



J.-M. DOLO

# Étude des radicaux de l'alanine irradiée à l'état solide : Conséquences pour la dosimétrie par RPE

## *Study of radicals of solid irradiated alanine: Consequences upon ESR Dosimetry*

Jean-Michel DOLO<sup>1</sup>, Jacques RAFFI<sup>2</sup>, Tristan GARCIA<sup>1</sup> et Saad TALBI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CEA, LIST, Laboratoire National Henri Becquerel, F-91191 Gif sur Yvette, France, jean-michel.dolo@cea.fr.

<sup>2</sup> Laboratoire de Radiolyse de la Matière Organique, UMR 6171, Faculté des Sciences de Saint-Jérôme, F-13397 Marseille cedex 20, France.

### Résumé

Les différentes hypothèses concernant les espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'alanine [1-3], ainsi que les variations observées dans son spectre RPE [4,5], ont conduit le LNE-LNHB à étudier plus précisément ces radicaux. Les premiers résultats obtenus [6,7] à l'aide de la technique de piégeage de spin ont montré la faisabilité de la méthodologie proposée. Les travaux présentés montrent que cette technique, associée à une technique de séparation par chromatographie liquide, puis une identification par spectrométrie par RPE, ont permis une approche qualitative et quantitative. Cette méthodologie a mis en évidence que, dans ces conditions, seules deux espèces radicalaires ont été formellement identifiées, A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub>. Ces deux espèces reliées respectivement aux radicaux R<sub>1</sub> et R<sub>3</sub> présentent un ratio avec une très grande proportion (environ 95 %) de R<sub>1</sub>. Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus pour deux autres acides aminés chimiquement très proches de l'alanine dans la même famille chimique, la valine et la glycine.

**MOTS CLÉS :** ALANINE, DOSIMÉTRIE, RPE, CLHP, PIÉGEAGE DE SPIN.

### Abstract

*The different hypotheses regarding radical species issued from alanine radiolysis [1-3] and the observed variations on its ESR spectra [4,5] have led LNE-LNHB to study these radicals more precisely. The previous results [6,7] obtained with the spin trapping technique have shown the feasibility of the proposed methodology. Results show that this technique, associated with the separation technique by liquid chromatography, then identification by ESR spectrometry, allows us a qualitative and quantitative approach. With this methodology, only two radical species A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> have been formally identified in our conditions. These two species, linked respectively to radicals R<sub>1</sub> and R<sub>3</sub>, have a ratio with a great proportion (around 95 %) of R<sub>1</sub>. Those results are in agreement with those obtained for two other amino acids chemically close to alanine: valine and glycine.*

**KEY WORDS:** ALANINE, DOSIMETRY, ESR, HPLC, SPIN TRAPPING.

### 1. Introduction

La dosimétrie de l'alanine par RPE est considérée comme une méthode de référence pour la mesure des fortes doses (100 Gy – 100 000 Gy) [8,9]. C'est une méthode relative de transfert adaptée à de nombreux secteurs d'activités car elle assure une traçabilité étendue avec une assez faible incertitude (< 3,0 % à k = 2).

Cette méthode présente plusieurs avantages : mesure non destructive, dosimètre équivalent tissu ponctuel, qui lui donne un intérêt tout particulier pour son développement, tant en métrologie des faibles doses (1 Gy – 10 Gy) que pour son application dans le domaine de la radiothérapie où le contrôle qualité, *in vivo* ou non, se renforce sans cesse. Pour cela, l'objectif requis est d'obtenir des incertitudes inférieures à 2 % (k = 2), tout en étendant le domaine de mesure vers la limite inférieure de détection où le rapport signal sur bruit diminue. Ces deux verrous analytiques nécessitent d'améliorer l'exploitation du spectre RPE dont la résolution à ce niveau de dose est nettement moins bonne.

Le spectre d'alanine est constitué de 5 groupements de pics principaux [5]. Aujourd'hui, l'ensemble des acteurs utilise l'amplitude du pic central attribuée communément à l'espèce majoritaire R<sub>1</sub> (fig. 1), les autres pics correspondent au phénomène de couplage dans le radical. La réponse de l'alanine en fonction de la dose est assimilée à une droite sur le domaine de 1 Gy à 10 Gy. Cependant la signification physique de l'amplitude du

spectre RPE avec la nature chimique de  $R_1$  seul est controversée [1-3,6,7]. L'approche empirique et pragmatique de la courbe d'étalonnage, signal en fonction de la dose, implique l'utilisation de plusieurs termes correctifs dont on constate aujourd'hui une forte dépendance par rapport au dosimètre considéré. Cette dépendance s'observe par rapport aux différents produits commerciaux disponibles [8] et par rapport aux conditions expérimentales (spectromètre et paramètres d'acquisition) pratiquées par les laboratoires [9-14].

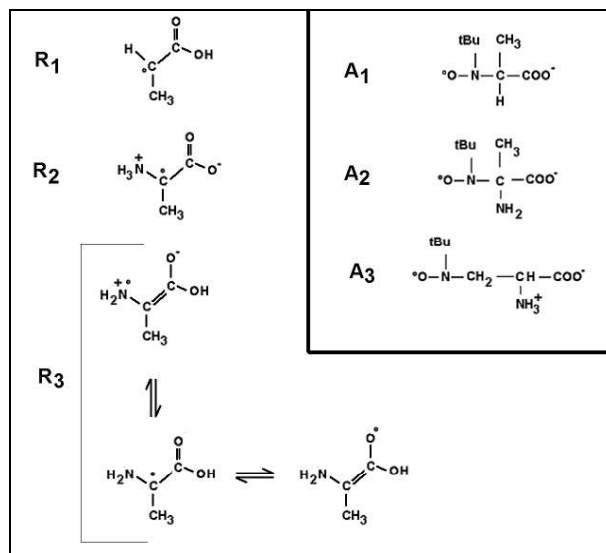


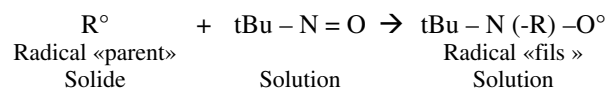
Fig. 1. – Structure des radicaux radio-induits, parents (R) dans la poudre d'alanine selon [1] et fils (A) dans nos solutions d'alanine piégée [6,7].

Ce travail s'inscrit dans la poursuite des travaux concernant la mise en évidence expérimentale des espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'alanine et de leurs proportions [7]. En effet, les données issues de la simulation ne semblent pas pouvoir être suffisamment consolidées afin d'être utilisées en application pour réduire les incertitudes liées à la courbe d'étalonnage. Pour mener à bien cet objectif, une des solutions envisagées est de déconvoluer le spectre afin d'isoler l'espèce principale et de réduire les incertitudes liées à la présence du ou des autres radicaux.

## 2. Résultats

### 2.1. Le piégeage de spin

La méthode de piégeage de spin [14-16], est fondée sur la réaction de l'espèce radicalaire avec une solution de MNP (Méthyle Nitroso Propane) :



Elle a l'avantage de transformer les radicaux  $R^\circ$ , stables en phase solide (mais dont le spectre RPE n'est pas interprétable facilement) en radicaux nitroxydes

$A^\circ = tBu - N(-R) - O^\circ$  stables en phase liquide et présentant des spectres RPE à raies fines plus facilement interprétables lorsque ces radicaux sont isolés. Les études par spectrométrie RPE effectuées en phase poudre, ont montré l'existence de 4 ou 5 espèces potentielles dans l'alanine irradiée, dont l'une très majoritaire. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de la valine et de la glycine (acides aminés dont la structure chimique est proche de l'alanine). Ceci tend à conforter l'hypothèse que le comportement chimique est identique au sein d'une famille de molécules organiques de même type. Les premiers résultats par piégeage de spin n'ont cependant pas permis de mettre en évidence autant d'espèces qu'en phase poudre et ce quel que soit l'acide aminé étudié. Dans le cas de l'alanine, seuls deux radicaux ont été mis en évidence; l'un d'eux étant présent en très faible proportion, il n'a pas pu être identifié ni qualitativement, ni quantitativement. La structure du radical minoritaire identifié  $A_2$  ou  $A_3$ , doit donc être précisée et confirmée. Les spectres RPE des espèces isolées devraient être obtenus après séparation par chromatographie liquide afin de permettre une identification sans ambiguïté.

Les publications [1-3,17] sur ce sujet apparaissent en contradiction au moins partielle sur le plan quantitatif, avec nos premiers travaux [7]. Les calculs et simulations de spectres effectués par une équipe norvégienne [3] à partir de spectres en phase poudre, ont permis de proposer des proportions de radicaux très différentes : 60 % pour le radical  $R_1$  et 40 % pour l'ensemble des 2 autres radicaux  $R_2$  et  $R_3$  (fig. 1). Afin d'accéder aux étapes suivantes pour isoler les espèces radicalaires, plusieurs questions se posent. L'espèce  $R_1$  correspondant au radical  $A_1$  obtenu par piégeage de spin représente dans nos expériences plus de 95 % des radicaux nitroxydes. Avec une proportion de 60 % pour  $R_1$  et de 40 % pour ( $R_2+R_3$ ), il faut donc faire l'hypothèse que, dans nos expériences, le taux de piégeage est quasi nul pour  $R_2$  et  $R_3$ . Comment expliquer alors ce phénomène anormal, celui-ci devrait être identique pour des radicaux d'une même famille ? Si l'on accepte un taux de piégeage identique quelles que soient les espèces, les espèces  $R_2$  et  $R_3$  pourraient conduire à la formation du même radical nitroxyde  $A_2$ , ce qui éliminerait l'hypothèse d'un radical  $A_3$ , mais représenteraient 40 % du total selon les calculs théoriques au lieu des quelques pour-cent trouvés dans nos résultats. Comment expliquer que les calculs en phase solide [2,3] conduisent à des concentrations qui semblent incompatibles avec celles mesurées en phase liquide ?

Afin de vérifier ces hypothèses et répondre aux questions restées en suspens, une méthodologie a été développée afin de garantir une mesure fiable via un taux de piégeage reproductible par une optimisation des conditions notamment de température et de pH. D'une part, l'utilisation d'alanine spécifiquement marquée (fig. 2) devrait permettre une identification sans ambiguïté. D'autre part l'utilisation d'acides aminés proches comme la glycine et la valine, avec la même fonction aminoacide mais avec un groupement aliphatique plus ou moins complexe, devrait permettre une interprétation consolidée par un comportement homogène

au sein d'une famille chimique. Dans les deux cas, la séparation par chromatographie permettra une interprétation des spectres RPE plus aisée.

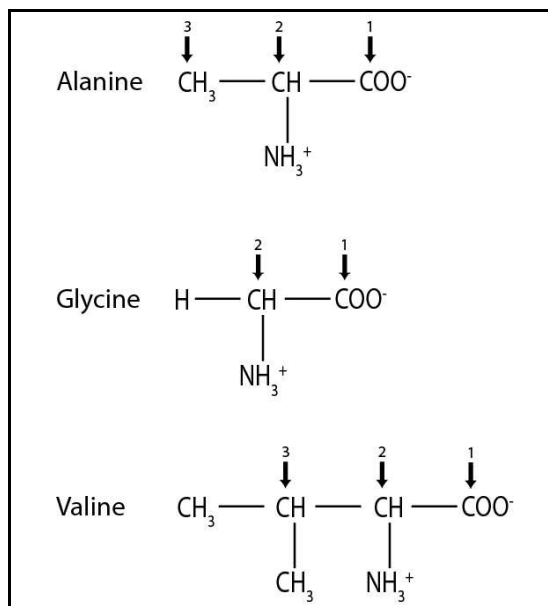


Fig. 2. – Structures chimiques de l’alanine, de la glycine et de la valine et numérotation des atomes de carbone.

La solution de piège a été chauffée vers 40 °C – 45 °C (fig. 3) afin de s’assurer que le MNP est totalement dissous et disponible pour le piégeage. En effet, le piège se présente sous deux formes en équilibre en solution : un dimère non réactif (c’est la seule forme à l’état solide) et un monomère (seule forme susceptible de piéger les radicaux). Cette température correspond au signal RPE le plus intense. D’après la littérature [14-16], les piégeages sont effectués à température ambiante, la solution pouvant être ainsi conservée et utilisée quelques jours. Le chauffage de la solution permet donc un taux de piégeage plus élevé, mais après le refroidissement à température ambiante, la solution de piège perd de son efficacité. Ces conditions de préparation, bien que n’ayant pas fait l’objet d’une étude d’optimisation spécifique, permettent également d’obtenir de bons résultats dans le cas de la valine. Dans le cas de la glycine, il est par contre nécessaire de se limiter à une température de 30 °C.

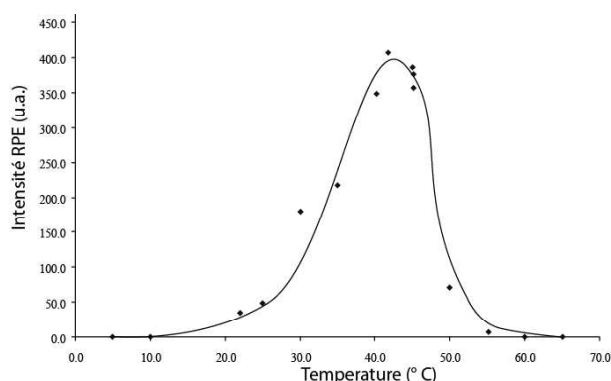


Fig. 3. – Influence de la température de chauffage (juste avant la dissolution de l’alanine dans la solution de piège) sur l’intensité du signal de RPE.

Une fois les radicaux nitroxydes obtenus en plus grande quantité, il a été nécessaire de s’assurer que cette augmentation de la concentration n’a pas induit d’autres réactions ou eu un effet sur sa stabilité. En effet, l’alanine possédant deux fonctions acido-basiques, ces équilibres existent aussi pour les radicaux nitroxydes : la modification de la concentration d’une espèce ou celle du pH modifie donc les équilibres en jeu en solution.

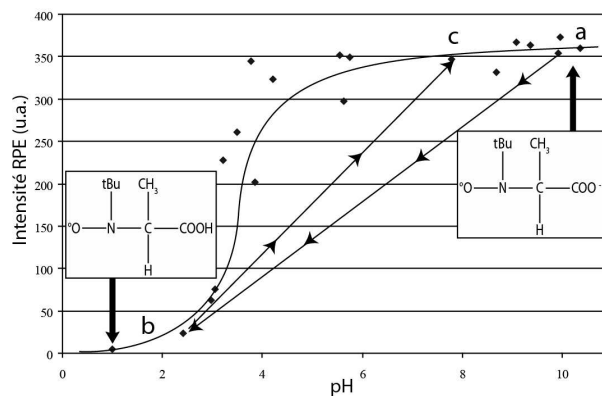
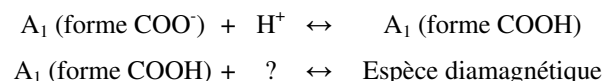


Fig. 4. – Influence du pH sur l’intensité du signal de RPE.

L’effet du pH a donc été étudié en ajoutant des solutions molaires d’acide chlorhydrique ou de soude aux solutions après piégeage. Initialement, la solution de piège a un pH de 4. Ce pH acide est en partie dû au solvant, puisque la solution de piège est obtenue par dissolution du MNP dans de l’eau osmosée qui a un pH de 5,3. Ce pH influence la répartition des charges ioniques des radicaux « nitroxydes – acides aminés ». La solution finale de radicaux nitroxydes obtenue a un pH de 6. La figure 4 montre l’influence du pH sur l’intensité des spectres RPE. Si l’on part d’une solution en milieu basique (point a sur fig. 4), on obtient en milieu acide (point b sur fig. 4) une solution dont le signal RPE est très faible, mais, si l’on ajoute de nouveau de la soude, on obtient une solution (point c sur fig. 4) dont le spectre RPE est de nouveau intense. Les effets du pH sont donc réversibles. Le radical majoritaire  $A_1$  a un comportement acido-basique identique à celui de l’alanine en solution, il a donc deux formes chimiques selon le pH. Toutefois, la forme radicalaire présente en milieu acide devrait également être observée par RPE. Ceci ne correspondant pas à l’observation faite, on peut donc supposer que cela est dû à l’existence d’une espèce diamagnétique (donc non observable par RPE) en équilibre avec la forme des radicaux nitroxydes, stable en milieu acide. Il existe alors deux équilibres successifs :



La structure de cette espèce ne peut pas être décrite à l’aide des méthodes qui ont été utilisées dans cette étude car, par définition, elle ne donne aucun spectre RPE qu’elle soit marquée ou pas. Cependant, une structure envisageable est présentée sur la figure 5. Cette espèce diamagnétique, un dimère, a été proposée lors d’études de piégeages de spins sur les sucres irradiés [18,19]. Ce type

d'espèce faisant appel aux mêmes liaisons, a été observé. Les associations par pont hydrogène sur ces mêmes radicaux « nitroxyde sucre », ont été constatées. Elles permettent d'expliquer l'élargissement des raies en RMN lorsque l'on concentre les solutions. Ainsi, l'effet de l'optimisation des conditions de piégeage, pour obtenir le plus de radicaux stables en solution peut engendrer un effet contraire. La concentration des espèces radicalaires paramagnétiques afin d'obtenir des spectres RPE exploitables peut conduire à des associations de ces mêmes espèces qui deviennent ainsi diamagnétiques et donc indécélables par RPE. Les comportements en fonction du pH, sont similaires pour la valine et la glycine.

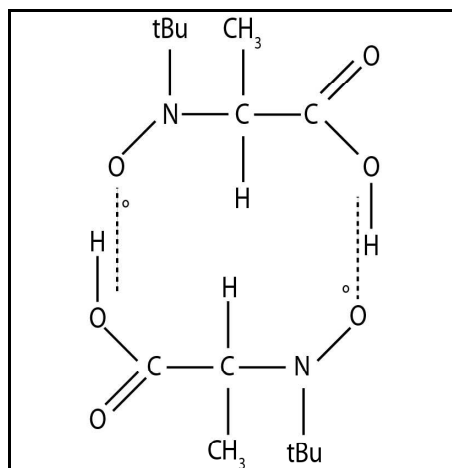


Fig. 5. – Espèce diamagnétique proposée.

Le processus d'optimisation a été poursuivi par concentration des solutions nitroxydes d'alanine en milieu basique. Celle-ci a été réalisée à l'aide d'un évaporateur sous vide, à température ambiante. Ainsi, une solution, concentrée dans les conditions initiales de pH, et dont le pH est ensuite augmenté jusqu'à 10 par ajout de soude, est plus stable à température ambiante (8 jours au lieu de 3 pour une solution de radicaux nitroxydes à pH 6). Cette concentration a permis d'obtenir des spectres de qualité suffisante avec une meilleure définition des signaux dus à l'espèce minoritaire (figure 6-B). Cette réponse correspond à deux triplets de triplets. Le premier est un massif de hauteurs respectives 1 : 1 : 1 qui est dû à l'atome d'azote de la fonction nitroxyde ; le second est de hauteurs 1 : 2 : 1. Cette information est cruciale car elle signifie que l'on a une interaction avec deux protons équivalents ; la structure chimique de ce radical minoritaire est donc celle de  $A_3$  et non de  $A_2$ .

Enfin, le premier réflexe pour augmenter le nombre de radicaux nitroxydes présents dans la solution est d'irradier le solide avec des doses plus élevées. Des doses variables ont donc été testées (10 kGy, 100 kGy et 500 kGy). Les spectres observés ont tous une forme identique et sont relativement proportionnels. L'augmentation du nombre total de radicaux initialement induits dans le solide ne semble donc pas modifier les proportions des différents radicaux.

## 2.2. Étude des acides aminés spécifiquement marqués

L'alanine spécifiquement marquée en positions 1, 2 ou 3 (fig. 2) a été utilisée pour identifier sans ambiguïté les espèces radicalaires en jeu. Afin d'étudier une concentration de radicaux suffisante, compte tenu des faibles masses mises en jeu, des doses très élevées (jusqu'à 270 kGy au lieu de 55 kGy) ont été appliquées. Les spectres RPE d'alanine en poudre et non marquée obtenus ne montrent pas de différences significatives de ceux obtenus à 55 kGy. Cependant, cela n'est pas suffisant pour affirmer qu'il n'y a pas de variation de concentrations ou d'apparition d'espèces nouvelles.

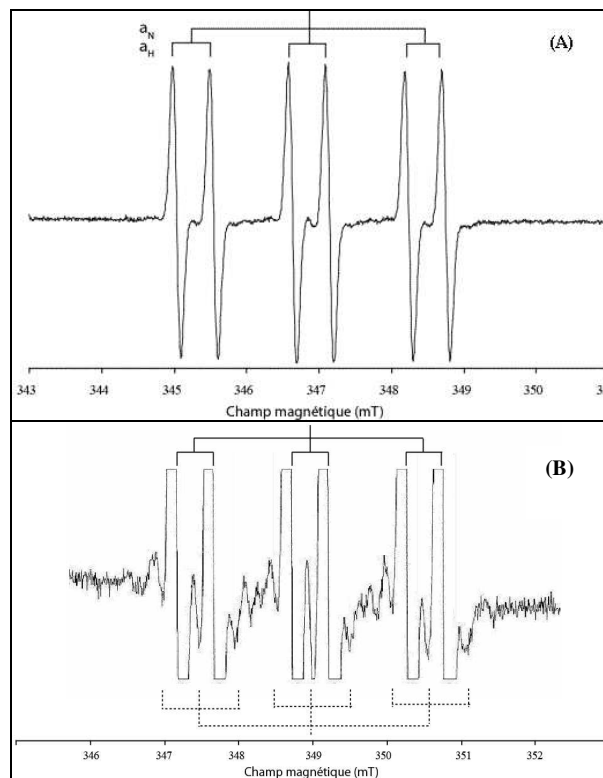


Fig. 6. – Spectres de RPE d'une solution de radicaux nitroxydes obtenus à partir d'alanine irradiée non marquée ; (A) : sans saturation, (B) : avec saturation espèce majoritaire (saturée : traits pleins) et minoritaire (traits pointillés) ; L'échelle des ordonnées est l'intensité RPE en unité arbitraire.

Les spectres de poudre d'alanine marquée au carbone 13, sont eux très différents (fig. 7). L'intérêt d'un marquage au carbone 13 est que, du fait du spin  $\frac{1}{2}$  de cet isotope, la théorie prévoit un dédoublement des raies. Partant d'un spectre de 6 raies pour le radical majoritaire (fig. 6-A), le spectre attendu doit être composé de 12 raies (fig. 8) (sauf recouvrements éventuels à contrôler du fait des constantes hyperfines). La constante hyperfine correspondante doit être d'autant plus importante que l'électron célibataire est proche du carbone spécifiquement marqué. Si l'on considère les marquages en 2 et 3 (fig. 8), la constante hyperfine mesurée est de 0,68 mT pour la position 2 plus élevée qu'en position 3 avec 0,39 mT. Par contre, une valeur de 1,27 mT est obtenue pour la constante hyperfine relative à la position 1 (fig. 8). Cette valeur, anormalement élevée, pourrait

remettre en cause l'attribution de la structure chimique du radical majoritaire.

Le spectre RPE (fig. 9) des radicaux nitroxydes obtenus à partir de glycine irradiée est un triplet de triplet correspondant à l'azote de la fonction nitroxyde (triplet 1 : 1 : 1) et à une fonction CH<sub>2</sub> (triplet 1 : 2 : 1). Ceci confirme bien l'attribution du radical majoritaire sur le carbone 2 de l'alanine. Un marquage sur le carbone 2 conduit à un dédoublement de toutes les raies (fig. 9) avec une constante hyperfine de 0,71 mT comparable au 0,68 mT obtenus dans le cas de l'alanine. Le marquage en position 1 (fig. 9-C) conduit à une constante hyperfine anormalement élevée de 1,25 mT. Dans le cas de la valine, le spectre (fig. 10) est un triplet de doublets compliqué par la présence d'un triplet de singulets ( $a_N = 1,69$  mT) dû à la présence d'un radical parasite. Celui-ci est présent ici systématiquement au contraire des cas de l'alanine et de la glycine où il n'est présent, au plus, qu'en très faible quantité. Ce radical, de formule  $(^t\text{Bu})_2\text{-N-O}^\bullet$ , est formé par réaction du piège sur les radicaux obtenus par décomposition des radicaux nitroxydes. Un marquage sur le carbone 1 permet d'obtenir là encore (fig. 10-B) une constante hyperfine importante de 1,4 mT, confirmant une interaction forte entre les orbitales de l'électron célibataire et de la fonction acide. Les valeurs des différentes constantes hyperfines mesurées sur les radicaux nitroxydes correspondant à ces 3 acides aminés sont rassemblées dans le tableau 1.

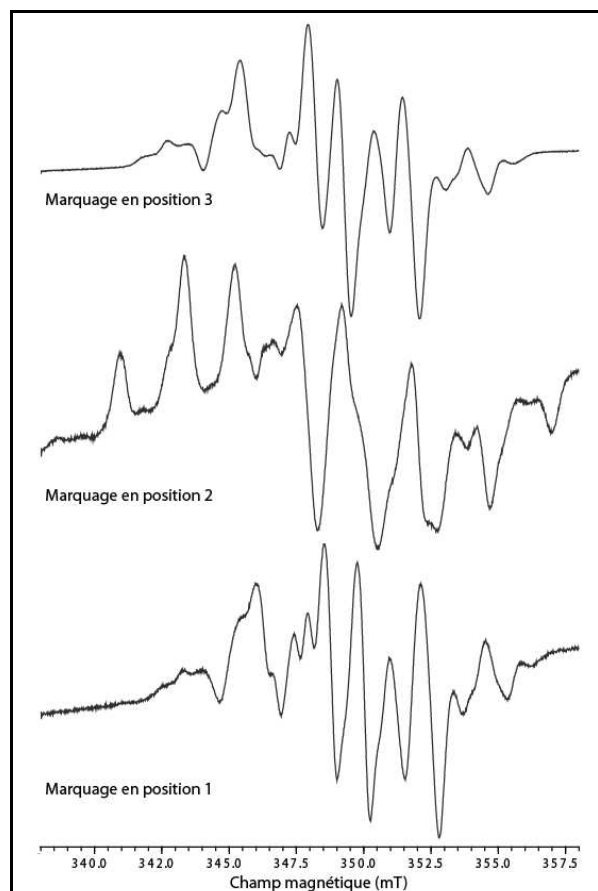


Fig. 7. – Spectres de poudre d'alanines marquées en position 3, 2 et 1 ; L'échelle des ordonnées est l'intensité RPE en unité arbitraire.

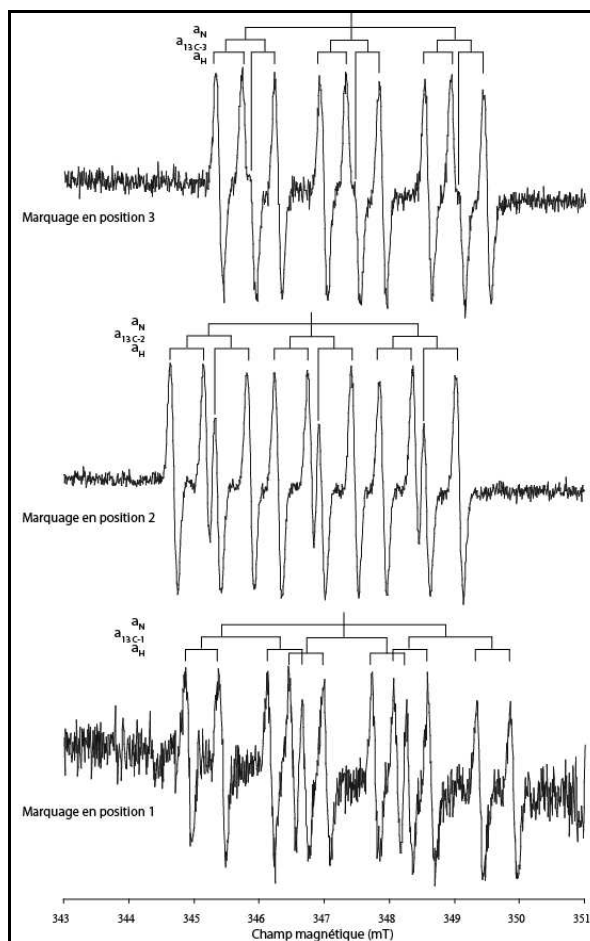


Fig. 8. – Spectres de RPE d'une solution de radicaux nitroxydes obtenus à partir d'alanines marquées en position 3, 2 et 1 ; L'échelle des ordonnées est l'intensité RPE en unité arbitraire.

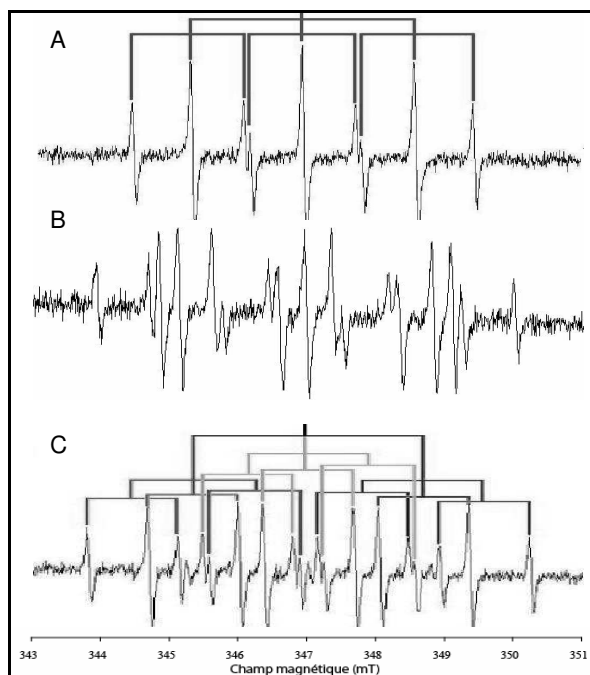


Fig. 9. – Spectres de RPE obtenu après piégeage de la glycine irradiée ; A : non marquée, B : marquée en position 2, C : marquée en position 1 ; L'échelle des ordonnées est l'intensité RPE en unité arbitraire.

Tableau 1  
Valeurs des constantes hyperfines (mT) des radicaux nitroxydes obtenus pour trois acides aminés : glycine, alanine et valine.

	GLYCINE	ALANINE		VALINE
		Radical majoritaire A <sub>1</sub>	Radical minoritaire A <sub>3</sub>	
A(N)	1,60	1,60	1,58	1,57
A(H)	0,84 (2 H)	0,51	0,52 (2 H)	0,38
A(13C-1)	1,25	1,27	n.d.	1,40
A(13C-2)	0,71	0,68	n.d.	n.d.
A(13C-3)	---	0,39	n.d.	n.d.

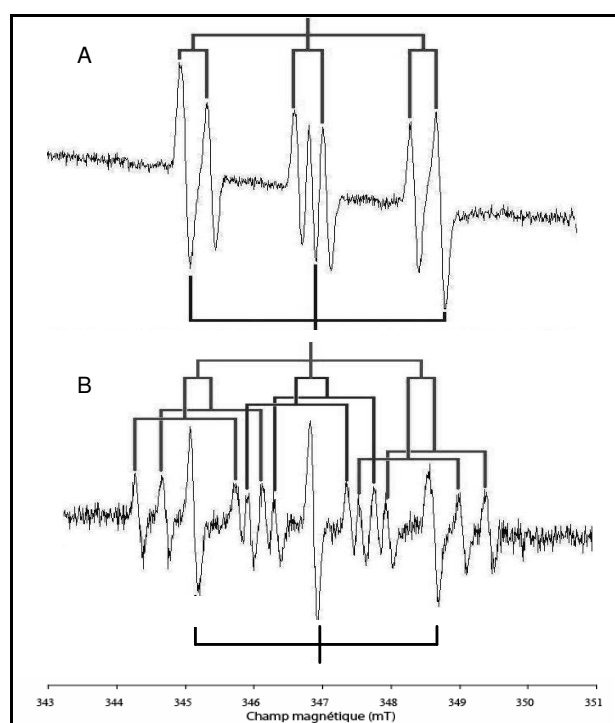


Fig. 10. – Spectre de RPE obtenu après piégeage de valine irradiée ; A : non marquée, B : marquée en position 1 ; L'échelle des ordonnées est l'intensité RPE en unité arbitraire.

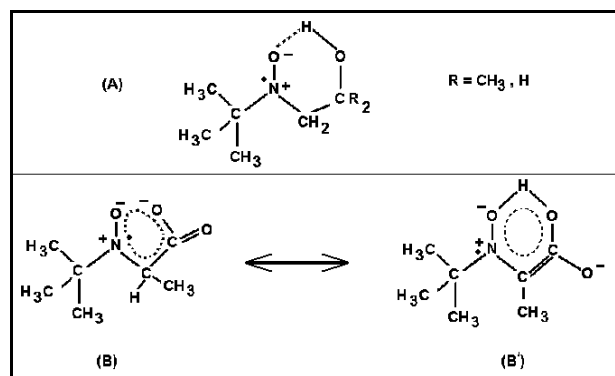


Fig. 11. – Radicaux nitroxydes présentant des ponts ; (A) d'après [14], (B) notre hypothèse.

Si les valeurs des constantes hyperfines des atomes d'azote et des protons ont des valeurs cohérentes, la valeur anormalement élevée de la constante hyperfine du carbone 13, lorsque le marquage spécifique est situé en position 1, ne peut s'expliquer que par un fort recouvrement des orbitales électroniques de l'électron célibataire normalement positionné sur la liaison N-O et de ceux de la fonction acide. Des telles associations intra ou inter moléculaires ont déjà été observées par ailleurs [18-20]. Dans le cas des radicaux nitroxydes-sucres lorsque la concentration en radicaux devient importante, un élargissement des raies est observé du fait des nombreux ponts hydrogène possibles. Ce type de liaison peut empêcher également le piégeage d'un radical radio-induit. L'existence de tels ponts a déjà été prouvée [19] (fig. 11-A). L'hypothèse d'une structure telle que celle de la fig. 11-B est donc plausible et se renforce conjointement avec celle présentée sur la figure 5 même si ces hypothèses ont été proposées au départ pour expliquer des phénomènes différents.

### 2.3. Séparation par chromatographie des radicaux nitroxydes

Le piégeage de l'alanine a permis de mettre en évidence deux espèces dont l'une est largement majoritaire. Une séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) des espèces nitroxydes présentes dans la solution de piégeage a été mise au point afin d'isoler les espèces d'intérêts, de supprimer les interactions avec l'ensemble des autres espèces paramagnétiques ou diamagnétiques présentes et d'obtenir ainsi des spectres d'espèces pures dont la compatibilité sera vérifiée par modélisation.

A l'aide d'une pompe, la solution de radicaux nitroxydes est percolée à travers une colonne. En fonction de la réponse du détecteur (UV visible) et à des intervalles de temps précis, les différentes fractions sont recueillies. Celles-ci sont analysées par RPE. Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour les sucres ionisés [21]. Cependant, la séparation des radicaux nitroxydes par CLHP présente un certain nombre de difficultés particulières à ces produits :

- Il n'existe pas à ce jour de colonne spécifiquement conçue pour la séparation des radicaux nitroxydes; le choix s'est donc porté par défaut, sur une colonne habituellement utilisée pour séparer les acides aminés ;
- Les radicaux nitroxydes sont relativement stables à température ambiante, d'où la possibilité d'effectuer une CLHP; Cependant une vérification de leur non destruction durant la chromatographie a été nécessaire ;
- Les acides aminés peuvent être séparés par CLHP à une température comprise entre 60 °C et 80 °C. De telles températures sont inapplicables à nos radicaux qui seraient détruits. De ce fait, les conditions de séparation ne sont pas optimales ;
- L'éluant retenu est l'eau, son utilisation diminue la concentration; des conditions opératoires moyennes

ont permis d'optimiser le nombre de fractions avec un volume adapté pour que les concentrations finales de radicaux soient suffisantes pour la détection par RPE.

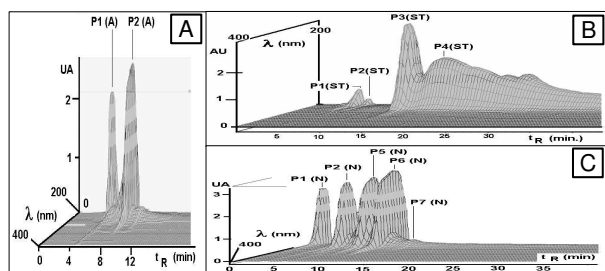


Fig. 12. – Exemples de chromatogrammes :  
 A : d'une solution d'alanine irradiée (sans piège),  
 B : d'une solution de piège pur (sans radicaux),  
 C : d'une solution de radicaux nitroxydes obtenue par piégeage de l'alanine irradiée.

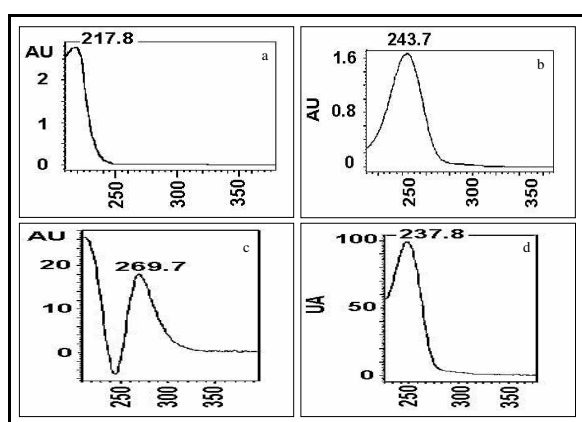


Fig. 13. – Spectres UV : a) de l'alanine, pic P2(A) ; b) du piège, pic P3(ST) ; c) du radical majoritaire, pic P5(N) ; d) du radical minoritaire, pic P4(N).

La colonne utilisée est à polarité inverse, la séparation est donc principalement chimique. Le constituant de base de la colonne est une chaîne apolaire, celle-ci a donc tendance à retenir les produits apolaires et à éluer plus rapidement les produits polaires. Cependant, la séparation peut également être physique en retenant les produits de masse moléculaire élevée (en particulier dans une gamme de produit de même polarité). Le détecteur UV permet de balayer un intervalle de longueurs d'ondes compris entre 200 nm et 400 nm, cependant une seule longueur d'onde peut être à la fois sélectionnée et enregistrée. Les chromatogrammes à 3 dimensions (absorbance, longueur d'onde du détecteur, temps de rétention) présentés ci-après, sont donc des reconstructions obtenues à partir d'une quinzaine d'injections d'une même solution.

Les figures 12 et 13 constituent des exemples de chromatogrammes et de spectres UV pour lesquels les temps de rétention sont présentés dans les tableaux 2 et 3. Ces temps ont été déterminés à partir de moyennes sur les expériences effectuées. La figure 12-A montre, dans le cas d'une solution pure d'alanine irradiée, deux pics correspondant à l'alanine, P2(A) et à l'un de ses produits de radiolyse, P1(A). La figure 12-B montre le

chromatogramme d'une solution de piège pur, c'est à dire sans alanine irradiée et donc, sans radicaux nitroxydes-alanine. La présence de deux impuretés, P1(ST) et P2(ST) est observée, ensuite le monomère P3(ST), enfin le dimère P4(ST) qui présente une très longue traîne ( $t_R$  de 15 min à 35 min environ). Cette traîne s'explique par le ré-équilibre entre monomère et dimère tout au long du passage dans la colonne de chromatographie. La figure 12-C présente la solution de radicaux nitroxydes, 7 pics sont présents lors de la chromatographie. Par comparaison des temps de rétention moyennés sur l'ensemble des chromatographies et leurs spectres UV (fig. 13) obtenus pour les deux solutions de référence : alanine irradiée seule (fig. 12-A) et piège seuls (fig. 12-B), l'identification des pics a pu être réalisée (fig 12-C). Certains pics sont attribués sans ambiguïté :

- le pic P2(N) correspond au passage du produit de radiolyse de l'alanine P1(A) et de l'autre impureté du piège P1(ST) ;
- le pic P3(N) correspond au passage de l'alanine P2(A) et d'une impureté du piège P2(ST) ;
- le pic P4(N) est attribué au radical majoritaire. C'est la seule fraction recueillie qui a permis d'obtenir un spectre RPE ;
- le pic P6(N) correspond à celui du monomère P3(ST) ;
- le pic P7(N) correspond au pic P4(ST) du dimère.

Toutefois certains d'entre eux n'ont pas pu être attribués avec certitude :

- le pic P1(N) n'a pas été attribué. Il n'est pas systématiquement observé et il n'a pas été possible d'obtenir un spectre RPE à partir de la fraction recueillie ;
- le pic P2(N) semble être le radical minoritaire, mais il a été impossible d'obtenir un spectre RPE à partir de la fraction recueillie. Sa forte absorption en UV (fig. 13) montre bien qu'il s'agit d'une espèce différente des autres.

Concernant cette dernière fraction, l'hypothèse de la présence du radical minoritaire est émise, quoique son spectre RPE n'ait pu être mis en évidence, et repose sur plusieurs considérations. Tous les travaux antérieurs montrant que les temps de rétention de divers radicaux nitroxydes sont relativement proches à l'exception notable du radical parasite [21], cette espèce ayant été observée dans le mélange, l'éventualité qu'elle ait un temps de rétention exceptionnellement long qui n'a pas été observé, est faible. L'hypothèse d'une décomposition partielle ou totale de cette espèce sur la colonne est la plus probable et peut être envisagée. Des essais à basse température (7 °C) n'ont pas donné de résultats différents. Une telle instabilité de l'espèce minoritaire n'est malheureusement pas impossible, bien que ce type de colonne ait déjà été utilisé avec succès pour séparer sans dégradation des radicaux nitroxyde-tyrosyle [20]. Il reste 3 raisons possibles pour expliquer l'absence d'observation du radical par RPE. La première est l'éventualité d'une trop faible quantité de radicaux dans la fraction recueillie, inférieure au seuil de détection du spectromètre. La seconde est une décomposition du radical lorsque sa

concentration est plus forte. Enfin, ce radical minoritaire pourrait également comme nous l'avons montré pour le radical majoritaire se configurer lors de sa concentration en une espèce diamagnétique. La deuxième hypothèse est très probable car lors des expériences de variation de concentration, le radical minoritaire n'a pas été mieux observé. De plus, s'il a été possible d'augmenter la concentration du radical majoritaire, le gain obtenu a toujours été inférieur au rapport des volumes avant et après concentration, signe d'une décomposition partielle du radical majoritaire.

Tableau 2

*Pics des chromatogrammes des solutions aqueuses d'alanine irradiée [P1(A) et P2(A)] et de piège [P1(ST) à P4 (ST)].*

Pics	$t_R$ (min)	Observations
P1(A)	4.4	Produit de radiolyse de l'alanine
P2(A)	6	Alanine. Pic UV: maximum à 217,8 nm
P1(ST)	4,6	Impureté
P2(ST)	6,1	Impureté
P3(ST)	10	Piège sous forme monomère. Pic UV: maximum à 243,7 nm
P4(ST)	15 à 35	Piège (dimère en équilibre avec le monomère)

Tableau 3

*Pics des chromatogrammes de la solution de nitroxydes [Pics N1(N) à N7(N)] en comparaison avec ceux des solutions aqueuses d'alanine irradiée [P1(A) et P2(A)] et de piège [P1(ST) à P4(ST)].*

Pics	$t_R$ (min)	Pics	Conclusions
P1(N)	1,5 à 2		Non attribué et pas toujours observé
P2(N)	4 à 4,5	P1(A) + P1(ST)	Produit de radiolyse de l'alanine passant en même temps qu'une impureté du piège
P3(N)	5,5	P2(A) + P2(ST)	Alanine passant en même temps qu'une impureté du piège
P4(N)	6,7		Non attribué <sup>(a)</sup> Pic UV : max. à 237,8 nm
P5(N)	7,9		Radical majoritaire <sup>(b)</sup> Pic UV : max. à 269,7 nm
P6(N)	10 à 11	P3(ST)	Piège sous forme monomère Pic UV : max. à 243,7 nm
P7(N)	15 à 35	P4(ST)	Piège (dimère en équilibre avec le monomère)

(a) peut être le radical minoritaire ;

(b) un spectre RPE a pu être enregistré à partir de la fraction recueillie après CLHP.

### 3. Discussion

La solution de piège après dissolution de l'alanine irradiée en phase solide est un mélange complexe que la chromatographie a pu séparer avec efficacité. Quoique le système se soit compliqué par l'ajout de nouvelles espèces, cette technique a mis en évidence que les radicaux de l'alanine ne constituent que des espèces rares au milieu de beaucoup d'alanine et d'autres produits issus de la radiolyse. Même dans ce cas, la solution, mélange issu du piégeage de spin a permis une première exploitation. Indépendamment de toute simulation, et en multipliant le spectre des solutions de radicaux nitroxydes par un facteur 2, 4, 8... quitte à saturer le signal de l'espèce majoritaire, il a été possible d'obtenir des spectres du type de la figure 6-B. Une telle opération a donc permis d'apporter par l'observation de la forme du spectre «triplet 1 : 1 : 1» et «triplet 1 : 2 : 1» la preuve de la présence et de la structure chimique du radical correspondant, A<sub>3</sub>. Il a été également possible d'estimer les proportions relatives des deux espèces, en utilisant les intensités des différentes raies. Sur l'ensemble des spectres étudiés, on peut ainsi estimer que la proportion relative de l'espèce minoritaire est de l'ordre de 3 % à 4 % du total des deux espèces observées. A la suite des expériences effectuées, la preuve de l'existence d'une espèce très majoritaire est démontrée expérimentalement, ce qui est également confirmé pour les deux autres acides aminés étudiés. Les proportions mesurées pour ces radicaux fils n'ont aucune raison d'être différentes pour les radicaux parents. Ces résultats sont donc en contradiction au moins apparente avec les travaux et calculs de l'équipe norvégienne [1-3]. Les structures des radicaux R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> proposés par cette équipe devraient être piégés par la molécule piège qui n'est pas sélective. Cette non-observation de ces radicaux piégés en concentration notable pourrait résulter des hypothèses de départ qui régissent ces simulations. L'existence supposée, mais probable, de forts couplages en milieu liquide entre l'électron célibataire du radical et sa fonction acide permet de suggérer une nouvelle hypothèse. Il pourrait également exister en phase solide de tels couplages dans la maille cristalline. Ce type de couplage entre l'électron célibataire du radical (immobilisé dans la maille cristalline) et les nombreuses fonctions «acide» et «amine» des molécules voisines au sein de la structure cristalline est possible si les distances interatomiques (et/ou intermoléculaires) sont compatibles. Indépendamment de la présence d'électrons célibataires liés aux radicaux, de tels ponts existent et sont très stables en phase solide puisqu'ils permettent la cohésion du cristal ionique. Ce sont d'ailleurs ces mêmes ponts qui sont détruits lors de la dissolution liée au piégeage. Ainsi, les radicaux pourraient n'être que des formes différentes (ici deux) d'un même radical, le «radical unique» ou «pur», les conformations spatiales variables provenant d'une association de ce radical avec des molécules d'alanine voisines ou un radical voisin. En effet, des réactions bi-moléculaires ont déjà été observées en phase solide : notamment une transformation d'un radical glucose centré sur le carbone 6 en un radical glucose centré sur le carbone 1 [18-21]. L'analyse du



spectre RPE de l'alanine irradiée en phase solide [6,7] faisait état d'un potentiel de 4 ou 5 espèces radicalaires différentes liées aux comportements différents des raies. Pour la spectrométrie par RPE, ce qui est vu comme une « espèce radicalaire différente » aussi bien veut dire :

- une espèce chimiquement différente avec des types de noyaux, nombre de noyaux chimiquement identiques ;
- une espèce chimiquement identique mais dans un environnement physiquement ou chimiquement différent (ce qui modifie le spectre).

Ce sera le cas par exemple selon que, dans la maille cristalline, le radical formé (à la place d'une molécule d'alanine) est proche de la fonction amine ou de la fonction acide carboxylique d'une molécule d'alanine. En phase solide, la configuration spatiale étant conservée, le radical apparaît avec son spectre particulier. En phase liquide, il peut se transformer pour atteindre une configuration plus stable qui peut aller jusqu'à le faire « disparaître » pour des raisons de diamagnétisme par exemple. Un élément de preuve a pu être apporté par les observations effectuées sur des spectres de haute résolution. Des changements ont été observés dans les spectres RPE en phase solide pour des alanines d'origines commerciales différentes et donc potentiellement d'organisation interne de comprimés différente [22] qui se manifestent notamment lors de mesure en réponse angulaire. Ainsi, il est probable que les calculs de simulation en phase solide ne prennent pas encore suffisamment en compte les différentes conformations possibles liées à leur environnement ; les résultats d'une première étude sur ce sujet sont sans équivoque [23,24]. Il semble donc qu'en phase liquide le radical majoritaire ou minoritaire, (dans des conditions de pH ou de concentration spécifiques), puissent se présenter comme diamagnétiques. En phase solide, compte tenu d'une teneur en eau qui ne peut pas être nulle (voire imposée à l'aide d'un taux d'humidité élevé voisin de 60 % [25]), le pH intra pastille tout comme la dose (qui fait augmenter la probabilité de proximité des radicaux par élévation de leur concentration) doivent influencer la répartition des conformations. Le moyen analytique qu'est la spectrométrie par RPE, n'apporte alors que l'image globale de cette répartition. Les changements dans le spectre peuvent s'observer par exemple au travers des variations des rapports de pics [5] et/ou dans la réponse angulaire [17]. En chimie des solutions, la réaction de deux radicaux identiques en une molécule stable diamagnétique contribue à la perte du signal RPE au cours du temps. En phase solide une reconfiguration plus stable du radical avec son environnement assurant un diamagnétisme apparent est plus probable.

#### 4. Conclusion

L'objectif était d'obtenir les spectres RPE purs des radicaux nitroxydes par piégeage de spin sur de l'alanine irradiée en phase solide afin d'identifier avec certitude le radical majoritaire et le (ou les) radicaux minoritaires. Via l'obtention de  $A_1$  seul et de  $(A_1+A_3)$ , cet objectif d'identification qualitative a été atteint. Quantitativement,

les résultats sont moins satisfaisants puisque l'espèce isolée  $A_3$  qui correspondrait théoriquement à  $R_3$  n'a pu être obtenue. Il est cependant possible par soustraction d'obtenir le spectre de RPE « pur » de l'espèce minoritaire.

L'utilisation des spectres des poudres d'alanines spécifiquement marquées obtenus lors de cette étude ainsi que le piégeage de spin sur celles-ci, a apporté des informations décisives. La poursuite de leur utilisation dans des comprimés prototypes ainsi que la confrontation avec des simulations pourraient apporter de nouvelles informations.

Si les proportions obtenues ne permettent pas de conclure en l'état, elles confirment cependant la nécessité d'essayer d'obtenir une courbe d'étalonnage uniquement basée sur le radical majoritaire  $R_1$ . Cette fraction de quelques pourcents de radical minoritaire est un frein à la réduction des incertitudes tant qu'elle n'est pas maîtrisée dans sa constance par une déconvolution adaptée ou d'une mesure de  $R_1$  dans le spectre où l'on est sûr que la contribution de  $R_3$  est nulle. Aujourd'hui, les spectres simulés de  $R_1$  et  $R_3$ , par l'équipe norvégienne ou le LNE-LNHB, ne permettent pas, à eux seuls, de reconstruire un spectre par combinaison suffisamment réaliste et proche des spectres expérimentaux observés. La déconvolution est donc pour l'instant inapplicable.

Enfin, cette étude montre que la conformation spatiale des radicaux se révèle plus complexe que prévue en phase liquide par des associations bi-moléculaires sous l'influence du pH qui aboutissent à des espèces diamagnétiques. Il semble évident qu'en phase solide cette même conformation spatiale en phase solide *a priori* plus pérenne, soit encore plus sujette à l'influence de ces mêmes paramètres, et que de ce fait, elle soit observée dans le spectre RPE.

#### Remerciements

Les auteurs remercient le LNE/DRST pour le soutien financier apporté à cette étude *via* le contrat d'action d'incitation n° 05 3 004.

#### Références

- [1] SAGSTUEN E., HOLE E., HAUGEDAL S. et NELSON W., "Alanine radicals: structure determination by EPR and ENDOR of single crystals X-irradiated at 295°C", *J. Phys. Chem.*, **101**, 1997, 9763-9772.
- [2] HEYDARI M., MALINEN E., HOLE E. et SAGSTUEN E., "Alanine radicals. 2. The composite polycrystalline alanine EPR spectrum studied by ENDOR, Thermal Annealing, and Spectrum Simulations", *Phys. Chem. A*, **106(38)**, 2002, 8971-8977.
- [3] MALINEN E., HULT E., HOLE E. et SAGSTUEN E., "Alanine radicals, Part 4: Relative amounts of radical species in alanine dosimeters after exposure to 6-19 MeV electrons and 10 kV-15 MV photons", *Radiat. Res.*, **159**, 2003, 149-153.

- [4] DOLO J.-M., PICHOT E. et FEAUGAS V., "Evaluation of some parameters which influence the ESR measurements for the fading study of alanine dosimeters", *Appl. Magn. Reson.*, **15**, 1998, 269-277.
- [5] DOLO J.-M. et MOIGNAU F., "Use of the entire spectrum of irradiated alanine for dosimetry", *Appl. Radiat. Isot.*, **62**, 2005, 281-285.
- [6] TALBI S., RAFFI J., ARÉNA S., PICCERELLE P., PRINDERRE P. et DOLO J.-M., "EPR of gamma induced radicals in amino acid powders", *Spectrochimica Acta*, **60** (6), 2004, 1335-1341.
- [7] DOLO J.-M., RAFFI J. et PICCERELLE P., « Étude du mécanisme de radiolyse de l'alanine et des acides aminés - Implications pour la métrologie des rayonnements ionisants : Dosimétrie par Résonance Paramagnétique Électronique de l'alanine », *Revue française de métrologie*, **4**, 2005, 5-15.
- [8] DOLO J.-M. et GARCIA T., "Composition of alanine pellet dosimeters: background study for low doses applications, *PTB reports n°PTB-Dos-51*, Alanine Dosimetry for clinical applications", Braunschweig, mai 2006, 15-20.
- [9] REGULLA D.F. et DEFFNER U., "Dosimetry by ESR spectroscopy of alanine", *Int. J. Appl. Isot.*, **33**, 1982, 1101-1114.
- [10] MOSSE D., "ESR/alanine dosimetry applied to radiation processing", *Radiat. Phys.*, **31**, 1988, 413-417.
- [11] SHARPE P.H.G., RAJENDRAN K. et SEPHTON J.P., "Progress towards an alanine/ESR therapy level reference dosimetry service at NPL", *Appl. Radiat. Isot.*, **47**, 1996, 1171-1175.
- [12] FEAUGAS-LEBERRE V., « Caractérisation des facteurs influents sur l'évolution du signal RPE de l'alanine irradiée, 1999 », *Thèse de Doctorat de sciences de l'Université de Paris-Sud*, n° 5922, 16 novembre 1999.
- [13] ANTON M., "Developpement of a secondary standard for the absorbed dose to water based on the alanine EPR dosimetry system", *Appl. Radiat. Isot.*, **62**, 2005, 779-795.
- [14] RIESZ P. et RUSTGI S., "Aqueous radiation chemistry of protein and nucleic acid constituents: ESR and spin-trapping studies", *Radiation Physics and Chemistry*, **13**, 1979, 21-40.
- [15] MINEGISHI A., BERGENE R. et RIESZ P., "ESR of spin-trapped radicals in gamma-irradiated polycrystalline amino acids, N-acetyl amino acids and dipeptides", *Int. J. Radiat. Biol.*, **38**, 1980, 627-650.
- [16] KUWABARA M., LION Y. et RIESZ P., "ESR of spin-trapped radicals in gamma-irradiated polycrystalline nucleic acid constituents and their halogenated derivatives", *Int. J. Radiat. Biol.*, **39**, 1981, 495-490.
- [17] BAN F., WETMORE S.T. et BOYD R.J., "A density functional theory investigation of the radiation products of L-alanine", *J. Phys. Chem.*, **A103**, 1999, 6650-6657.
- [18] THIÉRY C., AGNEL J.-P., FRÉJAVILLE C. et RAFFI J., "ESR spin-trapping analysis of gamma induced radicals in polycrystalline alpha-D-glucose", *J. Phys. Chem.*, **87**, 1983, 4485-4488.
- [19] JANZEN E. et LOPP I., "ESR of intramolecularly hydrogen-bonded nitroxides produced in spin trapping hydroxyalkyl radicals", *J. Magn. Res.*, 1972, 107-110.
- [20] QUIAN S., CHEN Y.-R., DETERDING L.J., FANN Y.C. et CHIGNELL C.F., "Identification of protein-derived tyrosyl radical in the reaction of cytochrome c and hydrogen peroxide: characterization by ESR spin-trapping, HPLC and MS", *Biochem. J.*, **363**, 2002, 281-288.
- [21] AGNEL J.-P., THIÉRY C., BATESTI C., VINCENT P. et RAFFI J., "High Performance Liquid Chromatography and Electron Spin Resonance studies of some sugar-nitroxide solutions", *Analyt. Lett.*, **18**, 1985, 1013-1025.
- [22] GARCIA T. et DOLO J.-M., "Investigations on the angular dependence of the alanine spectrum", *Reports of the Physikalisch-Technische Bundesanstalt*, **PTB-Dos-51**, 2006, 21-28.
- [23] MATSUKI K. et MIYAGAWA I., "ENDOR study of an irradiated crystal of L-alanine structure and the environment of the unstable CH<sub>3</sub>C.HCO<sub>2</sub>-radical", *J. Chem. Phys.*, **76**, 1982, 3945-3952.
- [24] PAUWELS E., VAN SPEYBROEK V., LAHORTE P. et WAROQUIER M., "Density functional calculations on alanine-derived radicals: influence of molecular environment on EPR hyperfine coupling constants", *J. Phys. Chem.*, **A105**, 2001, 8794-8804.
- [25] ARBER J.M. et SHARPE P.H.G., "Fading characteristics of irradiated alanine pellets: the importance of pre-irradiation conditioning", *Appl. Radiat. Isot.*, **44**, 1993, 19-22.

---

Article reçu le 19 novembre 2007 ; version révisée reçue le 23 juin 2008.