

**PREMIER MINISTRE
COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE**

**ACTION DES RAYONNEMENTS X
SUR LES PROTEINES PLASMATIQUES**

par

R. RINALDI, J. LLORY, M. SUSCILLON

Rapport CEA n° 2132

1962

**CENTRE D'ETUDES
NUCLEAIRES DE GRENOBLE**

CEA 2132 - RINALDI R., LLORY J., SUSCILLON M.

ACTION DES RAYONNEMENTS X SUR LES PROTEINES PLASMATIQUES
(1962).

Sommaire. - Le pouvoir agglomérant du plasma humain sur les erythrocytes, est modifié par les rayons X, ce qui se traduit par une augmentation de la vitesse de sédimentation des hématies.

En utilisant ce test biologique : agglomération reversible des erythrocytes, les auteurs se sont attachés à mettre en évidence la dénaturation de la sérum albumine humaine sous l'action des rayons X (durs).

Les résultats obtenus ont montré que des doses de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ roentgens dénaturent complètement la macromolécule de sérum albumine.

CEA 2132 - RINALDI R., LLORY J., SUSCILLON M.

THE ACTION OF X-RAYS ON PLASMATIC PROTEINS (1962).

Summary. - The agglutinative property of the human plasma on the erythrocytes is altered by X rays which is seen owing to an increase of the sedimentation rate of red cells.

When using this biological test : reversible agglomeration of the erythrocytes the authors tried to demonstrate the denaturation of the serum albumin under the action of the X rays

Further to this results we see that the doses of about $5 \cdot 10^5$ roentgens denature completely the macromolecule of serum albumin.

- Rapport C.E.A. n° 2 132 -

CENTRE D'ETUDES NUCLEAIRES DE GRENOBLE

ACTION DES RAYONNEMENTS X SUR LES PROTEINES PLASMATIQUES

par

R. RINALDI, J. LLORY, M. SUSCILLON

ACTION DES RAYONNEMENTS X SUR LES PROTEINES PLASMATIQUES

Nous nous proposons d'étudier, à l'aide d'un test biologique, l'importance des éventuelles modifications de structure que peut entraîner l'action des radiations ionisantes sur les molécules de protéines plasmatiques.

Dans ce but nous avons retenu comme indicateur de ces modifications le phénomène de l'agglomération reversible des érythrocytes dans des solutions de protéines soumises à un rayonnement X. Le choix de ce test est dû au fait qu'une simple mesure de vitesse de sédimentation des hématies dans ces solutions renseigne de façon précise sur la valeur du pouvoir agglomérant de ces dernières:

Nous référant aux travaux de WESTERGREEN, LUNDGREEN, FAHRAEUS et plus récemment à ceux de HAAPANEN, LEWI et LLORY, nous rappellerons que la simplicité du phénomène de sédimentation globulaire, c'est-à-dire de la chute des éléments figurés du sang sous l'effet de la pesanteur lorsque ce dernier est au repos, n'est en réalité qu'apparente. Si une hématie isolée au sein d'un plasma frais a une vitesse de sédimentation extrêmement faible de quelques millimètres

en 24 heures, au contraire, au sein d'un échantillon de sang frais rendu incoagulable, les éléments figurés subissent une sédimentation très nette pouvant normalement atteindre une vitesse de 10 mm à l'heure. L'examen microscopique montre alors des hématies groupées en "rouleaux" et un dépôt formé d'agrégats "en piles d'assiettes". Le phénomène relativement simple de la sédimentation est donc en fait rendu complexe par une agglomération réversible des érythrocytes qui élimine toute possibilité d'application de la loi de STOKES aux éléments isolés.

Le mécanisme de ce phénomène, qualifié de "réversible" du fait de la dislocation toujours possible des rouleaux par agitation, a pu être étudié notamment à l'aide de méthodes isotopiques utilisant l'albumine marquée (LLORY). Alors que les travaux anciens parlaient de "substances collantes", il résulte des études modernes, d'une part que les macromolécules linéaires et asymétriques sont seules responsables de ce phénomène, et d'autre part, que leur action est due à l'adsorption de ces macromolécules par les érythrocytes de forme normale. C'est ainsi que la sérum albumine à structure globulaire n'aurait pas en première approximation d'action agglomérante, alors que le fibrinogène, macromolécule à structure fibrillaire, a une action positive fondamentale.

Notre expérimentation aura pour but d'établir si une protéine non agglomérante comme la sérum albumine, peut acquérir cette propriété par modification de sa structure sous l'action du rayonnement X comme c'est le cas pour les rayons ultra-violet. Pour ce faire, après avoir successivement précisé dans un premier chapitre la notion de vitesse de sédimentation, les conditions expérimentales, la technique

utilisée et procédé, à des fins de contrôle, à la vérification des résultats déjà connus pour les U.V., dans un second chapitre nous procéderons à l'étude de l'action des rayons X sur le plasma et sur des solutions de sérum albumine.

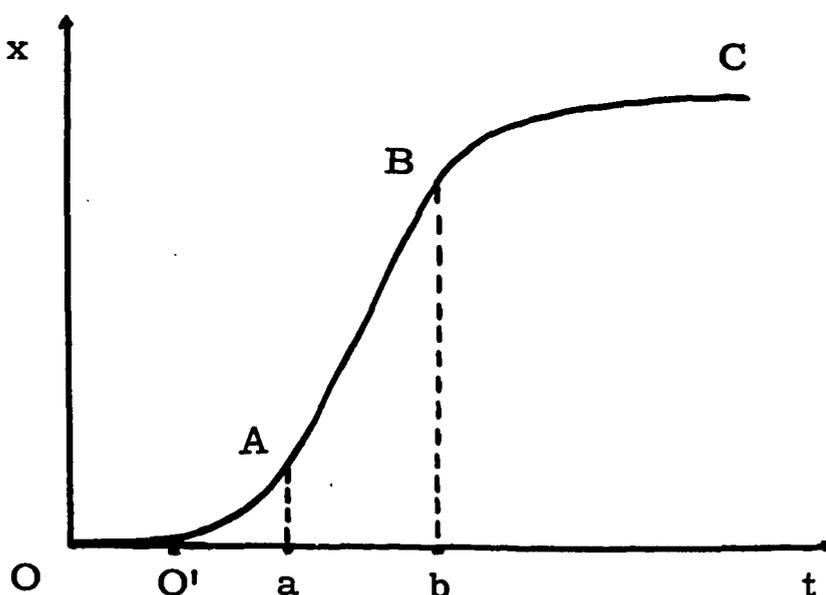
I. TECHNIQUES EXPERIMENTALES ET VERIFICATIONS

A. Définition de la vitesse de sédimentation

L'étude de la cinétique du phénomène de sédimentation, dans laquelle on mesure à intervalles de temps réguliers l'espace x parcouru par le ménisque de séparation hématies-plasma, a conduit TANNHEIN à une équation donnant x en fonction du temps t . Dans cette équation :

$$x = k \left(1 - \frac{1}{e^{a(t-p)}} \right)$$

dont la représentation graphique (fig. 1) est une courbe de type sigmoïde, p est un temps égal à la durée de la phase de démarrage ou d'agglomération (segment OO' de l'axe des abscisses), k la valeur finale de l'espace parcouru, "a" un paramètre déterminé en mesurant la valeur de x pour un temps t égal à deux heures.



- Fig. 1 - cinétique de la sédimentation globulaire.

Comme la plupart des auteurs nous admettrons que la vitesse de sédimentation (V.S.) renseignant sur l'intensité de l'agglomération est la vitesse maximum représentée par la pente de la portion rectiligne AB de la courbe qui correspond à une phase de régime constant. Au delà de B suit une phase dite de tassement pendant laquelle la vitesse s'annule.

B. Conditions et techniques expérimentales

1° Lors du séjour prolongé du plasma sous une lampe à rayons UV ou X, il se produit inévitablement une évaporation plus ou moins importante que l'on doit compenser afin que la V.S. ne soit pas perturbée. Nous éliminerons cette perte par évaporation par ajout d'eau distillée, afin d'éviter un enrichissement de la solution en sels et protéines.

2° Après irradiation du plasma, un nouveau problème se pose au moment de la remise en suspension des hématies ; en effet, la concentration globulaire ¹⁾ que nous définissons comme étant le rapport du volume G de l'ensemble des érythrocytes au volume total T de la suspension (sang ou solution de protéines), est un facteur de variation important quant à la valeur de la V.S. Nous avons constaté (tableau I) qu'en général la chute des hématies dans le plasma est d'autant plus rapide que le rapport G/T est plus faible.

1) reportée à 100 ml cette concentration globulaire n'est autre que le taux d'hématocrite.

Pour une certaine valeur de ce rapport (tube 3, 4 et 5) la V.S. est trop grande et le ménisque de séparation des hématies et du plasma n'est plus net ; pour $G/T = 1/2$ le phénomène s'écarte de celui que représente la courbe de la figure 1.

Temps au bout duquel est effectuée la mesure	Hauteur de chute H en mm et V.S. moyenne en mm/h.											
	Tube 0 G/T=1/2,5		Tube 1 G/T=1/2		Tube 2 G/T=1/3		Tube 3 G/T=1/4		Tube 4 G/T=1/5		Tube 5 G/T=1/6	
	H	V.S.	H	V.S.	H	V.S.	H	V.S.	H	V.S.	H	V.S.
0 h 30	0,5	1	0,5	1	3	6	11	22	14	28	17	34
1 h	2	2	1	1	10	10	30	30	40	40	50	50
1 h 30	6	4	11,5	1	29	19	51	34	62	41	76	50
2 h	13	6,5	3	1,5	44	22	75	37	90	45	106	53
2 h 30	16	6,4	3,5	1,4	49	19	82	32	100	40	114	45
3 h	18	6	4,5	1,5	57	19	94	31	113	37	125	41
3 h 30	19	5,4	6	1,7	61	17	99	28	117	33	130	37
.....
19 h	72	3,7	48	2,5	109	5,7	133	7	145	7,6	156	8,2

Tableau I - Etude de la V.S. en fonction de la concentration érythrocytaire.

Dans ces conditions, pour nos expériences nous n'avons retenu que la valeur 1/3 pour le rapport G/T car c'est une valeur ne s'éloignant pas trop de la valeur moyenne de ce rapport pour le sang humain normal (tube 0 avec G/T = 1/2,5) et de plus, la netteté du ménisque permet alors des mesures précises.

3°, Ayant séparé les hématies du plasma, puis procédé à des mesures après vieillissement, nous avons vérifié que pour un échantillon donné la V.S. varie avec le temps. Comme le montrent les résultats expérimentaux consignés dans le tableau ci-dessous, la vitesse de sédimentation diminue à mesure que l'échantillon vieillit :

Temps	6 h	24 h	48 h	54 h	72 h
V.S. maximum en mm/h	24	20	18	16	12

TABLEAU II

Des expériences antérieures (LLORY) ayant montré que le plasma est peu altéré par le temps alors que les hématies sont notablement influencées par ce facteur, on a utilisé du sang frais. Cependant nous avons constaté que du sang de 12 heures, gardé dans un réfrigérateur à la température de 4°C environ, peut être également utilisé d'une façon valable, c'est-à-dire sans que les résultats comparatifs soient réellement faussés par une variation trop importante de la V.S.

4°, Technique expérimentale

Afin de séparer les hématies du plasma, on prélève le sang²⁾ sur citrate puis on centrifuge à 5 000 tours/minute pendant 20 mn.

Temps, vitesse de centrifugation et température sont les facteurs importants de l'opération. En effet, alors que pour des valeurs faibles des deux premiers facteurs les hématies retiennent une certaine quantité de plasma qui, pendant la sédimentation perturbe la vitesse de chute des hématies, pour une vitesse de centrifugation trop grande des risques de lésion des hématies apparaissent. De plus, la centrifugation doit s'opérer au voisinage de 0°C afin d'éviter qu'une élévation de température due aux frottements dénature le système protidique dont le rôle est essentiel dans la V.S.

Après cette opération le plasma surnageant est prélevé ; une partie est utilisée comme témoin tandis que des fractions égales du reste sont irradiées à différentes doses. Pendant l'irradiation le témoin est conservé dans des conditions expérimentales voisines de celles de l'échantillon irradié.

Les hématies isolées sont conservées à une température voisine de 4°C puis, après irradiation du plasma, elles sont remises en solution à raison d'un volume d'hématies pour deux volumes de plasma. Avant d'effectuer les mesures de sédimentation, on retourne plusieurs fois l'éprouvette contenant la suspension afin de séparer par agitation les hématies qui auraient déjà pu s'agglomérer. La sédimentation globulaire se fait simultanément pour les témoins et le plasma irradiés dans des tubes de WESTERGREEN classiques.

2) Le sang nous a été gracieusement fourni par le Centre de Transfusion Sanguine de la Tronche (Directeur : Pr. SEIGNEURIN).

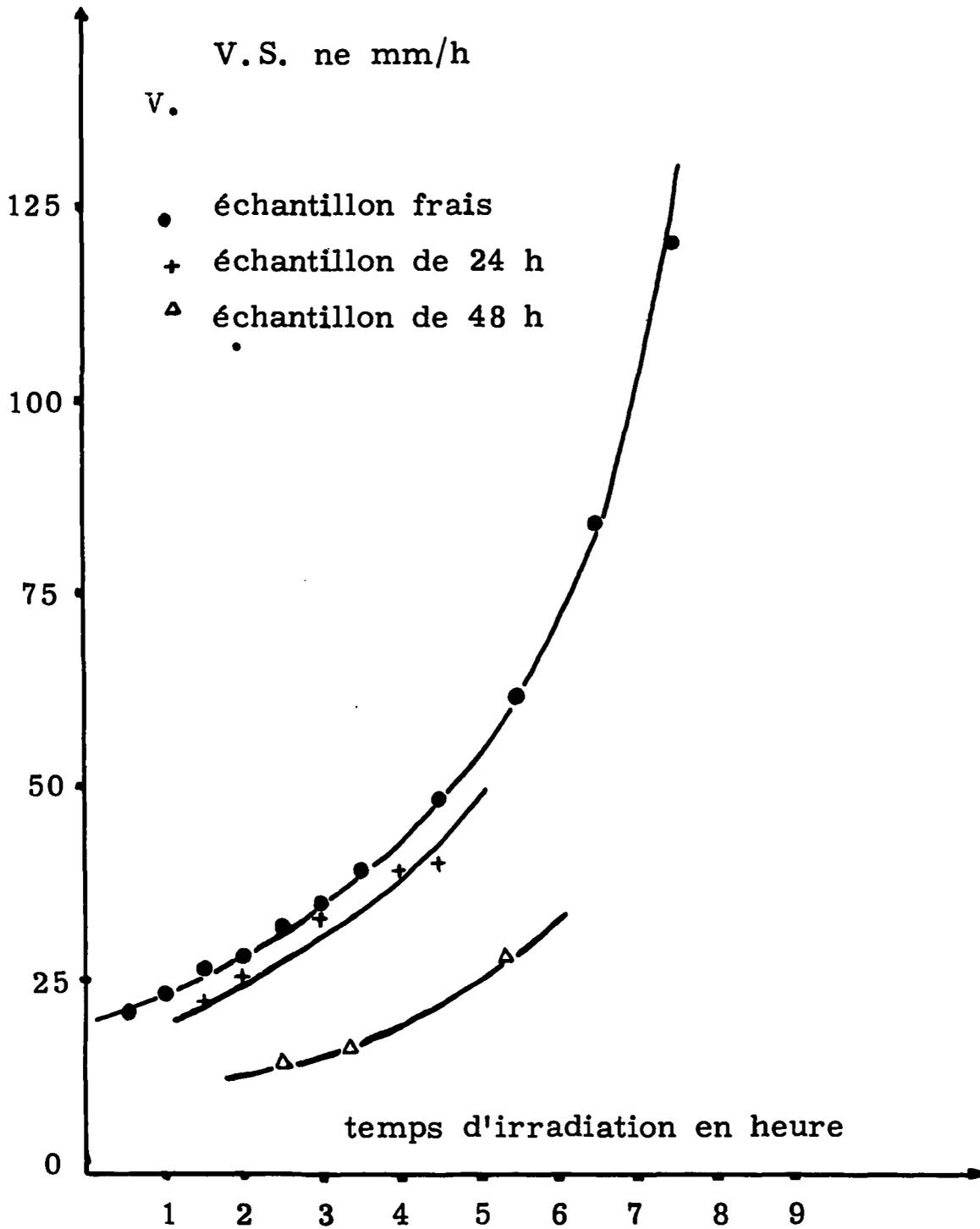
C. Vérifications de l'action des U.V. dans nos conditions expérimentales

Nous avons tout d'abord repris les travaux sur les U.V. dans des conditions expérimentales un peu différentes, afin de nous contrôler et de pouvoir ensuite comparer ces premiers résultats avec ceux que l'on obtiendra, dans les mêmes conditions, avec d'autres rayonnements tels les rayons X ou gamma. On utilise un tube à U.V. à filament de tungstène (Madza TG16 germicide-bande principale 2.537 Å) la coupelle contenant le plasma à irradier étant placée à 20 cm du tube. Grâce à un système de ventilation on maintient la température à 20 °C et en même temps on élimine l'ozone qui se forme.

Les résultats obtenus dans cette expérimentation sont résumés dans le tableau ci-après et par les courbes de la figure 2.

Temps écoulé entre le prélèvement et l'expérimentation	Durée de l'irradiation	V. S. maximum en mm/h	
		Témoin	Echantillon irradié
échantillon frais	0 h 30	20	20,5
	1 h	20	23
	1 h 30	20	26
	2 h	20	28
	2 h 30	24	32
	3 h	20	34,5
	3 h 30	24	39
	4 h 30	20	48
	5 h 30	20	61
	6 h 30	20	84
	7 h 30	20	120
24 heures	1 h 30	16	22
	2 h	16	25
	3 h	16	33
	4 h	16	39
	4 h 30	16	40
48 heures	2 h 30	8	14
	3 h 20	8	16
	5 h 20	8	28

TABLEAU III



- Fig. 2 - V.S. dans le plasma irradié aux U.V.

Ces résultats numériques ainsi que les courbes qui les représentent nous montrent que la vitesse de sédimentation des hématies dans du plasma irradié varie de façon approximativement parabolique en fonction de la durée d'exposition. Obtenus dans des conditions expérimentales un peu différentes, nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus précédemment par l'un de nous quant à l'action des rayons ultraviolets sur le pouvoir agglomérant de certaines protéines sériques.

II. ETUDE EXPERIMENTALE : Action des rayons X

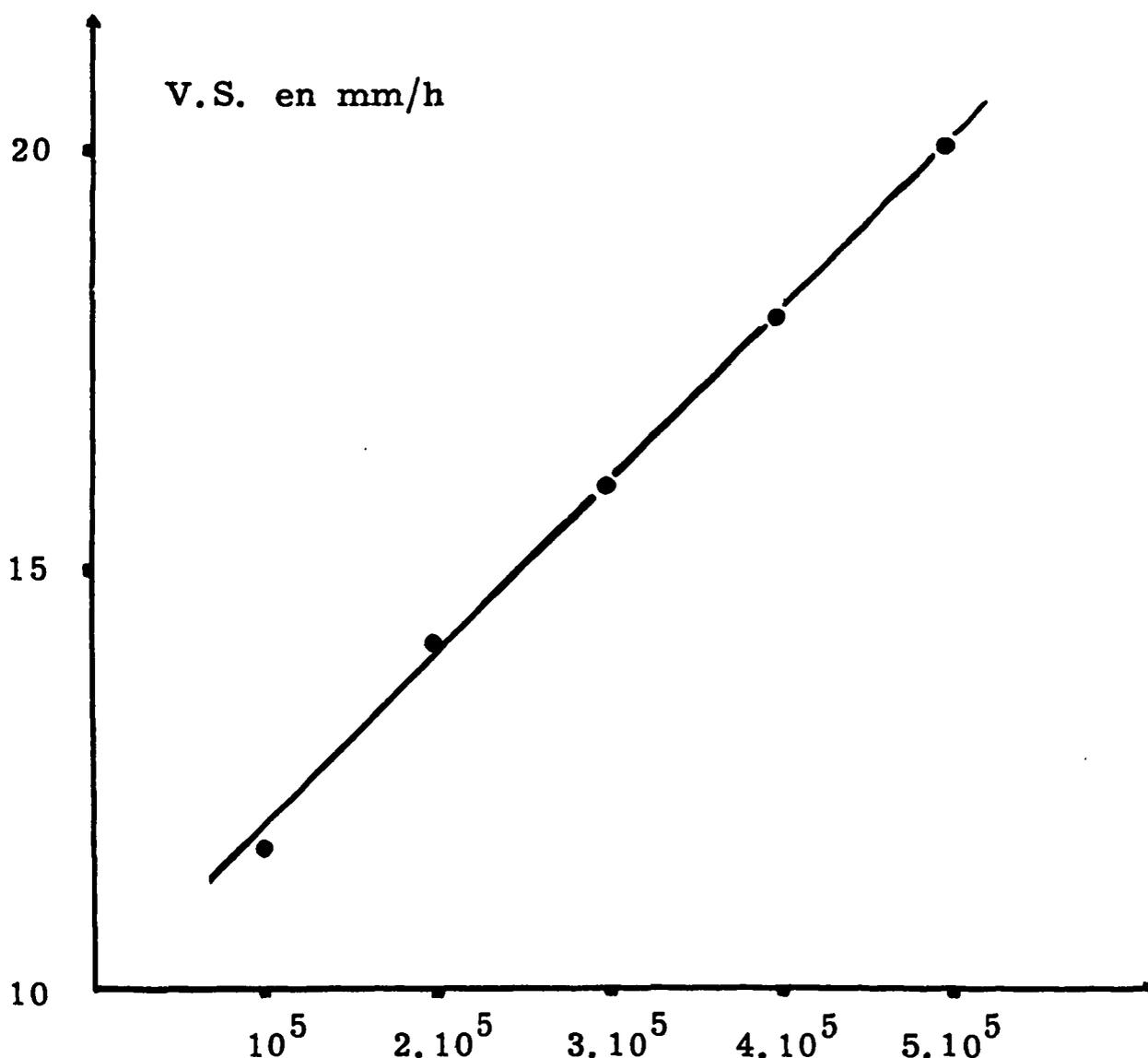
Nous avons repris ensuite notre expérimentation dans des conditions identiques, mais en faisant agir les rayons X. Nos premières expériences, bien qu'elles ne représentent qu'une partie de notre travail, nous permettent cependant de donner quelques résultats.

L'irradiation a été effectuée à l'aide d'un appareil de type médical pour radiothérapie. C'est un générateur à tension constante que nous avons employé sous une tension de 180 kV, une intensité de 18 mA et avec un filtre de 0,1 mm de cuivre. Le dosimètre servant à la mesure de la dose administrée est le dosimètre "Ionex" Mark 3 de la Baldwin Instrument C°.

a) Irradiation du plasma

Les résultats obtenus par irradiation du plasma humain sont résumés dans le tableau ci-dessous et représentés par la figure 3 :

V.S. maximum dans le plasma témoin (en mm/h)	V.S. maximum dans le plasma irradié (en mm/h)	Dose de rayons X en roentgens
10	11,7	100 000
10	14,1	200 000
10	16	300 000
10	18	400 000
10	20	500 000



- Fig. 3 - V.S. dans le plasma irradié aux rayons X

Nous avons effectué de nombreuses expériences avec des doses de rayonnements inférieures à 100 000 roentgens sans obtenir des résultats probants, les doses administrées s'étant révélées trop faibles.

De cette étude globale nous pouvons conclure que les rayons X agissent dans le même sens que les radiations ultra-violettes en ce qui concerne la vitesse de sédimentation des hématies. D'une façon plus précise on peut dire que pour les doses d'irradiation allant de 10^5 à

5.10^5 roentgens, la vitesse de sédimentation des hématies varie de façon linéaire en fonction de la dose. Il faut toutefois remarquer que dans le cas d'irradiation par les U.V. la portion de courbe correspondant aux mêmes valeurs de la vitesse de sédimentation est également une droite.

Etant donné la diversité des fractions protéiques plasmatiques, il convient de préciser le rôle des plus importantes dans l'expérimentation globale pour laquelle nous venons de donner les résultats.

A cette fin nous avons remplacé le plasma expérimenté par un égal volume de solution d'une protéine déterminée et rendu isotonique par ClNa à 9 pour mille.

b) Irradiation des solutions de sérum albumine

Nos premières expériences ont porté uniquement sur la sérum albumine humaine ³⁾ dont la vérification de la pureté par les méthodes électrophorétiques nous a montré qu'elle contient au moins 96 pour cent d'albumine électrophorétiquement pure (moins de 4 pour cent de bêta globulines). La mise en solution des albumines en poudre dans une solution de ClNa à 9 pour mille est généralement satisfaisante.

Le sang provenant des sujets normaux est prélevé sur solution de citrate de sodium. Les globules sont séparés par centrifugation et le plasma est remplacé par son volume de solution d'albumine soit le double de celui des hématies.

³⁾Note - Les albumines utilisées dans l'expérimentation indiquée ci-dessous ont été préparées par le Centre National de Transfusion Sanguine. La sérum albumine réactif du Centre National de Transfusion Sanguine est constituée par la fraction V de Cohn obtenue à partir du plasma humain à l'aide du procédé modifié par Nitschmann.

La méthode cinétique de WESTERGREEN nous a permis d'effectuer plusieurs déterminations de V.S. simultanément. Les différents échantillons d'une même solution isotonique d'albumines sont irradiés à des doses variées de rayons X. Les vitesses de sédimentation sont ensuite mesurées simultanément avec des hématies provenant du même prélèvement de sang.

Le tableau suivant donne quelques résultats obtenus en mesurant comparativement pour des hématies provenant d'un même sang, leur vitesse de sédimentation dans une solution d'albumine témoin et dans la même solution irradiée. Les échantillons portant les n° 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 ont respectivement reçu des doses d'irradiation de 10^5 , $2 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^5$, $3,5 \cdot 10^5$, $4 \cdot 10^5$, $4,5 \cdot 10^5$ et $5 \cdot 10^5$ roentgens.

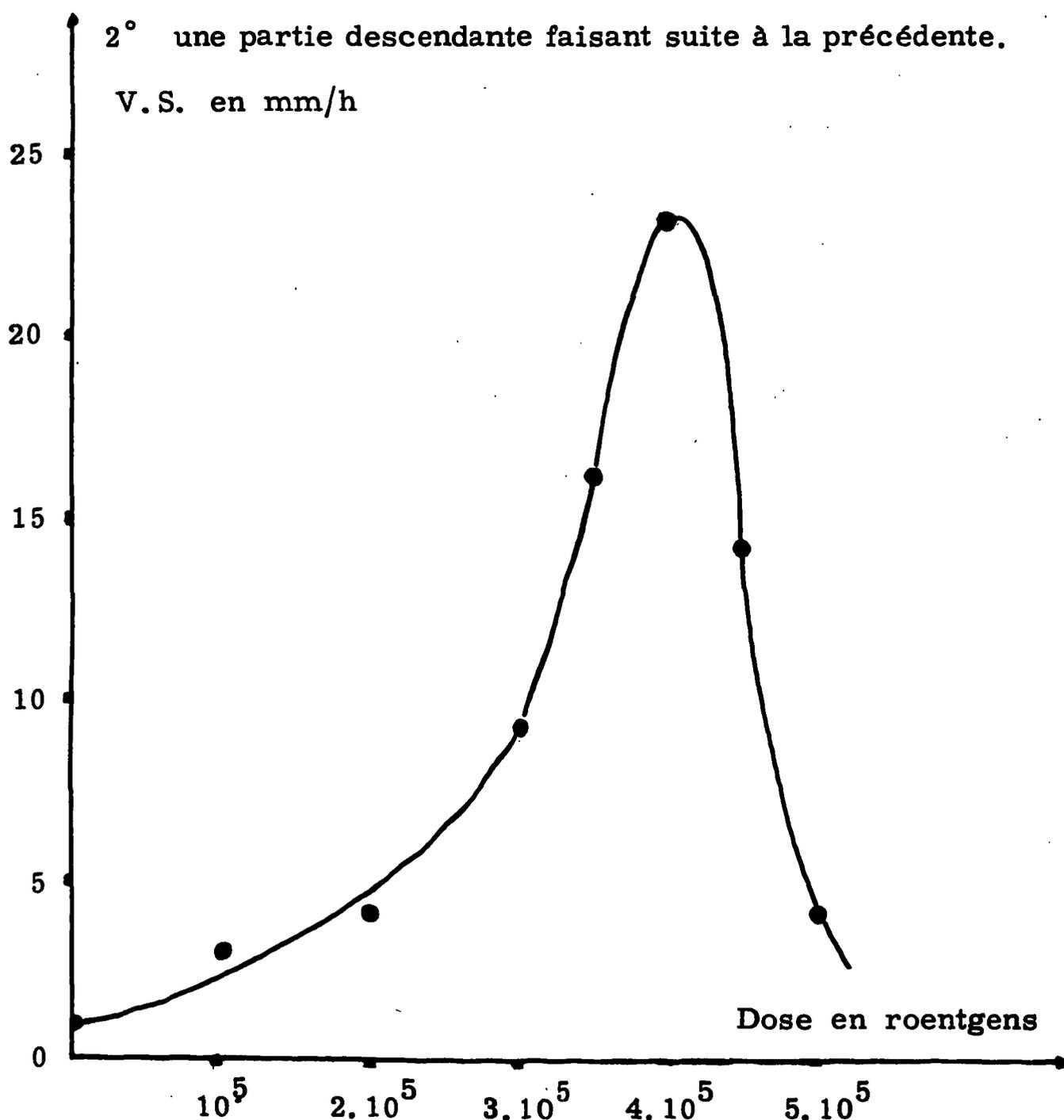
Le tableau ci-dessous résume nos résultats :

Temps au bout duquel se fait la mesure	Hauteur de chute en mm du ménisque pour les divers échantillons étudiés							
	témoin	échantillons						
		1	2	3	4	5	6	7
0 h 30	0	2	2	4	7	10	6,5	2
1 h	1	3	4	9	16	23	14	4
3 h 40	4	7	15	35	59	98	53	11
4 h 30	6	9	20	43	73	115	64	19
5 h 30	7	10	23	50	87	122	80	20
6 h 30	8	12	27	54	97	127	86	25
7 h 30	9	13	30	58	105	130	88	30
8 h	10	14	33	61	112	133	90	35
.....
24 h	23	34	54	82	120	148	110	85
V.S. maxim. en mm/h	1	3	4	9	16	23	14	4

Comme on l'a déjà remarqué (LLORY), la courbe représentant la V.S. maximum en fonction de la dose reçue (figure 4) peut se décomposer en 2 parties.

1° une partie ascendante exponentielle d'équation générale $V.S. = ae^{br}$; relation dans laquelle r représente la dose en roentgens et " a " et " b " représentent des paramètres dépendant des conditions expérimentales.

2° une partie descendante faisant suite à la précédente.



- Fig. 4 - V.S. dans la sérum albumine irradiée aux rayons X

En somme, les résultats expérimentaux montrent que, comme dans le cas des U. V., l'action des radiations X sur la sérum albumine comporte deux phases :

1° une phase pendant laquelle les albumines acquièrent vis à vis des hématies des propriétés agglomérantes vraisemblablement dues à une modification de leur structure moléculaire. C'est la phase de dénaturation correspondant à la première partie de la courbe.

2° une phase dans laquelle, leur édifice moléculaire étant entièrement détruit, les albumines perdent alors leur solubilité et leur pouvoir agglomérant (deuxième partie de la courbe). Pendant cette phase se produit une floculation, facilement visible, de la solution expérimentée.

Cette étude permet donc de conclure qu'une protéine à structure sub globulaire, et par conséquent non agglomérante, comme l'albumine peut le devenir si on modifie cette structure par irradiation X sans toutefois provoquer la formation de flocculats protéiques par l'action d'une trop forte dose de rayonnement

Manuscrit reçu le 30 décembre 1961

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. BOULANGER et J. POLONOSKI
Traité de biochimie générale - Masson et Cie, Paris 1959.
- 2 R. FAHRAEUS
The suspension stability of blood - *Physiol. Rev.*, 1929, 9, 241
- 3 L. HAAPENEN
On the correlation between the sedimentation rate and the red cell count in some diseases of the blood - *Acta Med. Scand.* 1952, 141, 367
- 4 S. LEWI
Pouvoir agglomérant du P. V. P. et sédimentation des érythrocytes. *Ann. Biol. Clin.*, 1954, 12, 54.
- 5 J. LLORY et A. CALLIS
Sur l'adsorption des protéines par les érythrocytes. Section Méditerranéenne de la Société de Chimie Physique, Marseille, 1960.
- 6 J. LLORY et A. CALLIS
Adsorption periglobulaire et vitesse de sédimentation globulaire. 79ème Congrès de l'A. F. A. S., GRENOBLE, 1960.
- 7 J. LLORY
Contribution à l'étude de la sédimentation globulaire. Thèse de Sciences Physiques, Montpellier, 1960.

- 8 J. LLORY et A. CALLIS
Effets sur la sédimentation globulaire de l'irradiation ultraviolette
du plasma. C.R. Biol. , 1958, 152, 1737.
- 9 LUNDGREEN
A study of the physical nature of the sedimentation of blood
corpuscles. Acta Med. Scand. , 1927, 67, 63.
- 10 WESTERGREEN
Die Senbungsreaktion. Ergobn. Inn. Med. U. Kinderheild,
1924, 26, 577.

FIN