

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DES SCIENCES

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE
GÉNÉRALE ET COMPARÉE

DIRECTEUR

PROFESSEUR G. PÉRÈS

LYON, LE

16, QUAI CLAUDE-BERNARD (7^e)

TÉL. : (78) 72-05-45

Réf. :

RAPPORT

CONCERNANT LES TRAVAUX EFFECTUES DANS LE
CADRE DU CONTRAT N° 66-34-198-00-480-75-01

EFFETS DU RAYONNEMENT LASER AU NIVEAU DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLEIQUES

Dans le cadre d'une action concertée sur les effets biologiques du laser menée sous la direction de Monsieur le Professeur PERES, la section de Chimie et Pharmacologie du C.R.S.S.A. a entrepris l'étude des effets biologiques du laser au niveau moléculaire et essentiellement au niveau des constituants des acides nucléiques, acides désoxyribonucléiques (ADN) et ribonucléiques (ARN). Dans un premier temps, l'étude des modifications que risque d'entraîner le rayonnement laser sur les constituants basiques de ces biopolymères, bases puriques (guanine, adénine) et pyrimidiques (thymine, cytosine, uracile) est envisagée, tant in vitro que in vivo.

Nous avons tout d'abord vérifié que, dans nos conditions expérimentales, il ne se produit pas de dissociation des molécules d'eau sous l'action du flash lumineux suite à des effets de type "sonolyse" par exemple. Nous avons en effet recherché si le radical libre hydroxyle ou l'atome libre d'hydrogène pouvaient être engendrés dans les solutions, ceci grâce à une technique extrêmement sensible mise au point dans notre laboratoire pour l'étude des espèces chimiques issues de la radiolyse de l'eau (C. NOFRE, Y. LE ROUX et A. CIER, Compt. Rend. Acad. Sci., 1965, 261, 2887-2890). Les résultats ont été négatifs.

Cette éventualité éliminée, nous avons entrepris l'étude de l'effet du rayonnement laser sur la guanine irradiée in vitro en solution aqueuse en présence d'air et d'un colorant photosensibilisant absorbant dans la zone d'émission du laser à rubis (6943 Å) ; notre choix

...

s'est tout d'abord porté sur le bleu de méthylène ($\lambda_m = 6450 \text{ \AA}$). L'irradiation a été effectuée dans des tubes cylindriques scellés, de verre Pyrex (longueur : 20 cm ; diamètre intérieur : 0,6 cm), placés dans l'axe du faisceau, sur des solutions (5ml) de guanine 8 - ^{14}C (activité spécifique = 10 mCi/m mole) à la concentration de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, en présence d'une quantité équimoléculaire de bleu de méthylène ; les solutions ont été soumises à 40 impulsions d'un laser CGE (comportant un laser RDM 10 avec son amplificateur RA 10), chaque impulsion ayant une durée d'émission (6943 $\text{\AA}$) inférieure à 30 nanosecondes, avec une énergie de sortie évaluée à 3 joules (mais vraisemblablement inférieure : ~ 2 joules). Les solutions irradiées ont été lyophilisées et analysées par chromatographie sur plaque de cellulose dans des solvants neutres et par chromatographie bidimensionnelle sur papier dans des solvants neutres ou acides. Les produits sont détectés par autoradiographie sur papier Regulix Kodak (contact de 8 j. pour un dépôt de $1 \mu\text{Ci}$ environ). Il a été trouvé de nombreux produits de dégradation, parmi lesquels l'oxalylurée et la dihydroxy-2,6 purine ont été jusqu'ici sûrement identifiés. Les autres produits sont actuellement en cours d'identification. L'étude de l'influence de la concentration du colorant et de la nature du colorant est envisagée à la fois sur la guanine et sur d'autres bases des acides nucléiques.

Une étude a également été entreprise sur les effets du rayonnement laser sur les bases pyrimidiques incorporées *in vivo* au sein des acides nucléiques de bactéries (*Escherichia coli*) ; la souche bactérienne utilisée est *E. coli* 63-86 U^- qui nécessite de l'uracile pour sa croissance. Les bactéries sont cultivées dans 10 ml d'un milieu minéral synthétique glucosé auquel est ajouté $50 \mu\text{Ci}$ d'uracile ^3H -6 (activité spécifique : 12 Ci/m mole), ce qui permet le marquage, grâce au truchement des synthèses biochimiques, des diverses bases pyrimidiques bactériennes (essentiellement cytosine, uracile et thymine). Les bactéries, récupérées par centrifugation, sont mises en suspension en tampon phosphate 0,067 M de pH 7 à une concentration approximative de $10^5/\text{ml}$, en présence ou non d'un colorant photosensibilisant (vert Janus : $2 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\lambda_m = 5950$). Les suspensions (5ml), placées dans des tubes cylindriques (1:20cm;d:0,6cm) scellés sous air, sont soumises à une série de trente impulsions d'une émission laser de mêmes caractéristiques que celles précédemment données. Après irradiation, les bactéries sont récupérées par centrifugation, lyophilisées, puis hydrolysées par traitement à 100° pendant 1 h par 150 μl d'acide perchlorique à 70 p. cent (A. MARSHAK et H. J. VOGEL, J. Biol. Chem., 1951, 189, 597). Par addition d'une solution d'hydroxyde de potassium 10 N (jusqu'à pH 13-14), l'acide perchlorique est précipité à l'état de perchlorate de potassium et éliminé par centrifugation ; le surnageant est acidifié par addition d'acide acétique pur jusqu'à pH 4. Après une nouvelle centrifugation, la solution est soumise à une analyse chromatographi-

...

que sur papier. Les produits sont caractérisés par autoradiographie et quantitatifs par radiochromatographie. Il n'a pu être observé, dans ces conditions, de différences significatives entre les bactéries témoins et les bactéries irradiées en présence ou non de colorant (cytosine : 54 p. cent; uracile : 33 p. cent ; thymine : 13 p. cent). Prochainement, une étude similaire sera effectuée avec d'autres colorants. Enfin, le marquage des purines bactériennes est actuellement à l'étude ; dès ce problème technique résolu, l'étude de la dégradation des bases puriques in vivo sous l'effet du rayonnement laser sera également entreprise.

Réf. :

FICHE D'EXPLOITATION CONCERNANT LE RAPPORT D. R. M. E.

n° 66-34-198-00-480-75-01

Dans le cadre du contrat D. R. M. E. n° 66-34-198-00-480-75-01 il a été possible, au cours de l'année 1966/1967 d'organiser une unité de recherche des effets biologiques du rayonnement laser selon l'organigramme suivant :

Coordonateur de l'Unité : Professeur Gabriel PERES - Directeur du Laboratoire de Physiologie Générale et Comparée de la Faculté des Sciences de Lyon (avec T. Dumas)

Sections de recherche :

Section 1 - Messieurs G. PERES, R. FONTANGES - Laboratoire de Physiologie de la Faculté des Sciences de Lyon -
Collaborateurs : Messieurs DUMAS, SIBILLE, Mademoiselle BARBE

Section 2 - Monsieur L. COLOBERT - Professeur à la Faculté de Médecine de Lyon, Directeur du Laboratoire de Chimie Biologique.
Collaborateur : Monsieur FROT-COUTAZ.

Section 3 - Monsieur R. FONTANGES - Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées - Lyon.
Collaborateurs : Messieurs DESCHAUX, GUILLOT, OGIER.

Section 4 - Monsieur C. NOFRE - Division de Chimie et Pharmacologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des
Armées - Lyon.

Collaborateurs : Monsieur GUILLET, Mademoiselle
LEROUX.

La répartition des tâches est la suivante :

La section 1 envisage les effets laser à l'échelle de
l'animal entier, de la fonction ou de l'organe. Elle a de plus la charge de
la maintenance du dispositif expérimental et de l'adaptation de celui-ci
aux besoins particuliers de chaque section.

La section 2 s'attache à mettre en évidence les chan-
gements pouvant survenir au niveau des macromolécules biologiques.

La section 3 a comme objectif les effets à l'échelle
cellulaire.

La section 4 se préoccupe des changements suscepti-
bles de survenir au niveau moléculaire, en étudiant essentiellement les
constituants des acides nucléiques.

En résumé, cette organisation permet l'étude des
effets biologiques du rayonnement laser depuis le niveau moléculaire
jusqu'à celui de l'organisme entier.

Voici l'essentiel des résultats obtenus :

Section 1 - On a commencé une recherche sur l'acti-
vité électrique du cortex cérébral de l'animal dont la tête est irradiée au
moyen d'un faisceau focalisé sur 2mm de diamètre. Les différentes déri-
vations montrent une modification des tracés qui paraît plus importante
en ce qui concerne la dérivation frontale. Par contre, la modification de
l'enregistrement de la dérivation front occipitale droite est la plus dura-
ble, elle peut encore être mise en évidence après 24 heures de repos.
Il y a par conséquent un effet certain du faisceau laser sur l'activité du
tissu nerveux de l'encéphale du rat. Des travaux histologiques permettront
peut être d'en approcher le mécanisme. Il y a là une voie qui paraît très
intéressante et qui sera poursuivie.

Du point de vue technologique, deux mises au point ont
été faites, l'une concernant un dispositif de visée, l'autre un support de
lentille pour focalisation.

On s'est également attaché à la solution du grave problème de la dosimétrie sans avoir obtenu pleinement satisfaction.

Signalons enfin une étude de la pénétration du faisceau laser chez l'animal entier. Les premiers résultats obtenus confirment que le faisceau laser pénètre assez profondément dans les tissus.

Section 2 - L'action du rayonnement laser sur l'état moléculaire des acides nucléiques de cellules de foie de rat a été envisagée. On a recherché, en particulier, la présence d'une classe d'acides ribonucléiques de faible poids moléculaire pouvant résulter de la dépolymérisation éventuelle des acides ribonucléiques ribosomiques de constantes de sédimentation 28 S et 16 S.

Dans les conditions expérimentales utilisées, le rayonnement laser non focalisé n'a pas exercé d'effet dépolymérisant. La non-observation d'un effet conduit à étudier l'état moléculaire des ribosomes et le comportement de la ribonucléase en présence du rayonnement. Ces recherches se poursuivent actuellement.

Section 3 - Les recherches consistent ici à mettre en évidence l'éventuelle action du rayonnement laser sur des bactéries pigmentées naturellement ou non, sur support gélose ou en suspension dans l'eau distillée.

3 souches bactériennes différentes : *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* et *Escherichia coli* A 223, provenant de l'Institut Pasteur de Paris ont été utilisées. L'action du rayonnement laser focalisé sur les colonies bactériennes est un phénomène du tout ou rien. Par contre, le rayonnement non focalisé ne produit aucune modification de l'aspect et de la pigmentation des colonies, le taux de croissance des bactéries et leur caractère biochimique. Il est encore trop tôt pour généraliser ces résultats. Il convient de poursuivre les essais sur les bactéries en suspension dans des milieux transparents et dans des milieux colorés.

Des travaux concernant l'action du rayonnement laser sur les suspensions virales viennent de commencer. Ils auront pour but de rechercher l'effet du rayonnement sur les propriétés de différents Myxovirus (PR₈, NDV, Sendai). En effet, ceux-ci sont les supports de diverses propriétés biologiques susceptibles de varier en fonction des conditions chimiques ou physiques, ce qui permet, dans certains cas,

de les séparer et d'étudier leur structure.

La première partie des travaux consistant à cultiver les virus et à les purifier a été menée à bien. La deuxième partie comportant la mise en oeuvre du rayonnement va commencer sous peu.

Section 4 - L'activité de recherche se situe ici au niveau moléculaire, celui des constituants des acides nucléiques : acide désoxyribonucléiques (ADN) et ribonucléiques (ARN).

Dans un premier temps, l'étude des modifications éventuelles des constituants basiques de ceux-ci, bases puriques et pyrimidiques, est envisagé tant in vitro qu'in vivo. L'irradiation de la guanine in vitro a permis de déceler de nombreux produits de dégradation parmi lesquels l'oxalylurée et la dihydroxy-2,6 purine ont été sûrement identifiés, les autres produits sont actuellement en cours d'identification.

Une étude a également été entreprise sur les bases pyrimidiques incorporées in vivo au sein des acides nucléiques de bactéries (*Escherichia coli*). Il a pu être observé, dans ces conditions, des différences significatives, mais une étude similaire sera effectuée avec d'autres colorants.

Enfin, le marquage des purines bactériennes est actuellement à l'étude, dès ce problème technique résolu, la dégradation des bases puriques in vivo sera étudiée.

Constituée dans le courant de l'année 1966/1967, l'unité de recherches a apporté, dans divers domaines, des informations importantes concernant les effets biologiques du rayonnement laser de longueur d'ondes 6943 Å.

Les recherches sont actuellement en plein développement dans chaque section et la prochaine année doit logiquement être encore plus fructueuse.