

CEA-R 2910 - MARBLE Georges, VALDERAS Ramon  
EVALUATION PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE  
DU NOMBRE DE RADICAUX LIBRES PRODUITS DANS L'OS DE RAT IRRAD

Sommaire. - Le nombre de radicaux libres à vie longue créés par irradiation gamma dans l'os de rat a été déterminé à partir du spectre de résonance paramagnétique électronique. Ce nombre décroît lentement avec le temps (demi-vie calculée  $\approx$  24 jours). Il est proportionnel à la dose de rayonnement gamma délivrée au rat. La méthode pourra trouver en dosimétrie biologique des applications intéressantes.

1966

16 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

CEA-R 2910 - MARBLE Georges, VALDERAS Ramon

EVALUATION BY ELECTRONIC PARAMAGNETIC RESONANCE OF THE  
NUMBER OF FREE RADICALS PRODUCED IN IRRADIATED RAT BONE

Summary. - The number of long half-life free radicals created by gamma irradiation in the bones of the rat has been determined from the electronic paramagnetic resonance spectrum. This number decreases slowly with time (calculated half life : 24 days). It is proportional to the dose of gamma radiation given to the rat. The method could find interesting applications in the field of biological dosimetry.

1966

16 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France



**EVALUATION PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE  
DU NOMBRE DE RADICAUX LIBRES PRODUITS DANS L'OS DE RAT IRRADIE**

par

Georges MARBLE et Ramon VALDERAS

**Rapport CEA - R 2910**

*Les rapports du COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE sont, à partir du n° 2200, en vente à la Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 16, rue Lord Byron, PARIS VIIIème.*

*The C.E.A. reports starting with n° 2200 are available at the Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 16, rue Lord Byron, PARIS VIIIème.*

Département de la Protection Sanitaire

EVALUATION PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE  
DU NOMBRE DE RADICAUX LIBRES  
PRODUITS DANS L'OS DE RAT IRRADIE

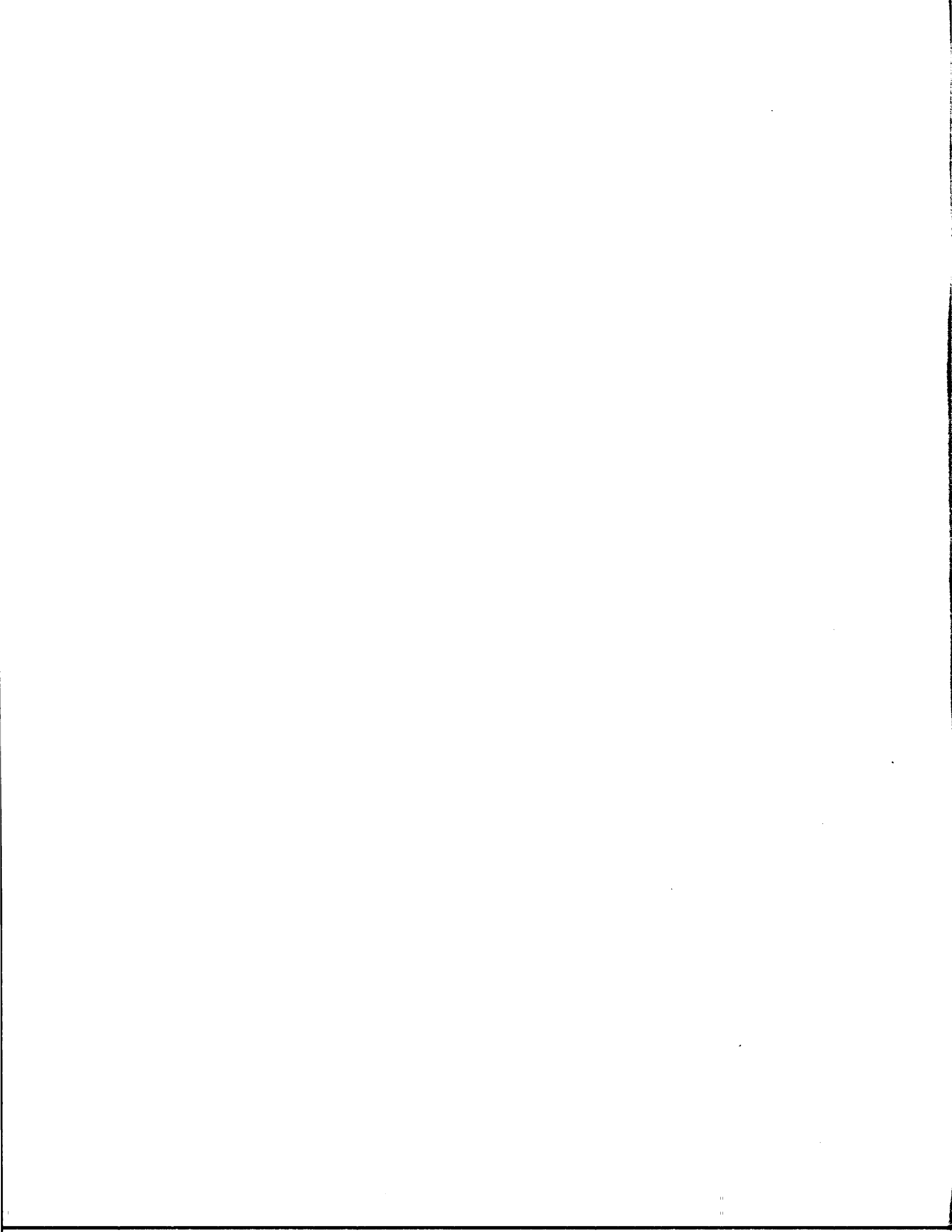
par

Georges MARBLE

Service de Santé des Armées  
détaché au Commissariat à l'Energie Atomique

Ramon VALDERAS

Stagiaire de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique



# EVALUATION PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE DU NOMBRE DE RADICAUX LIBRES PRODUITS DANS L'OS DE RAT IRRADIE

## INTRODUCTION

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules possédant un électron "célibataire" auquel ils doivent leur très grande réactivité chimique. L'étude de la résonance du spin de l'électron non apparié permet celle des radicaux libres (existence, localisation, nature, quantité, etc...).

On conçoit donc l'importance de la résonance du spin électronique en tant que méthode d'étude des radicaux libres en biologie. SMALLER [15], SCHOFFA [14], SOUTIF [16] ont publié des revues générales des travaux relatifs aux applications biologiques de l'E. S. R. (electron spin resonance). Au cours de ces dernières années, CARRINGTON [3], Mc CONNEL et CHESNUT [10], LEFEBVRE R. [8], JARRET [7], WEISSMAN [18] et de nombreux autres auteurs ont analysé les spectres d'E. S. R. obtenus après irradiation de composés organiques et ont établi les bases de l'interprétation théorique des résultats concernant les molécules intéressant la biologie. Ces travaux ont généralement porté sur des molécules organiques entrant dans la composition de la matière vivante mais ces molécules étaient irradiées dans des conditions souvent très différentes de celles dans lesquelles elles se trouvent dans les milieux biologiques (milieu privé d'eau, état solide, cristallisé, tissus lyophilisés (4, 11) température de l'azote liquide, etc...).

Les radicaux libres produits par interaction entre les rayonnements ionisants et les molécules constitutives des milieux biologiques, soit

par action directe, soit plus généralement par action indirecte, peuvent être de nature très différente. Les produits de la radiolyse de l'eau ont une durée de vie très courte car ils se recombinaient rapidement et induisent des chaînes réactionnelles conduisant à la formation de radicaux plus complexes mais de durée de vie tout aussi limitée. Cependant, certains radicaux à vie longue ont été mis en évidence, comme l'a montré HENRIKSEN [6] en ce qui concerne la cystine. GORDY, ARD et SHIELDS [5] ont également trouvé des radicaux libres après irradiation "in vitro" d'os. L'os, en effet, est un tissu biologique pratiquement privé d'eau, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la mesure, de plus sa structure est telle qu'il se prête plus facilement que d'autres tissus au piégeage des radicaux libres.

Tout récemment, SWARTZ [17] et nous-mêmes avons constaté qu'après irradiation d'animaux on pouvait retrouver dans les os irradiés "in vivo" des radicaux à vie longue, même à température ordinaire.

Nous avons pensé, tout comme SWARTZ, qu'il serait intéressant d'essayer de relier quantitativement la hauteur du signal donné par l'appareil de mesure de l'E. S. R. à la dose de rayonnement gamma délivrée à l'animal et suivre l'évolution en fonction du temps des radicaux libres formés.

#### TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Des rats blancs de 240 à 280 g. ont été irradiés par le rayonnement gamma d'une source de cobalt 60. Immédiatement après la fin de l'irradiation, des tibias ont été prélevés sur des rats. Des échantillons d'os pesant, après élimination de la moelle, de 80 à 85 mg ont été placés dans des tubes de silice pure (spectrosil) qui ont été fermés sous vide.

Certains os ont été irradiés "in vitro" après prélèvement sur des animaux non irradiés. Après l'irradiation ces échantillons osseux ont été



conservés jusqu'au moment de la mesure, certains à température ordinaire, d'autre à température de l'azote liquide.

Quelques prélèvements osseux ont subi un traitement à la papaine (120 heures à 20° C ou 72 heures à 38° C) avant l'irradiation. Le traitement enzymatique de l'os avait pour but d'enlever la matrice organique de l'os sans toucher à la matière minérale. Après ce traitement, les échantillons ont été lavés à l'eau distillée puis séchés aux infrarouges pour éliminer l'eau.

Enfin des échantillons de phosphate tricalcique et de phosphate bicalcique ont également été étudiés dans les mêmes conditions que les prélèvements d'os irradiés "in vitro" de façon à servir de référence qualitative.

Les irradiations ont été effectuées à des températures variant entre 18° C et 21° C. Le débit de dose de la source de cobalt était de 1250 rads/minute. La dosimétrie a été effectuée par la méthode du sulfate ferreux de FRICKE.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de résonance paramagnétique électronique STRAND 601 AX.

L'étalonnage de l'appareil a été effectué avec du D. P. P. H. (1, 1 diphényl - 2 - picryl-hydrazyl) sur le plan qualitatif (position de g.) et sur le plan quantitatif. Le calcul du nombre de radicaux a été effectué par intégration graphique des spectres du D. P. P. H. et des prélèvements osseux.

### RESULTATS QUALITATIFS

Le spectre (dérivée première de la courbe d'absorption énergétique) obtenu pour l'os de rat irradié "in vitro" est représenté par la figure I.

Celui de l'os irradié "in vivo" ne diffère pas sensiblement du précédent.

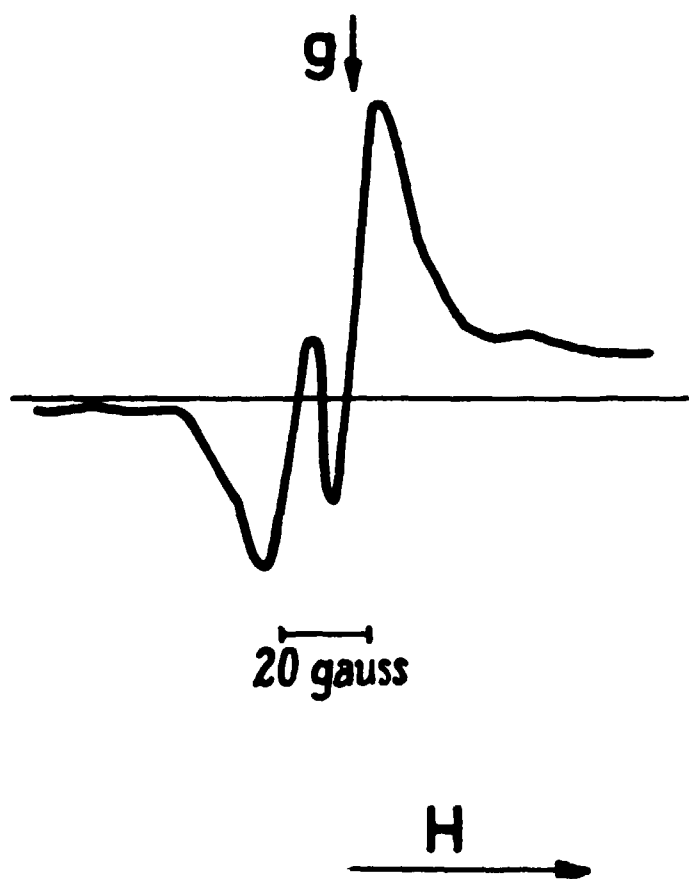


Figure 2

Spectre de l'os traité à la papaïne

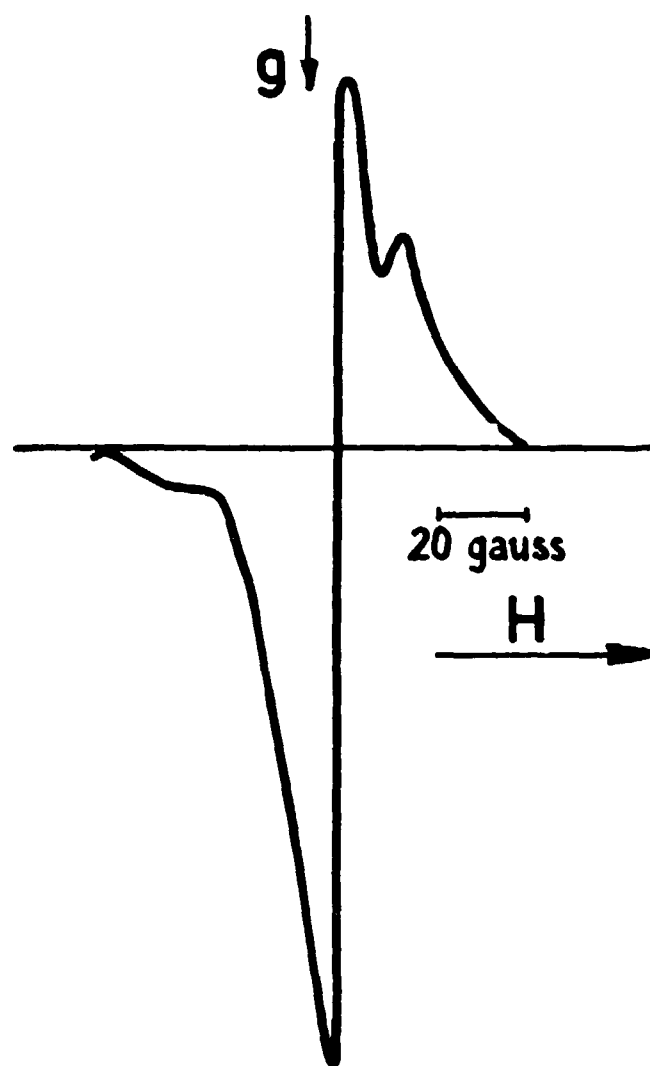


Figure 1

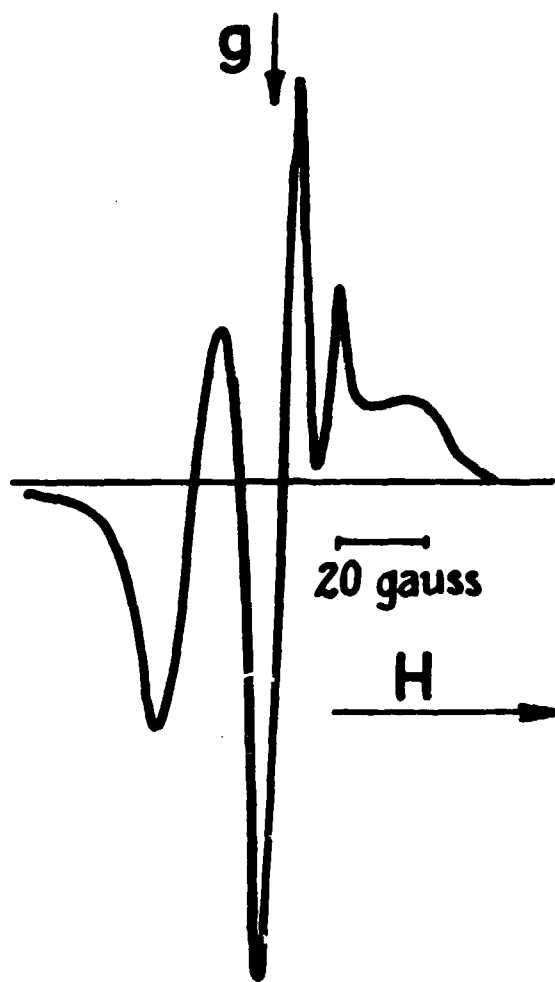
Spectre de l'os de rat irradié

La figure 2 représente le spectre de l'os traité à la papaïne avant l'irradiation. On constate que ce spectre diffère de celui de l'os non traité et par conséquent il semble logique de penser que la matière organique intervient dans le processus de production des radicaux libres dans l'os et que les radicaux observés ne sont pas seulement ceux produits par interaction du rayonnement avec la matière minérale.

La figure 3 représente le spectre du phosphate tricalcique et l'on

voit que, si certains pics observés sur ce spectre se retrouvent sur les spectres des prélèvements osseux, il n'y a pas analogie parfaite entre le spectre du phosphate tricalcique et l'un ou l'autre des deux spectres d'os.

Sur les trois spectres la flèche surmontée d'un g indique la position de la caractéristique g relative au D. P. P. H.



Spectre du  $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$

Figure 3

## RESULTATS QUANTITATIFS

### 1) Nombre de radicaux et rendement

L'étalonnage de l'appareil permettant de déterminer le nombre de radicaux a été effectué par intégration graphique en se référant à une quantité de D. P. P. H. renfermant  $2,14 \cdot 10^{16}$  radicaux libres. Les valeurs relatives ont été calculées par comparaison des hauteurs du signal d'E. S. R. Le tableau I rassemble les résultats des mesures effectuées 2 heures après l'irradiation.

Dans la dernière colonne de ce tableau ont été indiquées les rendements tels que

$$g = \frac{\text{Nombre de radicaux libres}}{100 \text{ eV}}$$

en convertissant en électron-volts l'énergie, exprimée en rads dans la 2ème colonne du tableau, provenant de l'irradiation.

Nature de l'échantillon	Dose en rads	Nombre de radicaux/g.	G (radicaux/100 eV)
OS	7 400	$1,3 \cdot 10^{15}$	0,24
	14 800	$2,5 \cdot 10^{15}$	0,22
	30 700	$4,4 \cdot 10^{15}$	0,22
	55 000	$7,0 \cdot 10^{15}$	0,20
	111 000	$1,5 \cdot 10^{16}$	0,22
	222 000	$3,0 \cdot 10^{16}$	0,22
Os + Moelle	222 000	$1,2 \cdot 10^{16}$	0,08
Os traité à la papaine	62 000	$8,6 \cdot 10^{16}$	2,40
	111 000	$2,45 \cdot 10^{17}$	3,50
Phosphate tricalcique	30 700	$5,0 \cdot 10^{16}$	2,70
	222 000	$4,7 \cdot 10^{17}$	3,38
Phosphate bicalcique	55 000	$2,3 \cdot 10^{16}$	0,76

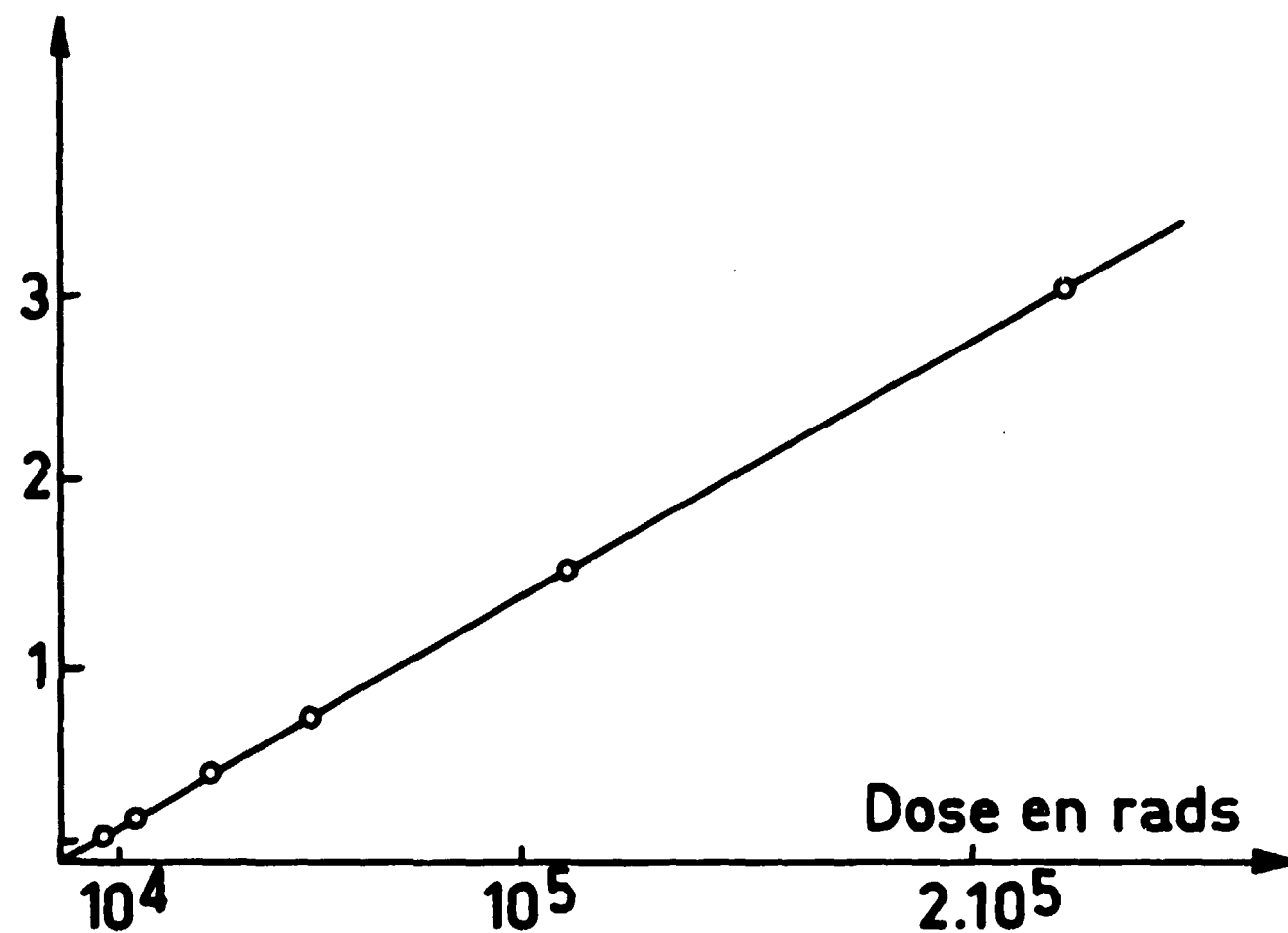
TABEAU I

Nombre de radicaux produits et rendement

2 - Variation du nombre de radicaux en fonction de la dose

En ce qui concerne l'irradiation de l'os "in vitro", on constate que le rendement garde une valeur pratiquement constante et voisine de 0,22 quelle que soit la dose délivrée aux animaux. Il s'ensuit que le nombre de radicaux produits est directement proportionnel à la dose. La droite représentative de la variation du nombre des radicaux en fonction de la dose est donnée par la figure 4.

Nombre de radicaux  
libres  $\times 10^{16}$



Relation dose-nombre de radicaux

Figure 4

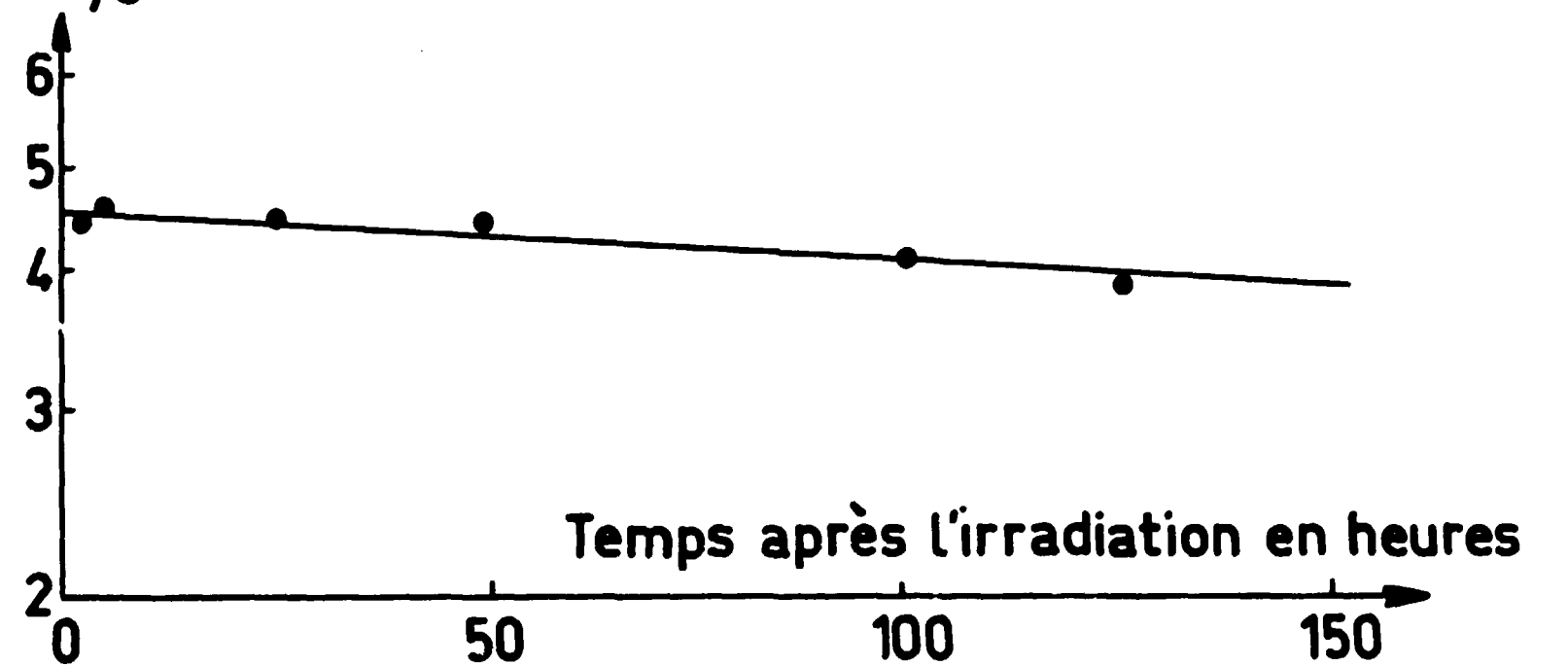
L'équation de la droite est  $N = 1,35. 10^{11} D$  où N est le nombre de radicaux libres/g. d'os au moment de la mesure c'est-à-dire 2 heures après l'irradiation, et D la dose en rads de rayonnement gamma délivrée aux rats.

Cette équation n'est valable que dans le domaine de doses que l'on a utilisé. La sensibilité de l'appareil de mesure de l'E. S. R. ne nous a pas permis de vérifier sa validité pour des doses faibles.

3 - Evolution en fonction du temps du nombre de radicaux

La décroissance du nombre de radicaux libres a été déterminée sur un échantillon d'os irradié à 30.700 rads, la représentation en coordonnées semi-logarithmiques de la variation de ce nombre en fonction du temps est donnée par la figure 5.

Nombre de radicaux  
libres/g  $\times 10^{15}$



Décroissance du nombre de radicaux

Figure 5

On obtient sensiblement une droite de pente faible et le calcul par extrapolation de la demi-vie des radicaux donne une valeur d'environ 24 jours. L'équation approximative de la variation du nombre des radicaux en fonction du temps est :

$$N(t) = N(2) / e^{-0,00115(t-2)}$$

dans laquelle

$N(t)$  est le nombre de radicaux libres au temps  $t$  exprimé en heures, et  $N(2)$  le nombre de radicaux 2 heures après l'irradiation.

### DISCUSSION

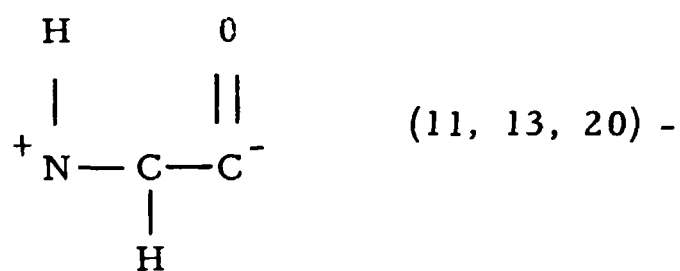
Des radicaux à vie longue se forment donc dans les os du rat au cours de l'irradiation et leur nombre est proportionnel à la dose reçue par l'animal.

La durée de vie des radicaux est suffisamment longue (demi-vie de l'ordre de 24 jours) pour que la mesure puisse être effectuée assez longtemps après l'irradiation. L'évolution du nombre des radicaux formés aussitôt après l'irradiation n'a pas été étudiée mais d'après SWARTZ la variation quantitative du signal E. S. R. entre 5 minutes et 2 heures après l'irradiation serait de l'ordre de 30 %.

Quant à la linéarité de la relation dose-nombre de radicaux, elle est valable dans le domaine de doses que nous avons utilisé mais il semble que l'on puisse penser que la relation s'applique pour des doses plus faibles. Seule, la sensibilité de l'appareil de mesure nous a empêché d'étudier ces doses; SWARTZ, pour sa part, parvient, grâce à un appareil plus récent, à 1000 rads.

Quelle est la nature de ces radicaux et pourquoi ne se recombinent-ils pas ?  
La réponse est assez difficile tout au moins au vu de nos résultats.

Les analogies et différences des spectres de résonances de l'os traité et non traité à la papaine avec celui du phosphate tricalcique sont d'interprétation délicate. Il est à noter, cependant, que la forme du spectre de l'os est assez voisine de celle des spectres qu'a obtenus GORDY pour la ptyglycine et pour le collagène qui se caractérisent par la présence d'un doublet dû au radical $\dot{s}$ .



On ne peut donc dire, d'après les résultats qualitatifs, si les radicaux sont formés exclusivement dans la partie minérale ou dans la partie organique de l'os.

La comparaison des rendements apporte des renseignements complémentaires. En effet, nous avons trouvé pour l'os privé de sa matière organique, par traitement enzymatique, un rendement voisin de celui obtenu pour le phosphate tricalcique ( $G = 3,4 - 3,5$ ) alors que le rendement n'atteint que la valeur 0,22 pour l'os non traité. Le rapport massique matière minérale/matière organique ne peut expliquer cette différence. On est donc amené à formuler deux hypothèses : la première consiste à admettre que les radicaux se forment dans la matière minérale mais que la répartition spatiale des molécules organiques permet leur transfert à la matière organique dans laquelle une destruction partielle s'effectue par un mécanisme de "quenching" par exemple, (2) (19) ; la seconde hypothèse est qu'il se forme également des radicaux dans le collagène et il y aurait alors coexistence de deux groupes de radicaux.



## CONCLUSION

La présence de radicaux libres à vie longue dans l'os de rat irradié a été mise en évidence. Le nombre de ces radicaux, mesuré par résonance du spin électronique, est proportionnel à la dose de rayonnement gamma délivrée au rat. L'utilisation d'un appareil de mesure plus sensible permettra de descendre jusqu'à des doses inférieures aux doses léthales. La méthode pourrait alors être employée en dosimétrie biologique. Les phanères (cheveux, ongles...) seraient également utilisables tout comme l'os (SWARTZ 1965).

-----

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à M. HERING Chef du Service de Chimie Physique et M. SUTTON, Adjoint au Chef du Service de Chimie Physique (Département de Physico-chimie, C. E. N de SACLAY) qui nous ont autorisés à travailler dans leurs Service, ainsi qu'à M. CHACHATY qui a effectué pour nous de nombreux spectres d'E. S. R.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) BERSOHN R. Proton hyperfine interactions in demi quinone ions. J. chem. Phys. 24, 1066 (1956)
- (2) CAGLIOTI V. ASCENZI A. and SANTORO A. On the interpretation of the low-angle scatter of X-ray from bone tissues. Biochim. Biophys. Acta, 21, 425 (1956)
- (3) CARRINGTON A. Electron spin resonance spectra of aromatic radicals and radical ions. Quarterly Reviews, 17, 67 (1963)
- (4) COMMONER B. TOWNSEND J. et PAKE G.E. Free radicals in biological materials. Nature, 175, 689 (1954)
- (5) GORDY W., ARD W.B. and SHIELDS H. Microwave spectroscopy of biological substances. I-Paramagnetic resonance of X-irradiated amino-acids and proteins. Proc. Natl. Ac. Sci, 41, 983 (1955)
- (6) HENRIKSEN T. Electron paramagnetic resonance studies on irradiated thiols and disulfides. In : Free radicals in biological systems, Academic Press, New-York (1961)
- (7) JARRET H.S. Hyperfine structure in paramagnetic resonance absorption spectra. J. chem. Phys. 25, 1289 (1956)
- (8) LEFEBVRE R. La structure électronique des molécules paramagnétiques. J. Chimie phys. 61, 1592 (1964)
- (9) McCONNELL H.M., HELLER C., COLE T. and FESSENDEN R.W. Radiation damage in organic crystals. I.- CH (COOH)<sub>2</sub> in malonic acid. J. Am. chem. Soc. 82, 766 (1960)
- (10) McCONNELL H.M. and CHESNUT D.B. Theory of isotropic hyperfine interactions in  $\pi$ -electron radicals. J. chem. Phys., 28, 107 (1958)
- (11) MIYAGAWA I. et GORDY W. On the nature of free radicals detected by paramagnetic resonance in biological substances. Proc. Natl. Sci, 44, 613 (1958)

- (12) MIYAGAWA I. et GORDY W. Electron spin resonance of an irradiated single crystal of alanine : second order effects in free radical resonance J. chem. Phys. 32, 255 (1960)
- (13) PATTEN R.A. and GORDY W. Further studies on radiation effects on the proteins and their constituents. Rad. Res. 22, 29 (1964)
- (14) SCHOFFA G. Elektronenspinresonanz in der Biologie. (Résonance paramagnétique en biologie). G.BRAUN, Karlsruhe (1964)
- (15) SMALLER B. Electron paramagnetic resonance studies of biological interests. Adv. Biol. Med. Phys. 9, 225 (1963)
- (16) SOUTIF M. Etude de la résonance paramagnétique électronique dans les radicaux libres organiques. J. Chimie phys. 61, 1549 (1963)
- (17) SWARTZ H.M. Long lived electron spin resonances in rats irradiated at room temperature. Rad. Res. 24, 579 (1965)
- (18) WEISSMAN S.I. Isotropic hyperfine interaction in aromatic free radicals J. chem. Phys. 25, 890 (1956)
- (19) WUTHIER R.E. GRON P. and IRVING J.T. The reaction of 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene with bone, studies on the relationship between bone collagen and apatite. Biochem. J. 92, 205 (1964)
- (20) ZIMMER K.G. et MUELLER A. New light on radiation biology from E.S.R. studies. In : Current topics in radiation research, vol. 1, 1-47 EBERT M. and HOWARD M., Ed., North-Holland publishing C°, Amsterdam (1965)

*Manuscrit reçu le 22 octobre 1965*

**FIN**