation in primary urothelial explants after charged particle microbeam irradiation. *Radiation Protection Dosimetry* **99**, 249-251, (2002)
- [34]. Belyakov O.V., Folkard M., Mothersill C., Prise K.M., Michael B.D. : A proliferation-dependent bystander effect in primary porcine and human urothelial explants in response to targeted irradiation. *British Journal of Cancer* **88**, 767-774, (2003)
- [35]. Folkard M., Vojnovic B., Gilchrist S, Prise K.M., Michael B.D. : Development of the Gray Laboratory charged particle microbeam. *Radiation Research* **158**, 366, (2002)



- [36]. Schettino G., Folkard M., Vojnovic B., Michette A.G., Stekel D., Pfauntsch S.J., Prise K.M., Michael B.D. : The ultra-soft X-ray microbeam : a subcellular probe of radiation response. *Radiation Research* **153**, 223-224, (2000)
- [37]. Hei T.K., Wu L.J., Liu S.X., Vannais D., Waldren C.A., Randers-Pehrson G. : Mutagenic effects of a single and exact number of  $\alpha$  particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3765-3770, (1997)
- [38]. Randers-Pehrson G., Geard C.R., Johnson G., Elliston C.D., Brenner D.J. : The Columbia University single-ion microbeam. *Radiation Research* **156**, 210-214, (2001)
- [39]. Bigelow A., Randers-Pehrson G., Brenner D.J. : Laser ion source design for the Columbia University microbeam. *Radiation Research* **158**, 368-369, (2001)
- [40]. Randers-Pehrson G., Johnson G.W., Marino S.A., Bigelow A., Zhang M., Geard C.R., Brenner D.J. : Status of the second Columbia university microbeam generation. *Radiation Research* **158**, 369-370, (2001)
- [41]. Sawant S.G., Randers-Pehrson G., Geard C.R., Brenner D.J., Hall E.J. : The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbours of irradiated cells. *Radiation Research* **153**, 397-401, (2000)
- [42]. Geard C.R., Randers-Pehrson G., Marino S.A., Jenkins-Baker G., Hei T.K., Hall E.J., Brenner D.J. : Intra- and inter-cellular responses following cell-site specific microbeam irradiation. *Radiation Research* **153**, 233, (2000)
- [43]. Zhou H., Randers-Pehrson G., Hei T.K. : Studies of bystander mutagenic response using charged particle microbeam. *Radiation Research* **153**, 236-237, (2000)

- [44]. Sawant S.G., Zheng W., Hopkins K.M., Randers-Pehrson G., Lieberman H.B., Hall E.J. : The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. *Radiation Research* **157**, 364-361, (2002)
- [45]. Zhou H., Suzuki M., Geard C.R., Hei T.K. : Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell responses. *Mutation Research* **499**, 135-141, (2002)
- [46]. Zhou H., Xu A., Suzuki M., Randers-Pehrson G., Waldren C.A., Hall E.J., Hei T.K. : The Yin and Yan of bystander versus adaptative response : lessons from the microbeam studies. *International Congress Series* **1236**, 241-247, (2002)
- [47]. Fischer B.E., Cholewa M., Nogushi H. : Some experiences on the way to biological single ion experiments. *Nucl. Instr. & Meth. B* **181**, 60-65, (2001)
- [48]. Greif K.-D., Brede H.J. : The PTB microbeam facility. *Radiation Research* **158**, 367, (2002)
- [49]. Hauptner A., Datzmann G., Dollinger G., Reichart P., Schmelmer O.: Design of the Munich microprobe facility for single ion irradiation of cells. *Radiation Research* **158**, 367-368, (2002)
- [50]. Dymnikov A. D., Brenner D.J., Johnson G., Randers-Pehrson G.: Theoretical study of short electrostatic lens for Columbia University Microprobe. *Review of Scientific Instruments* **71**, 1646-1650, (2000)
- [51]. Folkard M., Vojnovic B., Gilchrist S., Prise K.M., Michael B.D. : The design and applications of ion microbeams for irradiating living cells and tissues. *Nucl. Instr. & Meth. B* **210**, 302-307, (2003)
- [52]. Llabador Y., Bertault D., Gouillaud J.C., Moretto Ph. : Advantages of high speed scanning for microprobe analysis of biological samples. *Nucl. Instr. & Meth. B* **49**, 435-440, (1990)

- [53]. Dymnikov A.D., Fishkova T. Ya., Yavor S. Ya., : *Sov. Phys. –Tech. Phys.*, **10**, 340, (1965)
- [54]. Michelet C., Moretto Ph. : 3D mapping of individual cells using a proton microbeam. *Nucl. Instr. & Meth. B* **150**, 173-178, (1999)
- [55]. Staub H., Bethe H., Ashkin J., Ramsey N.F., Bainbridge K.T. : Experimental nuclear physics Volume I, E. Segrè editor, p. 249, (1953)
- [56]. Molière G., *Z. Naturforsch.*, 3a, 78, (1948)
- [57]. Bethe H.A. : Molière's theory of multiple scattering. *Physical Review* **89**, 1256-1266, (1950)
- [58]. Goudsmit S., Saunderson J.L., *Physical Review* **57**, 24, (1940)
- [59]. Lewis H.W. : Multiple scattering in an infinite medium, *Physical Review* **78**, 526-529, (1950)
- [60]. Kawrakow I., Bielajew A.F. : On the condensed history technique for electron transport. *Nucl. Instr. & Meth. B* **142**, 253-280, (1998)
- [61]. Fernandez-Varea J.M., Mayol R., Baro J., Salvat F. : On the theory and simulation of multiple elastic scattering of electrons. *Nucl. Instr. & Meth. B* **73**, 447-473, (1993)
- [62]. Sempau J., Fernandez-Varea J.M., Acosta E., Salvat F. : Experimental benchmarks of the Monte-Carlo code PENELOPE. *Nucl. Instr. & Meth. B* **207**, 107-123, (2003)
- [63]. Michelet C., Moretto Ph., Przybylowicz W., Prozesky V., Pineda C., Laurent G., Lhoste F., Barberet Ph. : Measurement of lateral straggling using a microbeam. *Nucl. Instr. & Meth. B* **181**, 157-163, (2001)

- [64]. Ziegler J.F., Biersack J.P. (Eds.), SRIM, the Stopping and Range of Ions in Matter, © IBM Co 1998. SRIM home page : <http://www.srim.org>
- [65]. GEANT3 home page :  
[http://wwwinfo.cern.ch/asdoc/geant\\_html3/geantall.html](http://wwwinfo.cern.ch/asdoc/geant_html3/geantall.html)
- [66]. GEANT4 Collaboration : GEANT4 – A simulation toolkit. *Nucl. Instr. & Meth. A* **506**, 250-303,(2003)
- [67]. GEANT4 home page : <http://wwwinfo.cern.ch/asd/geant4/geant4.html>
- [68]. GEANT4 Physics Reference Manual :  
<http://wwwasd.web.cern.ch/wwwasd/geant4/G4UsersDocuments/UsersGuides/PhysicsReferenceManual/html/PhysicsReferenceManual.html>
- [69]. Urbán L. : Multiple scattering model in GEANT4. CERN-OPEN-2002-70 (2002)
- [70]. ROOT home page : <http://root.cern.ch>
- [71]. Incerti S., Barberet Ph., Courtois B., Michelet-Habchi C. and Moretto Ph. : Simulation of ion propagation in the microbeam line of CENBG using GEANT4. *Nucl. Instr. & Meth. B* **210**, 92-97,(2003)
- [72]. Michelet C., Moretto Ph., Barberet Ph., Balana A., Dutta R.K., Aguer P. : A focused microbeam for targeting cells with counted multiple particles. *Radiation Research* **158**, 370-371,(2002)
- [73]. Moretto Ph., Michelet C., Balana A., Barberet Ph., Przybylowicz W., Slabbert J.P., Prozesky V., Pineda C., Brut G., Laurent G., Lhoste F. : Development of a single ion irradiation system at CENBG for applications in radiation biology, *Nucl. Instr. & Meth. B* **181**, 104-109 (2001)

- [74]. Barberet Ph., Aguer P., Balana A., Gault N., Incerti S., Lefaix J.L., Michelet C., Moretto Ph., Poncy J.L. : First experiments on cells using the focused microbeam at CENBG. Proceedings of the 7<sup>th</sup> workshop on cellular probe response, Oxford, (2003)
- [75]. Peng S., Folkard M., Gilchrist S., Locke R.J., Yu Z., Michael B.D. : Measurements of the targeting accuracy of the Gray Laboratory charged particle microbeam. *Nucl. Instr. & Meth. B* **179**, 145-150, (2001)
- [76]. Boukamp P., Petrussevska R., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. : Normal keratinization in spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* **106**, 761-771, (1988)



## **TABLE DES MATIERES**

# **INTRODUCTION** **11**

## **Chapitre I**

### **INTERET DES MICROFAISCEAUX DANS L'ETUDE DES REPNSES CELLULAIRES A L'IRRADIATION** **15**

<b>1. Etude des faibles doses</b>	<b>17</b>
1.1 Quelques définitions	17
1.1.1 Le transfert linéaire d'énergie	
1.1.2 La dose absorbée	
1.1.3 L'efficacité biologique relative	
1.1.4 Dose équivalente et dose efficace	
1.1.5 Les effets des rayonnements ionisants sur le vivant	
1.2 Risque associé aux faibles doses d'irradiation	21
1.3 Phénomènes particuliers impliqués à faible dose	23
1.3.1 L'effet de proximité	
1.3.2 La réponse adaptative	
<b>2. Apports des microfaisceaux</b>	<b>25</b>
2.1 Contrôle de la dose au niveau cellulaire	25
2.2 Discrimination des sites sub-cellulaires	26
2.3 Aide aux modèles de dosimétrie	26
<b>3. Les microfaisceaux en fonctionnement</b>	<b>27</b>

## **Chapitre II**

### **LA LIGNE MICROFAISCEAU** **33**

<b>1. Obtention d'un microfaisceau : deux techniques possibles</b>	<b>35</b>
<b>2. La microsonde nucléaire du CENBG</b>	<b>37</b>
2.1 Les différents constituants de la microsonde	38
2.1.1 Dispositif de focalisation	
2.1.2 Système de balayage électrostatique	
2.1.3 La chambre d'analyse	
2.2 Fonctionnement en faible flux et microscopie ionique en transmission	41
2.2.1 La technique STIM	
2.2.2 Configuration faible flux	
<b>3. Le contrôle du faisceau ion par ion</b>	<b>44</b>
3.1 Principe de fonctionnement	44



3.2	Détection et comptage des ions	45
3.3	Commutation rapide du faisceau	46
3.4	Extraction des particules à l'air	46
<b>4.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>47</b>

## Chapitre III

<b>MODELISATION ET OPTIMISATION DU DISPOSITIF</b>	<b>49</b>	
<b>1. Rappels sur la diffusion Coulombienne</b>	<b>51</b>	
1.1	La diffusion simple	51
1.2	La diffusion multiple	52
<b>2. Mesures expérimentales par microfaisceau</b>	<b>53</b>	
2.1	Méthode expérimentale	53
2.2	Traitement des données	55
2.3	Résultats	57
<b>3. Simulation Monte-Carlo</b>	<b>59</b>	
3.1	Introduction : simulation condensée ou détaillée ?	59
3.2	SRIM	60
3.2.1	Introduction	
3.2.2	Le traitement de la diffusion dans SRIM	
3.3	GEANT4	60
3.3.1	Introduction	
3.3.2	La géométrie du volume d'interaction	
3.3.3	Les processus physiques	
3.3.4	Le générateur d'évènements	
3.3.5	Le traitement de la diffusion dans GEANT4	
3.3.6	Stockage et traitement des données : ROOT	
<b>4. Validation des codes Monte-Carlo par comparaison avec l'expérience</b>	<b>63</b>	
<b>5. Simulations de détecteurs en transmission avec GEANT4</b>	<b>65</b>	
5.1	Détecteur à scintillation	65
5.2	Détecteur à gaz	67
5.2.1	Le problème de la fenêtre d'entrée	
5.2.2	Le rapport longueur / densité	
5.2.3	Pertinence des simulations	
5.2.4	Les très faibles épaisseurs	
<b>6. Conclusion</b>	<b>72</b>	

## Chapitre IV

### DEVELOPPEMENTS INSTRUMENTAUX :

<b>ETAGE D'IRRADIATION ET PROCEDURES</b>	<b>73</b>
<b>1. L'étage d'irradiation</b>	<b>75</b>
1.1 Détection et extraction des particules	75
1.1.1 Le détecteur à scintillation	
1.1.2 Le détecteur à gaz	
1.2 Traitement des signaux et commutation du faisceau	81
1.2.1 Amplification et mise en forme	
1.2.2 Comptage et commutation	
1.3 Microscope optique	85
1.4 Déplacements de la cible	88
1.5 Le dispositif d'étalonnage	90
1.6 L'étage d'irradiation	91
1.7 Le puits d'irradiation	93
<b>2. Le programme <math>\mu</math>Irad</b>	<b>95</b>
2.1 Les outils informatiques	95
2.1.1 La caméra optique	
2.1.2 Le manipulateur	
2.1.3 Contrôle du faisceau et caméra ionique	
2.1.4 Le traitement d'image	
2.2 Les procédures d'étalonnage	105
2.2.1 Mode faisceau fixe	
2.2.2 Mode faisceau balayé	
<b>3. Les procédures d'irradiation</b>	<b>110</b>
3.1 La mosaïque	110
3.2 Irradiation manuelle directe	112
3.3 Irradiation semi-automatique	112
3.4 Irradiation automatique	112
<b>4. Conclusion</b>	<b>113</b>

## **Chapitre V**

### **VALIDATION DU DISPOSITIF**

#### **ET**

### **RESULTATS EXPERIMENTAUX 115**

#### **1. Performances du dispositif 117**

1.1 Résolution spatiale et taille du faisceau 117

1.2 Mesures de la résolution du microfaisceau 118

1.3 Contrôle du nombre d'ions délivrés 120

1.4 Précision globale 122

1.5 Difficultés expérimentales 124

1.5.1 Délaminage de la feuille de scintillateur

1.5.2 Diffusion sur les bords de collimateurs

#### **2. Mise au point des protocoles de culture 129**

2.1 Conservation des lignées cellulaires 129

2.2 Configuration du puits d'irradiation 130

2.2.1 Tests des différents composants

2.2.2 Protocole de préparation retenu

#### **3. Irradiations de cellules en culture 134**

3.1 Validation du dispositif pour des études en radiobiologie 134

#### **4. Conclusion 136**

### **CONCLUSION 137**

### **BIBLIOGRAPHIE 141**



## **RESUME :**

Un dispositif micro-irradiation par ions isolés a été développé au CENBG pour des applications en radiobiologie à l'échelle cellulaire. Cette installation consiste en un aménagement de la ligne microfaisceau préexistante qui permet déjà d'obtenir un faisceau de protons ou de particules alpha entre 1 et 3 MeV, de faible intensité, et d'une résolution spatiale sous vide inférieure au micromètre. La majeure partie de ce travail a consisté à développer un étage d'irradiation adaptable sur la microsonde et permettant de délivrer les ions à l'air avec une précision absolue de quelques micromètres. Un programme permettant le contrôle de la totalité des instruments ainsi que des phases d'étalonnage et d'irradiation automatiques a également été mis au point. Des outils de simulation Monte Carlo, nécessaires à la caractérisation et à l'optimisation du dispositif et notamment en terme de résolution spatiale, ont été validés à l'échelle du micromètre par comparaison à des résultats expérimentaux. Les performances du dispositif, notamment en terme de contrôle du nombre d'ions, de résolution spatiale et de précision d'irradiation ont été testées sous faisceau. Les résultats obtenus permettent d'envisager les premières applications dans des études de radiobiologie. Dans un futur proche cet outil va permettre l'étude des réponses cellulaires aux faibles doses, allant jusqu'au cas extrême d'un ion pour une cellule. Il devrait permettre par ailleurs d'aborder des mécanismes cellulaires fondamentaux tels la signalisation, la communication intercellulaire ou encore la mort cellulaire programmée (apoptose).

## **ABSTRACT :**

A single ion facility has been developed at CENBG for applications in radiobiology at the cellular scale. The development of this set-up was based on the existing nuclear microprobe, which is able to focus protons or alpha particles from 1 to 3 MeV down to one micrometer under vacuum. The main part of this work was dedicated to adapt an irradiation stage on the microbeam line to deliver particles in air with an absolute precision of a few micrometers. A control software, used to drive the overall experiment including the automatic phases of calibration and irradiation, has also been developed. Monte Carlo simulation tools, required for set-up characterisation and enhancement, have been validated at micrometer scale by comparison with experimental data. Experimental validation of the facility, in terms of beam control, spatial resolution and targeting accuracy have been performed. These tests allow to consider the first use of the facility in the frame of radiobiological studies. In the near future, this facility will allow studies of cellular responses to low doses of radiation, including extreme situations like exposure to a single ionising particle. Studies of fundamental cellular mechanisms like signalling, intercellular communication or programmed cell death (apoptosis) will also be possible.

## **Mots Clés :**

Microfaisceau	Faisceau extrait	Détection de rayonnements	Faible dose
Ions isolés	Instrumentation	Radiobiologie	Réponse cellulaire