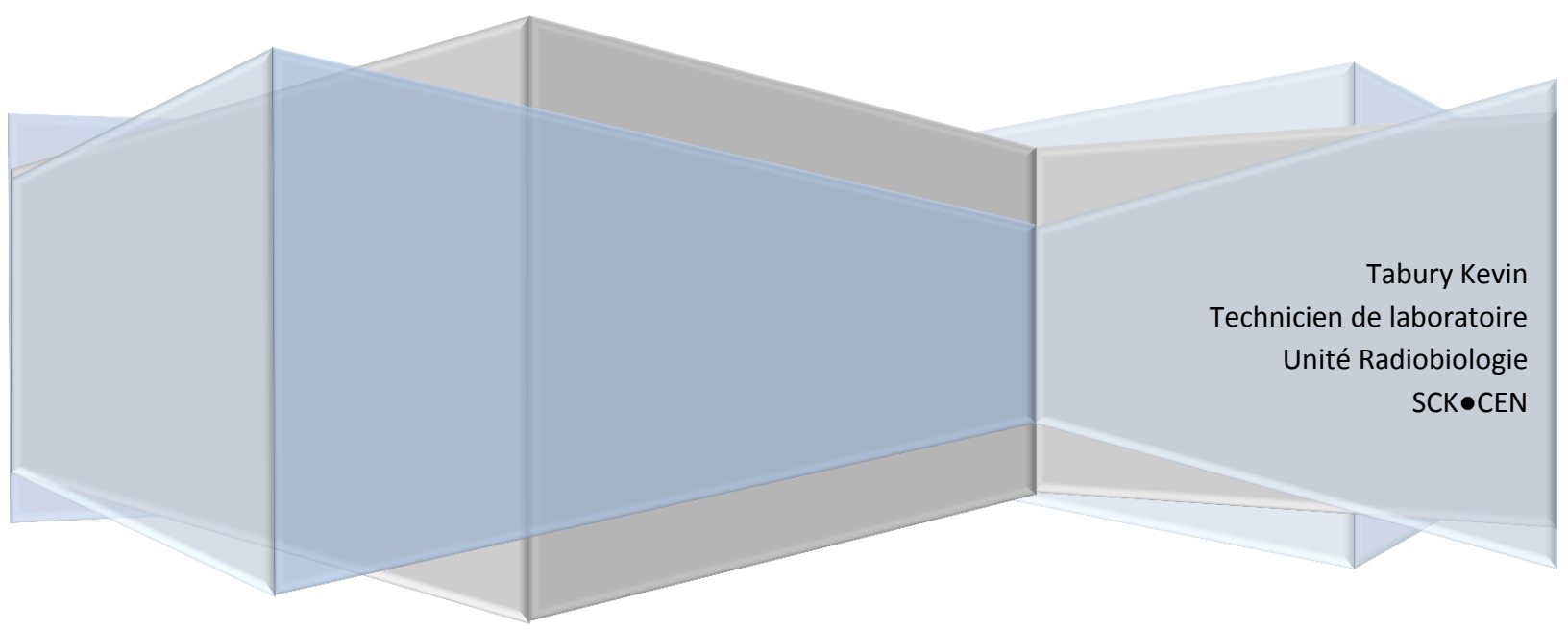


Développement de radiopharmaceutiques marqués au ^{177}Lu pour le traitement contre le cancer : Préparation d'une procédure technique ALARA

En vue de l'obtention du certificat d'expert en radioprotection classe II



Tabury Kevin
Technicien de laboratoire
Unité Radiobiologie
SCK•CEN

Table des matières

1. Introduction générale.....	1
2. Introduction du projet.....	3
3. Grandeurs et Unités	3
I. L'activité	3
II. La dose absorbée (D).....	3
III. Le débit de dose (D°)	4
IV. La dose équivalente (H).....	4
V. La dose efficace (E).....	4
VI. La dose équivalente engagée (H(t)).....	4
VII. La dose collective (S)	4
4. Différents types de rayonnement ionisant	5
I. Les photons	5
II. Rayons Bêta (β^+ ; β^-)	6
5. A.R.20/07/2001	7
I. Réglementation	7
II. Définition du principe ALARA	8
III. Application du principe ALARA au sein du SCK•CEN	8
6. La procédure technique	12
7. Aspect supplémentaire de la radioprotection	20
I. Transport	20
II. Scénario	21
III. Blindage	22
IV. Gestion des déchets	23
8. Conclusion	25
Annexe I: Détails du protocole technique.....	26
Annexe II: Références.....	34
Annexe III: Carte d'identification.....	36

1. Introduction générale

Dû aux avancées technologiques, la problématique des cancers est devenu un sujet important dans notre société. La recherche fondamentale dans ce domaine en est donc une conséquence. Dans cette optique, il y a un besoin urgent de traitement ciblé qui tue sélectivement les cellules tumorales malignes tout en minimisant les dommages aux cellules saines. Au sein de l'unité de radiobiologie du SCK•CEN, un projet a été créé (nommé CATAMARAN) afin de répondre à cette demande. L'idée est de développer des produits radiopharmaceutiques (radionucléides couplés à des biomolécules) qui produiront des doses de rayonnement cytotoxiques spécifiquement aux cellules cancéreuses. Les biomolécules en question sont des aptamères (=oligonucléotides synthétiques non codantes). Dans un premier temps le projet aura pour but de coupler l'aptamère au radioisotope ^{177}Lu et d'évaluer minutieusement ce couplage à travers des expériences *in vitro*.

La synthèse de ces produits radiopharmaceutiques conduit inévitablement à l'utilisation de matériel radioactif. En tant qu'expert en radioprotection, nous avons le devoir de protéger toute personne (le public, les apprentis, les étudiants et les travailleurs professionnellement exposés) des effets néfastes des rayonnements ionisants provenant d'une pratique.

Le but de ce travail est de garantir, autant que possible, que toutes les précautions ont été prises pour assurer une utilisation sûre du matériel radioactif. Ainsi une procédure technique a été mise sur pied afin de non seulement appliquer le principe ALARA mais également de prendre en compte différents aspects de la radioprotection.

Une partie théorique permettant au lecteur de comprendre le contexte suivi d'une partie pratique expliquant la procédure technique composant ce travail.

Il est à noter qu'une étude similaire utilisant un autre véhicule a été effectuée en 2010. De ce fait la conclusion comporte les améliorations qui ont été apportées par rapport à l'étude précédente.

Partie théorique

2. Introduction du projet

Au cours des deux dernières décennies, la recherche sur le cancer s'est tournée vers une approche plus sélective et ciblée avec une efficacité accrue et une toxicité périphérique plus faible. À cet égard, la radiothérapie ciblée utilise des produits radiopharmaceutiques qui interagissent avec des molécules qui sont surexprimées dans les cellules tumorales. Ceci permet d'administrer des doses de rayonnements cytotoxiques spécifiquement aux cellules tumorales malignes tout en minimisant les dommages aux cellules saines. Les produits radiopharmaceutiques sont en réalité des biomolécules couplées à un radioélément.

Les aptamères ont été choisis comme biomolécule. Ceux-ci sont des séquences d'oligonucléotides synthétiques non codantes qui forment des structures tridimensionnelles stables, capable de se lier, avec une forte affinité et spécificité, à leur cible moléculaire.

Dû à ses caractéristiques de désintégration, le ^{177}Lu est un radioélément attrayant pour les applications radiothérapeutiques. En effet, il se désintègre avec une demi-vie de 6,7 jours par émission de particules bêta moins (497 keV E_{max}). De plus, l'émission simultanée de photons gamma d'énergie appropriés avec abondance relativement faible (6,4%, 113 keV et 11%, 208 keV) offre la possibilité de réaliser des études d'imagerie pendant le traitement.

Il reste alors un critère essentiel pour la réussite du développement des produits radiopharmaceutiques. C'est-à-dire le choix d'un agent chélatant bifonctionnel approprié, contenant à la fois un groupe fonctionnel pour la fixation covalente de la biomolécule et une partie chélatante pour le complexe métal radioactif. Ce qui permet ainsi le couplage de la biomolécule avec le radioélément.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier le couplage de ces aptamères avec le ^{177}Lu à travers différentes expériences *in vitro* et *in vivo*.

3. Grandeurs et Unités

I. L'activité

Un échantillon radioactif se caractérise par son activité. C'est à dire le nombre de désintégrations par seconde. L'unité est le **becquerel**, de symbole Bq.

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ désintégration par seconde.}$$

II. La dose absorbée (D)

C'est la quantité d'énergie absorbée par unité de masse. L'unité est le **Gray**, de symbole Gy.

$$1 \text{ Gray} = 1 \text{ joule absorbée dans une masse de un kilogramme.}$$

III. Le débit de dose (D°)

C'est la dose absorbée par unité de temps.

IV. La dose équivalente (H)

Dans le but de tenir compte des différents types de rayonnements ionisants, la dose équivalente résulte de la multiplication de la dose absorbée par un facteur de pondération W_R (qui diffère suivant la nature du rayonnement ionisant). Son unité est le **Sievert**, de symbole Sv.

Le Sievert : Mesure l'efficacité des radiations à produire des dégâts biologiques.

$$H = \sum W_R D_{T,R}$$

Où $D_{T,R}$ est la moyenne pour l'organe ou le tissu T de la dose absorbée du rayonnement R, et w_R est le facteur de pondération radiologique.

V. La dose efficace (E)

Afin de tenir compte des différences de sensibilité des tissus ou organes, la dose équivalente est multipliée par un facteur de pondération W_T (qui diffère suivant l'organe (ou le tissu)). L'unité est le **Sievert**.

$$E = \sum W_T H_T = \sum W_T \sum W_R D_{T,R}$$

Où $D_{T,R}$ est la moyenne pour l'organe ou le tissu T de la dose absorbée du rayonnement R; w_R est le facteur de pondération radiologique, et w_T est le facteur de pondération tissulaire valable pour le tissu ou l'organe T.

Rem : les facteurs de pondération sont accessibles dans A.R.20/07/01 RGPRI - Annexe II

VI. La dose équivalente engagée (H(t))

C'est l'intégrale du débit de dose équivalente, qui sera reçu par un individu, sur le restant de la vie. Cette grandeur est principalement utilisée pour évaluer l'impact d'une contamination interne. Le temps sur laquelle l'intégrale est faite est de 50 ans pour les adultes et de 70 ans pour les enfants. L'unité de dose équivalente engagée est le **sievert**.

Le même principe peut également être appliqué pour connaître la dose efficace engagée en utilisant cette fois ci le débit de dose efficace.

VII. La dose collective (S)

C'est la somme des doses efficaces individuelles infligées à un groupe donné. L'unité est l'**homme.Sievert**.

Un homme.Sievert est la dose collective résultant de l'exposition de 1.000 hommes à 1 mSv.

4. Différents types de rayonnement ionisant

Comme nous l'avons vu à la partie précédente, la dose équivalente se calcule suivant le type de rayonnement ionisant. Dans un souci de vouloir rester concret, seuls les rayonnements ionisants venant du ^{177}Lu seront abordés.

I. Les photons

Rayons X (RX)

Les RX sont une forme de rayonnement électromagnétique à haute fréquence dont la longueur d'onde est comprise entre 0,1 Å (10pm) et 100 Å (10nm). La production de RX peut se faire de deux manières :

-Soit par le changement d'orbital d'électrons provenant des couches électroniques. Les rayons X sont produits par des transitions électroniques faisant intervenir les couches internes, proches du noyau (l'excitation donnant la transition peut être provoquée par des rayons X ou bien par un bombardement d'électrons).

-Soit lors d'accélération d'électrons suivie :

-Soit d'une décélération des électrons (principe du tube à rayons X)

-Soit d'un changement de trajectoire (principe du synchrotron)

Rem : ce type de rayonnement ionisant peut apparaître comme rayonnement secondaire lorsque le blindage est inapproprié.

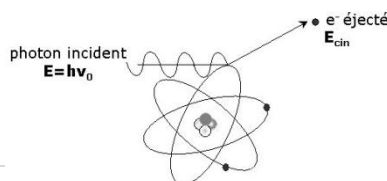
Rayons Gamma (γ)

Les rayons gamma sont de même nature et d'énergie comparable que les RX mais sont d'origine différente. Les rayons gamma sont produits par réarrangements de protons et de neutrons à l'intérieur du noyau atomique (transitions nucléaires) alors que les RX résultent d'effets électromagnétiques impliquant des électrons (transition électronique). Ils ont un pouvoir de pénétration plus élevé que les particules alpha, bêta mais ont un pouvoir ionisant plus faible.

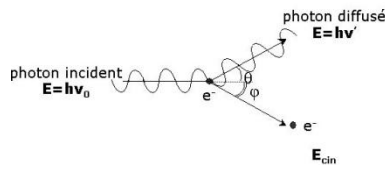
Une forte épaisseur de béton ou de plomb permet de les arrêter.

Les RX et les Gamma peuvent interagir avec la matière de trois façons principales.

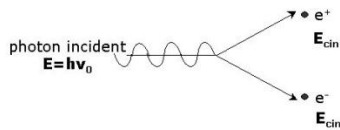
L'effet photo-électrique : Cela apparaît lorsqu'un photon entre en collision avec un électron de l'absorbant. Suite à cette collision, le photon transfère toute son énergie à l'électron.



L'effet Compton : Cela apparaît lorsqu'un photon entre en collision avec un électron de l'absorbant. Mais, suite à cette collision, le photon est dévié et ne transfère qu'une petite partie de son énergie.



Formation de paires : Cela apparaît lorsqu'un photon pénètre dans le champ électrique intense d'un noyau. Il y a alors formation de paires (positron et électron).

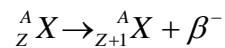
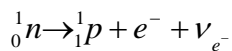


II. Rayons Bêta (β^+ ; β^-)

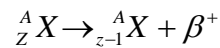
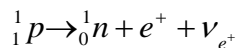
L'émission bêta est un type de désintégration radioactive dans laquelle une particule bêta (un électron ou un positron) est émise. On parle de désintégration bêta moins (β^-) ou bêta plus (β^+) selon que ce soit un électron ou un positron qui est émis.

Une feuille d'aluminium permet de les arrêter. Le processus de désintégration Bêta est stimulé par un rapport neutron/proton instable.

Lors d'une désintégration β^- , un neutron se transforme en proton et libère un électron accompagné d'un antineutrino d'électron.



Lors d'une désintégration β^+ , un proton se transforme en neutron et libère un positron accompagné d'un neutrino d'électron.



5. A.R.20/07/2001

I. Réglementation

Les grandes lignes directrices de cette réglementation peuvent-être exposées en trois principes :

La justification : Le bénéfice global d'une pratique doit être supérieur au détriment dû à l'exposition aux rayonnements ionisants.

La limitation du risque : Les doses subies ne peuvent pas dépasser certaines limites. Ceci permet d'éviter tout effet aigu et de limiter les effets à long terme à un niveau acceptable (en comparaison avec d'autres risques).

L'optimisation radiologique : Application du principe ALARA. C'est-à-dire que les quantités de rayonnements ionisants reçues doivent être réduites le plus possible compte tenu des facteurs économiques et sociaux.

De plus certaines limites de dose y sont mentionnées:

- Public :**
- 1mSv/12 mois consécutifs glissants
 - 50mSv/12 mois consécutifs glissants (dose équivalente pour la peau (valeur moyenne pour toute surface de 1 cm²))
 - 15mSv/12 mois consécutifs glissants (dose équivalente pour le cristallin)

Travailleur professionnellement exposé (âgé de minimum 18 ans) :

- 20mSv/12 mois consécutifs glissants (dose efficace)
- 500mSv/12 mois consécutifs glissants (dose équivalente pour les mains, les avant-bras, les pieds et les chevilles)
- 150mSv/12 mois consécutifs (dose équivalente pour cristallin)

Au sein du SCK•CEN, nous appliquons une contrainte de dose de 10mSv/12 mois consécutifs glissants (dose efficace).

Apprenti et étudiant :

Trois cas de figure peuvent apparaître suivant l'âge de la personne.

- Si âge > 18 ans, cette personne sera considérée comme « travailleur professionnellement exposé »
- Si âge < 16 ans, cette personne sera considérée comme « public »

-Si 16 ans < âge <18 ans, d'autres limites sont d'application :

-6mSv/12 mois consécutifs glissants (dose efficace)

-150mSv/12 mois consécutifs glissants (dose équivalente pour les mains, les avant-bras, les pieds et les chevilles)

-50mSv/12 mois consécutifs (dose équivalente pour cristallin)

-150mSv/12 mois consécutifs glissants (dose équivalente pour la peau (valeur moyenne pour toute surface de 1 cm²))

II. Définition du principe ALARA

ALARA (As Low As Reasonably Achievable) = est une approche pour contrôler ou gérer l'exposition aux rayonnements ionisants et les rejets de matières radioactives dans l'environnement. Cette approche prend en compte différents facteurs : politique, sociaux, techniques, économiques et public. ALARA n'est pas une limite de dose mais un principe dont l'objectif est la réalisation de contraintes de dose qui sont bien en dessous des limites qui sont d'application.

A cet effet, une méthode permettant de faire une analyse du coût/bénéfice de l'application du principe ALARA a été proposée. Introduisant la notion de valeur monétaire de l'homme.Sievert, elle traduit ce que la société ou l'entreprise est prête à payer pour éviter un éventuel effet induit par l'exposition aux rayonnements ionisants.

III. Application du principe ALARA au sein du SCK•CEN

Au sein du SCK•CEN, une procédure interne a été élaborée afin de s'assurer que le principe ALARA est appliqué. Elle permet également d'uniformiser son approche et de mettre en place une banque de donnée de retour d'expérience. Le schéma résumant la procédure se trouve à la page 10.

La procédure commence avec la rédaction d'une procédure technique décrivant la tâche(1) qui va être effectuée. Celle-ci inclus des spécifications concernant l'identification de la procédure, son exécution et une description des aspects nucléaires et non nucléaires. Une estimation de la dose collective (qui comprend la dose collective (S) et la dose individuelle maximale (DIM)) est alors réalisée par le comité ALARA local (2). Le comité ALARA local est composé du demandeur, du service contrôle physique et du coordinateur ALARA Local.

Au sein du SCK•CEN, trois zones sont délimitées suivant le degré du risque d'exposition aux rayonnements ionisants dû à une pratique. La zone normale (blanche) est définie par un risque qui est équivalent au risque public. La zone surveillée (jaune) est définie par un risque qui est limité par l'activité maximale qui peut y être utilisée (déterminée par l'autorisation d'exploitation). La zone contrôlée (rouge) est définie de la même manière que la zone surveillée mise à part que l'activité qui peut y être utilisée est bien supérieure à celle de la zone surveillée. Sachant que chaque bâtiment peut abriter

différentes zones (contrôlées et surveillées), il a été décidé de nommer des coordinateurs ALARA locaux (sous la responsabilité du coordinateur ALARA CEN). Ceci permet d'avoir non seulement une connaissance détaillée des zones dans laquelle la tâche est accomplie mais également de réduire et de faciliter ainsi le travail du coordinateur ALARA CEN.

Si l'exécution de la tâche est une première (3), il est nécessaire de remplir le volet A (4) (reprenant la procédure technique et le rapport du comité ALARA local).

Si l'exécution de la tâche a déjà été faite dans le passé et qu'il n'y a pas eu d'incident, il est nécessaire de remplir le volet B (5) (reprenant le retour d'expérience et les changements qui y sont appliqués).

Le coordinateur ALARA CEN examine alors la demande (6). Lors de l'estimation de la dose collective, trois cas de figure peuvent apparaître :

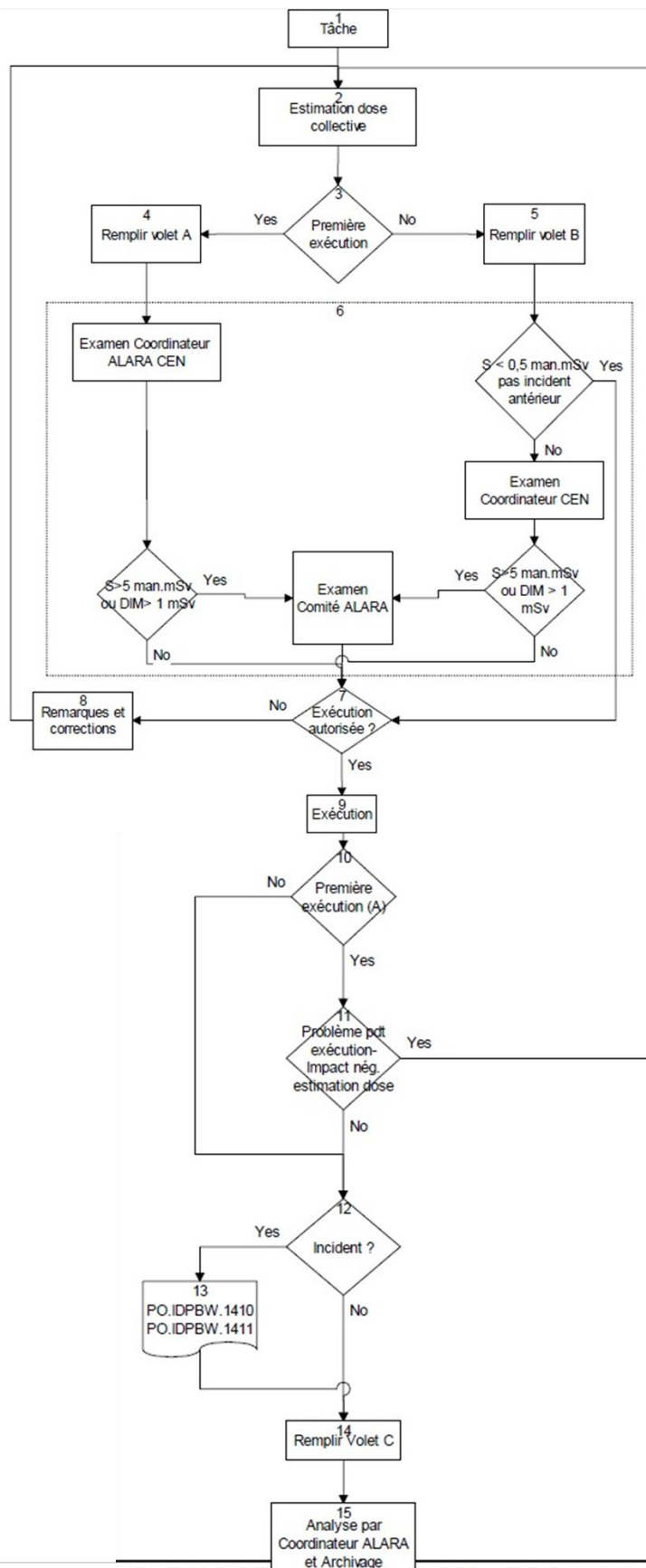
- a) La dose collective < 0.5 Homme.mSv
La nécessité de remplir le volet A est évaluée par le comité ALARA local. Après évaluation, des remarques ou des corrections à la procédure technique sont prescrites au demandeur si cela est indispensable (8).
- b) La dose collective est entre 0.5 Homme.mSv et 5 Homme.Sv
Il est nécessaire de remplir le volet A. Après évaluation, des remarques ou des corrections à la procédure technique sont prescrites au demandeur si cela est indispensable (8).
- c) La dose collective > 5 Homme.mSv et la dose individuelle maximale >1mSv
Le volet A est évaluée par le comité "ALARA et Sécurité". Ce comité est composé de représentants des différents départements et services. Le comité fait des recommandations et propose, sous des conditions qui doivent être définies plus avant, les options les plus applicables parmi celles proposées par le demandeur.

L'exécution de la tâche est alors autorisée ou non (7).

Lors de l'exécution (9), si un problème (11) ou un incident est survenu (12), la tâche est réévaluée. De plus suivant l'incident d'autres mesures sont à prendre (13).

Après chaque exécution, le volet C est rempli (reprenant l'évaluation de l'exécution)(14).

Les volets A, B et C constituent donc la banque de donnée.



Partie pratique

6. La procédure technique

Avant d'écrire la procédure technique, plusieurs points doivent faire l'attention du demandeur. Ceux-ci peuvent être résumés comme suit:

- Identification de la source radioactive
- Détails sur son utilisation
- Localisation des lieux d'expérimentation
- Règlements
- Détails sur le processus des manipulations
- Personnes concernées

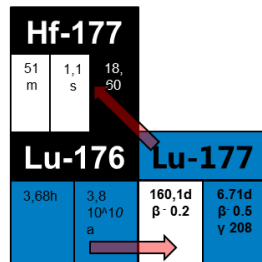
a) Identification de la source radioactive

Le but étant d'évaluer le couplage des aptamères avec le ^{177}Lu . La source de rayonnement ionisant est évidemment le radioisotope ^{177}Lu .

Deux méthodes de fabrication existent. La voie directe et la voie indirecte.

La voie directe consiste à produire le ^{177}Lu par activation neutronique du ^{176}Lu .

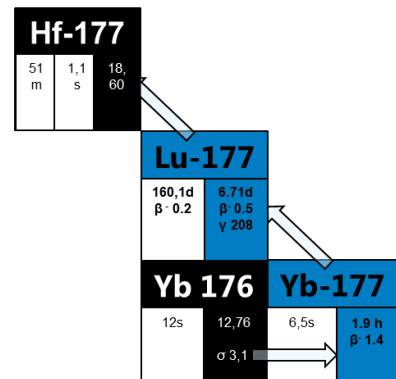
$\text{Lu-176}(n,\gamma) \rightarrow \text{Lu-177}$



Cette voie a été préconisée dans la procédure technique de 2010. L'inconvénient de la voie directe est la fabrication systématique de l'isotope métastatique ^{177m}Lu qui a une durée de vie de 160 jours. Cela a pour conséquence de devoir prendre des précautions supplémentaires au niveau de la gestion des déchets radioactifs.

La voie indirecte consiste à produire le ^{177}Lu par activation neutronique du ^{176}Yb .

$\text{Yb-176}(n,\gamma) \rightarrow \text{Yb-177}(\beta\text{-decay}) \rightarrow \text{Lu-177}$



Cette voie à l'avantage de ne pas produire de ^{177m}Lu et de réduire la problématique de la gestion des déchets radioactifs. Cette voie est recommandée pour cette procédure. Il a donc fallu trouver un producteur étant donné que le SCK•CEN n'en est pas un. La compagnie ITG GmbHs (Isotope Technologies Garching) a été choisie. Celle-ci envoie le radioisotope sous forme de LuCl_3 dissous et stabilisé dans une solution de HCl 0.04M.

Les **caractéristiques radiologiques** du produit qui sont données par la compagnie sont les suivantes:

-Demi-vie:	6.71 jours
-Rayonnement γ (KeV):	208 (11%) and 113 (6%)
-Rayonnement β (KeV):	175 (12.3%), 380 (9%) and 497 (78.7%)
-Pureté du radionucléide:	< 0.1% (pureté Isomère < 10^{-7} (^{177m}Lu))
-Pureté radiochimique:	> 99% sous forme $^{177}\text{LuCl}_3$
-Activité spécifique:	> 3000 GBq/mg au moment de la calibration
-Activité totale:	1.5 – 300 GBq/ml au moment de la calibration
-Emballage:	fiolle conique en verre de 2mL avec fermeture en silicone

Le produit brut délivré est appelé solution stock. De celle-ci, différentes solutions (appelées solutions de travail) sont préparées au fur et à mesure que les expériences sont effectuées. Etant donné que l'activité de la solution stock diminue au cours du temps, il est nécessaire que son activité initiale soit suffisante pour pouvoir effectuer toutes les expériences. Un achat regroupant des livraisons successives dans le temps est effectué afin de diminuer l'activité initiale de la solution stock. Ce qui a pour conséquence une diminution du débit de dose de la solution stock.

b) Détails sur son utilisation et c) Localisation des lieux d'expérimentation

Experimental step	location	type zone
Labeling + separation	lab 70 - SCH	monitored area (yellow)
TLC analysis	lab 70 - SCH	monitored area (yellow)
HPLC analysis	lab 70- SCH	monitored area (yellow)
Gamma-measurements	RCA labs	normal + monitored area (yellow)
Stability studies	lab 70 - SCH	monitored area (yellow)
ELISA/ Binding studies	BIS - GKD	monitored area (yellow)
Toxicity studies	BIS - GKD	monitored area (yellow)
Internalization assay	BIS - GKD	monitored area (yellow)

Ce tableau résume les différentes expériences qui ont pour but d'évaluer le couplage (détaillé dans l'annexe 1) ainsi que les lieux où s'effectueront les expériences.

d) Règlements

La réglementation de A.R.20/07/2001, impose différents points. Ceux-ci comprennent la justification des pratiques, les limites de dose, l'application du principe ALARA, le transport de matières radioactives, la gestion des déchets et bien d'autres. Il en faut donc une bonne compréhension.

Le SCK•CEN a également établi une contrainte de dose de 10mSv/12 mois consécutifs glissants qu'il faut respecter. De plus différentes procédures internes ont été rédigées afin de non seulement respecter la réglementation mais également de garantir son application.

e) Détails sur le processus des manipulations

Ces détails permettent de non seulement d'identifier et de minimiser les risques (radiologiques et non radiologiques) mais également d'avoir une estimation du temps nécessaire à l'exécution des expériences.

Identification et minimisation des risques

Cela amène à une check-list qu'il faut suivre avant, durant et après l'expérience.

Avant l'expérience :

-Vérifier les procédures d'entrée en zone, de sortie de zone et celles qui sont nécessaire aux expériences.

Cette vérification permet de s'assurer que le manipulateur a une connaissance suffisante de sa tâche et des mesures qui sont à entreprendre en cas d'incident.

-Evaluation des risques.

Cette évaluation permet de connaître les précautions qui peuvent être prises pour éviter tout incident et de diminuer ainsi les risques. Les risques peuvent être de nature radiologique ou non radiologique.

-S'assurer que tout le matériel est présent.

Il est essentiel de ne pas devoir courir de droite à gauche pour un outil ou devoir effectuer plusieurs entrées et sorties de zone dû à un oubli.

-S'assurer que les personnes concernées sont présentes et accessibles en cas d'incident.

Une liste de personne de contact doit être accessible et à jour. Cette liste doit également être élaborée de telle façon que les absences soient couvertes.

-Le temps.

Le temps est un des outils qui permettent de diminuer l'exposition aux rayonnements ionisants. Plus le temps est court, plus faible est la dose que le manipulateur reçoit. Il est donc important d'avoir une estimation du temps correct tout en laissant une marge pour les imprévus.

-Équipement de protection personnel.

Connaissant les risques, les équipements de protection personnelle adéquats peuvent être choisis. Les tabliers (dont les colliers sont de même couleur que la zone de travail), les gants et les lunettes de protections sont les équipements de protection standard.

-Port du dosimètre personnel, d'un dosimètre électronique et de dosimètres aux doigts.

Ces dosimètres permettent de connaître les doses reçues et de respecter ainsi les limites et la contrainte de dose. Le dosimètre électronique est à lecture directe et contient une alarme sonore lorsque le débit de dose atteint un certain seuil. Les dosimètres aux doigts (un pour chaque main) sont importants pour mesurer la dose reçue aux extrémités et à la peau.

-Port approprié de vêtement et règles de bonne pratique.

Étant donné que les expériences sont principalement effectuées en zone surveillée, le port d'équipement vestimentaire particulier n'est pas obligatoire. Néanmoins le port de short, jupe et chaussures ouvertes est interdit. De plus toutes nourritures ou boissons le sont aussi. Ces précautions sont mises en place pour éviter les contaminations internes et les contaminations externes sur la peau.

-Prévoir les containers pour la gestion des déchets.

La connaissance des types de déchet qui sont générés lors des expériences permet une gestion plus efficace de ceux-ci. Un triage est souvent nécessaire, il est donc important de s'assurer que les différents containers sont présents.

Durant l'expérience :

-Travailler sur une surface propre et bien définie.

Le travail est effectué sous une hotte chimique (ceci augmente la sécurité du manipulateur et est une précaution supplémentaire pour les étapes où les solutions doivent être chauffées).

-Protéger la surface de travail.

Dans notre cas la surface de travail est protégée par un bac de récupération. De plus du papier absorbant tapisse cette surface. Il ne faut pas oublier que les volumes qui sont préparés n'excèdent pas quelques millilitres. De ce fait la quantité de papier absorbant est calculée pour pouvoir au minimum absorber toute la solution de travail.

-Utiliser un blindage pour la solution stock et les solutions de travail.

Ceci permet d'éviter les expositions inutiles.

-Etiquetage des solutions radioactives.

Il est important que chaque solution radioactive possède un étiquetage approprié. Au SCK●CEN, nous avons des étiquettes jaunes qui reprennent toutes les informations importantes (Annexe III).

-Vérification de la contamination.

Si le temps des manipulations est long, il est préférable de vérifier régulièrement si il y a une contamination aux mains et aux pieds.

-Apparition d'une contamination.

Si une contamination est établie, il faut réagir immédiatement et procéder à la décontamination le plus vite possible.

-Ne jamais utiliser les mains pour manipuler les sources (solution stock) radioactives.

-Ne jamais pipeter avec la bouche.

-Appliquer une bonne hygiène de laboratoire.

Après l'expérience :

-Etiquetage des solutions radioactives.

Il faut s'assurer que toutes les solutions soient bien étiquetées.

-Stockage des solutions radioactives.

Le stockage du matériel radioactif se fait dans un local bien précis. Il faut donc ramener les solutions utilisées au local de stockage. Ceci est effectué par le responsable du local de stockage.

-Enlever les déchets radioactifs et vérifier sa gestion.

-Enlever son tablier et laver ses mains.

Les tabliers sont régulièrement contrôlés et nettoyés.

-Contrôle de la contamination.

Les mains et les pieds sont contrôlés avant de sortir en zone. Suivant le type de radioisotope et le type d'expérience, une anthropogammamétrie sera effectuée. Faire également attention au matériel sortant de zone. Celui-ci doit également être contrôlé.

Estimation du temps et du débit de dose

Afin d'avoir une estimation du temps correct et de s'assurer de l'exactitude de la procédure technique, l'expérimentation à froid est un avantage. De plus il est possible de calculer le débit de dose théorique que le manipulateur peut recevoir.

Le tableau suivant résume l'estimation théorique de la dose individuelle, sans blindage, qu'un manipulateur reçoit lors de l'exécution des différentes expériences. Un temps théorique de 2.5 heures pour chaque manipulation est utilisé. Ces 2.5 h sont divisés comme étant 5 minutes au contact (1cm), 60 minutes à 30cm (distance de travail) et 90 minutes à 100cm (distance de contrôle) de la source.

Experimental step	Activity	Dose rate/ experiment		# Experiments	Total dose rate	
		5' in contact	1h at 30cm + 1h30 at 1m		5' in contact	1h at 30cm + 1h30 at 1m
Labeling/ separation	50 MBq	141.7 μ Sv	2.155 μ Sv	10	1.42 mSv	21.55 μ Sv
TLC analysis	1 MBq	2.8 μ Sv	0.0431 μ Sv	30	84 μ Sv	1.293 μ Sv
HPLC analysis	30 kBq	0.85 μ Sv	0.01293 μ Sv	30	25.5 μ Sv	0.3879 μ Sv
γ -measurements	10 MBq	28.3 μ Sv	0.431 μ Sv	30	849 μ Sv	12.93 μ Sv
Stability studies	10 MBq	28.3 μ Sv	0.431 μ Sv	30	849 μ Sv	12.93 μ Sv
ELISA	10 MBq	28.3 μ Sv	0.431 μ Sv	30	849 μ Sv	12.93 μ Sv
Binding studies	10 MBq	28.3 μ Sv	0.431 μ Sv	30	849 μ Sv	12.93 μ Sv
Toxicity studies	10 MBq	28.3 μ Sv	0.431 μ Sv	30	849 μ Sv	12.93 μ Sv
Internalization assay	10 MBq	28.3 μ Sv	0.431 μ Sv	30	849 μ Sv	12.93 μ Sv
TOTAL					6.623 mSv	100.8 μSv

N'ayant pas reçu l'accès au Volet C des expériences de 2010, il a été choisi de reprendre les valeurs théoriques des débits de dose. Malheureusement cela nous empêche d'effectuer une évaluation correcte des manipulations précédentes dû au manque de retour d'expérience. La raison pour laquelle nous n'avons pas eu accès à ces informations est dû au fait que seul les coordinateurs ALARA ont un droit d'accès à la banque de donnée.

Concernant les calculs de débit de dose, le programme Nuclides 2000 a été utilisé. Ce programme donne différentes informations concernant les radionucléides : pour le ^{177}Lu

Activité spécifique : $4.07 \times 10^{15} \text{ Bq/g}$

Débit de dose gamma spécifique (1m) : $1,4 \times 10^7 \mu\text{Sv/gh}$

Pour 1MBq nous avons donc une activité spécifique de 4.07×10^9 Bq/g ce qui donne un débit de dose à 1m de : $\frac{1.4 \times 10^7}{4.07 \times 10^9} = 0.34 \times 10^{-2} \mu\text{Sv/h}$.

Le calcul incluant la distance se résume par la règle du carré de la distance ($1/r^2$ r=distance en mètre) considérant la source comme étant ponctuel. Cette méthode de calcul est un choix simpliste. Une estimation plus strict peut également être effectuée.

Nous arrivons ainsi pour les différentes distances (pour une source de 1MBq) :

Au contact (1cm) :	34 $\mu\text{Sv/h}$.
A 30cm :	0.038 $\mu\text{Sv/h}$
A 100cm :	0.0034 $\mu\text{Sv/h}$

Il est cependant très important de vérifier cette hypothèse (surtout pour celle au contact) avec des mesures réelles.

f) Personnes concernées

La procédure technique sera effectuée par Arnaud Campsteyn (32 48) et Marlies Gijs (23 86). Suivant le temps et le débit de dose de chaque expérience un système de shifts peut être envisagé. Marlies Gijs a une expérience limitée de l'emploi de matériel radioactif. Pour cela une formation ("Safe handling of radioactive material") sera donnée par le personnel RCA (RadioChemical Analysis group) avant toute expérience. Lors de la première exécution, les manipulations seront supervisées par un membre du groupe RCA. Celle-ci sera suivie d'une évaluation afin de décider si les personnes concernées sont aptes à travailler avec des substances radioactives de manière indépendante.

De plus Arnaud Campsteyn (en 2007) et Marlies Gijs (en 2011) ont suivis le cours d'isRP du SCK•CEN.

Il est également important pour tout manipulateur d'avoir une liste des personnes de contact ainsi que d'avoir leur numéro de téléphone.

Responsables de laboratoire:

- SCH lab 70: Lesley Adriaensen (32 26)
- BIS-GKD labs 1011-1013-1017-1021: May Van Hees (21 05)

Responsables de transport:

- Eddy Kox (Contrôle physique) (32 03)
- Peter Mutert (Contrôle physique) (26 36)
- Carlo Stevens (Responsable ADR) (27 68)
- Frank Vanderlinden (Coordinateur de transport) (24 26)

Coordinateur ALARA CEN:

- Philippe Antoine (responsable du service contrôle physique) (28 56)

Coordinateurs ALARA locaux :

- Mireille Gysemans (32 80)
- May Van Hees (21 05)

Responsables de décontamination:

- Dadoumont Jérôme (Responsable du groupe de décontamination et de démantèlement) (26 62)
- Kurt Van den Dungen (Responsable des processus de décontamination et de nettoyage) (26 83)

Directeur des groupes d'expertise:

- EHS / RDB: Sarah Baatout (27 29)
- EHS / BIS: Hildegard Vandenhove (21 14)
- NMS / RCA: Mireille Gysemans (32 80)

Responsable projet:

- Nathalie Impens (28 45)

7. Aspect supplémentaire de la radioprotection

La préparation d'une procédure technique ne doit pas être restreinte à l'application du principe ALARA. Elle doit également prendre en compte les autres aspects de la radioprotection tel que le transport, les scénarios d'urgence, les blindages et la gestion des déchets.

I. Transport

Dans la procédure technique il est décrit que la solution stock ou les solutions de travail sont utilisées à différents endroits. Pour cela il faut prendre des précautions concernant leur transport.

Le transport externe au SCK•CEN:

Celui-ci n'est pas prévu au sein de cette procédure technique. Si cela devait se faire, la réglementation de l'ADR serait alors d'application.

Le transport interne :

À l'arrivée du produit radioactif, trois personnes doivent être présentes: Le demandeur, le coordinateur de transport et le service de contrôle physique. La procédure PL.IDPBW.0152 sera suivie avec le remplissage du document 151. Ce document résume toutes les informations de la source pour une traçabilité correcte ainsi que son identification chimique, physique, etc.

Un premier contrôle est visuel. Il est alors suivi d'une vérification de la contamination surfacique (frottis) et du débit de dose. Ceux-ci sont effectués par le contrôle physique.

La source est délivrée dans une enceinte blindée complétée d'une signalisation adéquate.



Le produit est alors stocké, à température ambiante, dans un local spécifique avec une carte d'identification (Annexe III).

Pour un transport ultérieur deux cas de figure peuvent se présenter :

Si le débit de dose est supérieur à 2mSv/h au contact, un nouveau document 151 est rédigé. Le transport est alors effectué par un véhicule ayant des lampes orange pour signaler le danger. De plus si la source doit être stocker pour une raison ou une autre dans un emplacement accessible à tous les travailleurs, un périmètre de sécurité doit être établi avec la signalisation adéquate.

Si le débit de dose est inférieur à 2mSv/h, le contrôle physique peut transférer le colis sans restrictions additionnels tout en gardant la traçabilité de la source.

II. Scénario

Pour une question de sûreté et de sécurité, il est intéressant d'inclure des scénarios d'urgence pour s'assurer que les personnes concernées connaissent les mesures à prendre en cas d'incident.

Nous allons ici prendre le cas d'une contamination. Si une contamination est suspectée, voici les différentes mesures à effectuer :

1. Aviser l'agent local du contrôle physique pour qu'il puisse contrôler, surveiller et conseiller.
2. Commencer avec la procédure de décontamination le plus vite possible.
3. Eviter les contaminations croisées (dispersion) : Pour les mains, éviter de toucher d'autres objets ou la personne elle-même. Pour les pieds, éviter les déplacements inutiles.
4. Localiser la contamination.
 - Si elle est externe, laver 2x la zone avec de l'eau ou un détergent adéquat. Si la contamination persiste, contacter le service médical pour conseil.
 - Si elle est interne, le service médical avisera si une anthropogammamétrie ou d'autres actions sont nécessaire.
 - Si elle est sur une surface, utiliser du papier absorbant et vérifier le degré de contamination (effectué par le contrôle physique).

Le contrôle physique évaluera alors la situation et décidera si d'autres mesures sont d'application (périmètre de sécurité, blindage, décontamination, etc.).

Dans le cas de notre procédure technique, le travail est effectué avec des petits volumes, sous hotte et dans un bac de récupération (tapissé de papier absorbant). Le plus grand risque de contamination est au niveau des gants. Le manipulateur doit donc apporter une attention particulière à ce point pour éviter toute dispersion de la contamination.

Lorsqu'une contamination surfacique ne peut être résolue par la seule application de papier absorbant, un agent chélateur bifonctionnel (DTPA =diethylenetriamine pentaacetic acid), connu pour complexer le lutétium, peut-être utilisé.

III. Blindage

Le blindage est un outil supplémentaire au temps et à la distance pour maximiser la réduction de l'exposition aux rayonnements ionisants.

Dans notre situation, le ^{177}Lu est un émetteur β et γ . Il est possible de calculer les facteurs d'atténuation suivant le blindage que nous voulons appliquer.

Concernant les rayonnements β , il est possible de calculer leurs parcours par la relation :

$$R = 0.543E_{\text{max}} - 0.133 \text{ avec } E_{\text{max}} \text{ en Mev et } R \text{ en gr/cm}^2$$

Dû à la configuration de la fiole, il faut prendre en compte l'atténuation de deux fois l'épaisseur du verre et de la distance dans l'air.



Nous émettons l'hypothèse que le rayonnement bêta est absorbé par la fiole.

Concernant le rayonnement gamma, nous avons décidé d'ajouter un petit mur de plomb (brique de $\pm 5\text{cm}$ d'épaisseur) autour de la surface de travail pour réduire la dose reçue par le manipulateur.

	Half Value Layer (HVL)	Tenth Value Layer (TVL)
	lead	lead
γ	0,6 mm	2,1 mm
	plexiglas	
β	0,135 cm	

Grâce aux valeurs d'atténuation venant du « Material Safety Data Sheet » du ^{177}Lu , nous pouvons dire que l'atténuation due au mur de plomb est d'un facteur équivalent à 23 TVT.

Les extrémités sont alors les parties les plus exposées.

IV. Gestion des déchets

Les déchets qui seront générés sont essentiellement solide (plastic, gants, papier absorbant, instrument tranchant) et liquide (solutions aqueuses). Le liquide venant de l'utilisation de petit volume (tranche de 2mL au maximum), peut être versé sur le papier absorbant éliminant ainsi les déchets liquides.

Ayant opté pour la voie indirecte de la production du ^{177}Lu , nous n'avons pas à nous préoccuper du $^{177\text{m}}\text{Lu}$. De ce fait la demi-vie du ^{177}Lu étant de 6.71 jours, nous pouvons stocker les déchets jusqu'à leur libération. Un déchet contenant du ^{177}Lu peut être libéré si son activité spécifique est inférieure à 10KBq/Kg. Une attention particulière est faite pour les objets tranchants au niveau de la sécurité ainsi qu'au niveau du choix du container de stockage. A leur libération, les déchets sont repris comme déchets biologiques.

Conclusion

8. Conclusion

La procédure interne pour l'application du principe ALARA est un élément clé à l'exécution de l'A.R.20/07/2001. Elle est également un outil de radioprotection d'une grande importance.

Dans ce travail, nous avons donc pu parcourir les points qui doivent être pris en considération afin de manipuler correctement le radioisotope ^{177}Lu dans le cadre des expériences prévues dans le projet CATAMARAN.

Malheureusement dû à un accès restreint, le retour d'expérience venant de la procédure de 2010 n'a pas pu être inclus dans ce travail. Néanmoins les échanges avec les différentes personnes qui ont été impliquées dans la procédure précédente ont permis d'acquérir une connaissance globale du sujet et de mettre en évidence certaines améliorations.

La gestion des déchets radioactifs est importante au point de vue financier et environnemental. L'utilisation du radioisotope produit par la voie indirecte a dès lors plusieurs avantages. Elle permet une **gestion des déchets plus efficace** étant donné que l'élimination du radioisotope métastable permet de stocker les déchets pendant une période raisonnable pour ensuite les libérer. De plus l'application future de ces produits radiopharmaceutiques sur des patients évite d'imposer aux patients et aux hôpitaux des inconvénients (tel qu'un séjour plus long à l'hôpital, une nécessité d'interdiction de rejet d'excréments aux égouts, un blindage supplémentaire à la tuyauterie et bien d'autres).

Une **contamination systématique des gants**, lors de l'ouverture des tubes eppendorfs, peut être **évitée** en centrifugeant rapidement (spin down) les tubes avant leur ouverture.

La procédure technique que le coordinateur ALARA CEN évalue ne comprend pas la gestion des déchets, les scénarios d'incidents, le transport ou une liste de personne de contact. La rédaction de ce travail prenant compte de ces aspects et faisant ressortir une **vue d'ensemble de la radioprotection** est un avantage.

Il est également suggéré d'effectuer toutes les manipulations à froid (avec du lutétium stable). Ceci afin de non seulement permettre d'optimiser les protocoles expérimentaux et de familiariser le manipulateur avec les procédures mais également d'établir une estimation du temps plus exact pour chaque expérience. De plus les calculs de débits de dose théoriques doivent être vérifiés par des mesures réelles avant les manipulations.

Annexe I: Détails du protocole technique

Experiments in monitored area of building SCH

Location: lab 70

An aptamer, coupled to a bifunctional chelator, is labelled with the ^{177}Lu radionuclide in solution at elevated temperature. Synthesis of the radionuclide labelled molecule and its analysis are described in the following paragraphs.

Synthesis and separation

Equipment to be placed in lab 70:

--Note: Pictures of all specific lab equipment/ materials at the end of the document--

- Vortex
- Spin down instrument for eppendorf
- Centrifuge
- Hot water Bath

Specific disposable material for separations:

- Sized-based concentrator
- Nap-5 columns / Sep-Pak columns

Procedure:

(Note: This procedure is already tested with non-radioactive Lu)

- Addition of ^{177}Lu aliquot to an eppendorf tube containing the antibody and reagents with pipet.
- Heating of mixture in the closed tube in a hot water bath ($< 100^\circ\text{C}$, ≤ 2 h).
- After cooling, addition of complexing agent to quench unreacted ^{177}Lu with pipet.
- Separation of quenched ^{177}Lu and labelled aptamer by use of disposable Nap-5 or Sep-pak columns or disposable size-based concentrators (requires centrifugation).
- Transfer of the labelled product in storage buffer to an eppendorf tube for storage.

Remark: Every step where the mixing of the eppendorf is needed, it will be followed by a spin down to avoid the creation of aerosols by opening the eppendorf.

Radioactivity:

- ≤ 50 MBq/ experiment
- Maximum one experiment running.
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

Analysis

Two types of analysis procedures for characterization of the product and evaluation of the labeling yield will be performed:

- High pressure liquid chromatography (HPLC)
- Thin layer chromatography (TLC)

HPLC

The procedure for HPLC is further described.

TLC

Thin layer chromatography (TLC) is a chromatography technique performed on a sheet of glass, plastic, or aluminium foil, which is coated with a thin layer of adsorbent material, usually silica gel, aluminium oxide, or cellulose. This layer of adsorbent is known as the stationary phase. After the sample has been applied on the plate, a solvent or solvent mixture (known as the mobile phase) is drawn up the plate via capillary action. Because different analytes ascend the TLC plate at different rates, separation is achieved.

Equipment to be placed in lab 70:

- TLC development chamber
- Gamma counter

Specific disposable material for separations:

- Silica gel TLC sheets

Procedure:

- Addition of a droplet of ^{177}Lu aptamer solution at the bottom of the TLC sheet
- Transfer of the sheet to the development chamber (with glass lid), which contains the mobile phase solution (1 -2 cm)
- When the mobile will have reached the top of the sheet, the sheet will be dried in the hood.
- The dried sheet is then cut into two pieces and the radioactivity in each piece is measured by use of a gamma counter. As such, the percentage of non-incorporated ^{177}Lu can be calculated.

Radioactivity:

- ≤ 1 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

In vitro stability studies

Equipment to be placed in lab 70:

- Heating block / Oven

Procedure:

- ^{177}Lu antibody will be incubated in closed eppendorf tubes at different temperatures (e.g. room temperature, 37°C), in different media (e.g. PBS, Ammonium acetate buffer, human serum) and during different time periods.
- Stability of the product will then be assessed via HPLC (3.1.2.1) and TLC (3.1.2.2). Subsequent biological characterization will be performed as described in section 6.

Radioactivity:

- ≤ 10 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

Analysis of radiolabelled aptamer by HPLC

Chromatography is the collective term for a set of laboratory techniques for the separation of mixtures. It involves passing a mixture dissolved in a mobile phase through a stationary phase, which separates the analyte to be measured from other molecules in the mixture based on differential partitioning between the mobile and stationary phases. Subtle differences in compounds partition coefficient results in differential retention on the stationary phase and thus in the separation of the compounds in the mixture.

Equipment to be placed in lab 70:

- HPLC device.
- Columns, e.g. Superdex 75 (gel filtration) and C4/ C18-columns (reversed phase HPLC).
- Injection syringe
- Gamma counter

Procedure:

- Equilibration of the column with suitable buffer solutions that will be collected as waste.
- Transfer of the radiolabelled aptamer from the storage eppendorf tube to the HPLC injection syringe (250µL max) by aspiration.
- Injection of the sample (squeeze fluid in sample injector). Excess of injected sample will automatically be collected as waste in a closed recipient.
- Automatic transport of the sample through the HPLC system (sample loop, column, detector, and all connecting tubes) using a suitable mobile phase solution.
- The mobile phase solution (containing the ¹⁷⁷Lu-labelled aptamers) will be either collected as waste or collected in separated fractions for further analysis (see 2nd next step).
- Cleaning the system with appropriate solutions that will be collected as waste.
- Off-line measurement of retained fractions with a gamma counter.
- Waste will be regularly pooled, collected and stored in room 66.

Radioactivity:

- ≤ 30 kBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

Additional measures that will be taken:

- The collection of fractions at the end of column will be done in plastic scale with paper inside to collect any spills that might occur.
- The effluents from washing and eluting the column are collected in a flask (≥ 1 liter) also placed in a plastic scale with paper.
- The amount of activity in the waste collection + fractions in lab 70 will be < 2 MBq at any given moment.
- During the analysis experiments a distinct labeling will be put on the HPLC equipment indicating that ¹⁷⁷Lu is being analyzed. Also the collection flasks for the fractions and the effluent flask will be distinctly labelled to indicate that ¹⁷⁷Lu is present.
- The effluents and collected ¹⁷⁷Lu fractions will be transferred to the storage lab 66 for decay and elimination or awaiting further analyses with LSC or gamma-measurement.

Experiments in the Monitored Zone of Building BIS-GKD

Location: labs 1011-1013-1017-1021

Biological characterization of the radiolabelled aptamer will be performed as described in following paragraphs.

For these experiments, ^{177}Lu -labelled samples will be transported from SCH building to GKD building (see Annex 2). Per two weeks, a maximum of 60 MBq will be transported (1x 60 MBq, or 3 x 20 MBq).

(Cell-)ELISA

Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) is a biochemical technique to detect the presence of an antibody/ antigen in a sample.

Equipment to be placed in labs BIS-GKD:

- Spectrophotometer
- Cell Incubator / Oven
- Laminar flow

Procedure ELISA:

- Coating 96-well microtiterplates (max of 300 μL /well) with the antibody antigen (overnight at 4°C, or 2h at 37°C) and blocking residual protein binding sites to prevent non-specific binding (2h at 37°C). *Can be performed in normal zone.*
- Addition of a dilution series of the radiolabelled aptamers (in solution) to the plates by pipetting (1h at room temperature).
- Addition of a solution with detector molecules in three separated steps (each \leq 1h at room temperature).
- After each incubation step, plates are washed three times by adding and removing wash buffer using a pipet. All discarded solutions will be collected as waste.
- Measurement by use of a spectrophotometer.
- Waste will be collected and stored until it can be discarded as non-radioactive, but still "suspicious" waste ($T_{1/2} = 6.7$ days) after measurement of the left amount of radioactivity.

Procedure cell-ELISA:

- Cells are seeded and cultured in 96-well cell culture microtiterplates (max 300 μL /well). Subsequently, cells are washed and fixed. *Can be performed in normal zone.*
- Further steps of the assay are performed as described above (starting from "Addition of radiolabelled aptamers...").

Radioactivity:

- ≤ 10 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

Alternative binding assays

Equipment to be placed in labs BIS-GKD:

- Cell Incubator / Oven
- Laminar flow
- Gamma counter

In vitro specificity & estimation of dissociation constant Kd

Procedure:

- Coating 96-well microtiterplates (max of 300 μ L/well) with the antibody antigen (overnight at 4°C, or 2h at 37°C) and blocking residual protein binding sites to prevent non-specific binding (2h at 37°C). Or, alternatively: Cells are seeded and cultured cell in culture plates and subsequently washed and fixed. *Can be performed in normal zone.*
- Addition of a dilution series of the radiolabelled aptamer (in solution) to the plates by pipetting (≤ 2 h at room temperature or on ice). Non-specific binding will be studied by adding an excess of unlabelled antibody (saturation of antigen) to some wells.
- Washing off the cells to remove unbound ^{177}Lu by pipetting.
- Transfer of detached cells into a counting tube for measurement with gamma counter.
- All discarded solutions will be collected as waste.
- Specific binding can be calculated from the results for total and non-specific binding. Kd can be calculated from a non-linear regression fit from a plot specific binding vs concentration of added radiolabelled antibody.

Radioactivity:

- ≤ 10 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

In vitro competition

Procedure:

- Instead of adding unlabelled aptamer, antigen binding sites will be saturated by addition of an excess of the possible competitor.

Radioactivity:

- ≤ 10 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

In vitro toxicity analysis

Absorbance of a converted dye by a specific enzyme in viable cells is measured spectrophotometrically.

Equipment to be placed in labs BIS-GKD:

- Cell Incubator/ Oven
- Laminar flow
- Spectrophotometer

Procedure:

- Cells are seeded and cultured in 96-well cell culture microtiterplates (max 300 μ L/well). Subsequently, cells are washed and fixed. *Can be performed in normal zone.*
- Addition of a dilution series of the radiolabelled aptamers (in solution) to the cells by pipetting (≤ 48 h at 37°C or room temperature).
- Addition of enzyme substrate (2-4 h at 37°C) and mixing by pipetting up and down (2-4 h at 37°C).
- Measurement by use of a spectrophotometer.
- Discarded solutions will be collected as waste.

Radioactivity:

- ≤ 10 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

Internalization assay

Internalization studies are based on the fact that, under harsh conditions (e.g. acid treatment) peptide that is loosely bound to the membrane dissociates from it to the extracellular solution.

Equipment to be placed in labs BIS-GKD:

- Cell Incubator/ Oven
- Laminar flow
- Gamma counter

Procedure:

- Addition of a dilution series of the radiolabelled aptamers (in solution) to the cells (≤ 3 h at 37°C or room temperature) by pipetting.
- Addition of solution for dissociation of the peptide from the cell membranes.
- Collection of the supernatants by centrifugation. To this solution, also the supernatant of additional wash steps is added.
- Solubilisation of cells by the addition of solubilisation solution.
- Measurement of activity in the supernatants (non-internalized activity) and in the solubilized cells (internalized activity) with gamma counter.
- Discarded solutions will be collected as waste.

Radioactivity:

- ≤ 10 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

In vitro stability studies

Equipment to be placed in labs BIS-GKD:

- Freezer/ refrigerator

Procedure:

- ^{177}Lu antibody will be incubated in closed eppendorf tubes at different temperatures (e.g. -20°C, 4°C), in different media (e.g. PBS, Ammonium acetate buffer, human serum) and during different time periods.
- Stability of the product will then be transported to SCH building and be assessed via HPLC and TLC in SCH building lab 70 as described in 3.1.2.1 and 3.1.2.2. Subsequent biological characterization will be performed as described in section 6.

Radioactivity:

- ≤ 10 MBq/ experiment
- For dose rate levels, see Table 1
- Experiments will be performed by Arnaud Campsteyn and Marlies Gijs.

Annexe II: Références

Articles:

- M.R.A. Pillai et al. - 2003 - : *Production logistics of ^{177}Lu for radionuclide therapy*, Applied Radiation and Isotopes 59
- Pestourie et al. - 2005 - *Aptamers against extracellular targets for in vivo applications*, Biochimie
- Maecke - 2005 - Abstract book of EANM'05 Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine
- Das et al. - 2007 - *On the preparation of a therapeutic dose of ^{177}Lu -labeled DOTA-TATE using indigenously produced ^{177}Lu in medium flux reactor*, Appl Radiat Isot
- Z. Dvorakova et al. - 2008 - *Production of ^{177}Lu at the new research reactor FRM-II: Irradiation yield of $^{176}\text{Lu} (n,\gamma)\rightarrow^{177}\text{Lu}$* , Applied Radiation and Isotopes 66
- Majumder et al. - 2009 - *Aptamers: from bench side research towards patented molecules with therapeutic applications*, Expert Opin Ther Patents
- Hens et al. - 2009 - *Labeling internalizing anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody with (^{177}Lu): in vitro comparison of acyclic and macrocyclic ligands*, Nucl Med Biol
- Mezo G et al. - 2010 - *Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones*, Expert Opin Drug Deliv.
- PerkinElmer : Lutetium-177 Handling Precautions
- Nuclide Safety Data Sheet :Lutetium-177

Livres :

- Baverstock K.F., Stather J.W., *Low dose-Biological bases of risk assessment*, Taylor & Francis, London, 1989, p227-253
- Firestone et al. - 1996 - *The 8th edition of the Table of Isotopes*
- Vanmarcke H. et al. - 1996 - *Rayonnements ionisants*, ONDRAF
- IAEA 2002 Safety Reports Series n21: *Optimization of Radiation Protection in the Control of Occupational Exposure*
- Eisenhut and Mier, Mäcke and Good, Zalutsky - 2003 - *Handbook of Nuclear Chemistry, Volume 4, Radiochemistry and Radiopharmaceutical chemistry in life sciences*, volume editor: F. Rösch
- IUPAC - 2003 - Pure Appl. Chem., Vol. 75, No. 6, pp. 683–800
- IAEA - 2007 - Technical report: *Comparative evaluation of therapeutic radiopharmaceuticals*

Sites internet:

- <http://www.cea.fr/jeunes/themes/la-radioactivite/la-radioactivite/definition-de-la-radioactivite>
- <http://www.fanc.fgov.be/fr/page/hoofdstuk-i-algemene-bepalingen/232.aspx>
- <http://www.cepn.asso.fr/IMG/pdf/R254.pdf>
- http://www.iaea.org/Publications/Magazines/Bulletin/Bull225_6/French/225_605041322_fr.pdf
- <http://iopscience.iop.org/0952-4746/20/1/001/>

<http://iopscience.iop.org/0952-4746/16/3/019>

<http://www-ns.iaea.org/tech-areas/communication-networks/norp/documents/faq-list-french.pdf>

<http://www.itg-garching.de/>

Présentations power point :

- Philippe Antoine - Retour d'expérience sur l'application de la procédure ALARA au SCK•CEN
- Mireille Gysemans - Safe handling of radioactive material





Cours :

- Isabelle Gerardy - 2011 - Physique des radiations
- Isabelle Gerardy - 2011 - Dosimétrie
- Marc Bleus - 2011 - Dosimétrie
- Isabelle Gerardy - 2011 - Législation
- Isabelle Gerardy - 2011 - Optimisation et ALARA
- Michel De Spiegeleer - 2011 - Législation des transport, ADR
- Michel De Spiegeleer - 2011 - Blindage
- Yves Niels - 2011- Gestion des déchets radioactifs
- Yves Niels - 2011- Décontamination

Procédures internes :

Différentes procédures internes, regroupant les différents domaine de ce travail ont été utilisé.

Annexe III: Carte d'identification

 		 									
RADIOACTIEF MATERIAAL / MATIERES RADIO-ACTIVES Verantwoordelijke : _____ Tel. _____ Responsable : _____		RADIOACTIEF MATERIAAL / MATIERES RADIO-ACTIVES Voorbehouden aan de agent stralingscontrole Réservé à l'agent contrôle des radiations									
Verzender / Expéditeur Naam - Nom : _____ Dienst - Service : _____ Tel.: _____	Bestemming / Destinataire _____ _____ _____	8. Besmetting - Contamination : _____ _____ _____									
Inlichtingen betreffende het radioactief materiaal Renseignements relatifs à la matière radio-active		9. Straling - Radiation : <table border="1" style="float: right;"> <thead> <tr> <th>In contact Au contact</th> <th>op 1 meter à 1 mètre</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>		In contact Au contact	op 1 meter à 1 mètre						
In contact Au contact	op 1 meter à 1 mètre										
1. Omschrijving van het voorwerp : _____ Description de l'objet : _____ _____ _____		10. Opmerkingen - Remarques : _____ _____ _____ _____									
2. Fysische vorm : _____ Forme physique : _____	3. Scheikundige vorm : _____ Forme chimique : _____	11. Datum - Date : _____ Agent stralingscontrole : _____ Agent contrôle des radiations : _____									
4. Isotopen : _____ Isotopes : _____	5. Totale activiteit : _____ Activité totale : _____	6. Splijtbaar materiaal : ²³⁵ U : _____ Pu : _____ Matière fissile : _____									
7. Transfertbon Nr. : _____ Bon de transfert No : _____		_____									