

## DOMMAGES DE L'ADN INDUITS PAR LE LASER ARF

C. Chapel, A. Burgain, F. Marliot, E. Cordier, D. Courant

Service radiobiologie fondamentale. DRR/DSV, CEA BP. 6, 92260 Fontenay aux Roses

La photoablation, au cours de la chirurgie réfractive, par le laser Argon Fluor (ArF) émettant dans l'ultraviolet C à 193 nm, expose les cellules viables autour de la zone traitée à des doses sub-ablatives ( $< 400 \text{ joules} \cdot \text{m}^{-2}$ ).

Malgré l'absorption plus élevée de l'ADN à 193 nm, le rayonnement laser est moins cytotoxique que celui émis par les lampes UVC à 254 nm (Chapel et al, 2002). Par ailleurs, *in situ*, l'ADN serait protégé du rayonnement laser par les composants cellulaires. Ainsi, certains auteurs estiment que ce rayonnement est sans effet génotoxique (Green et al, 1987) alors que d'autres le soupçonnent d'être mutagène (Rasmussen et al, 1989 ; Rimoldi et al 1991). Globalement, le recul sur l'utilisation de ces lasers est d'une quinzaine d'années, des problèmes de cicatrisation à court terme ont été décrits mais il reste de nombreuses questions concernant les effets à long terme et le mécanisme d'atteinte des cellules adjacentes à la zone irradiée. Le travail décrit les effets du laser ArF sur l'ADN. Nous nous sommes attachés plus particulièrement à travailler sur les cellules cibles de ce laser : les kératocytes ou fibroblastes de stroma cornéen responsables de l'intégrité structurale de la cornée.

Nous avons montré que l'irradiation de kératocytes entraînent la formation de cassures immédiates de l'ADN, analysée par le test alcalin des comètes (Albertini et al, 2000). Deux heures après irradiation les dommages générés à la plus forte dose (mesurés par l'Olive Tail Moment ou OTM) n'ont pas été réparés et témoignent en partie de l'induction d'un processus apoptotique dans les cellules où l'ADN est trop lésé. (Figure 1)

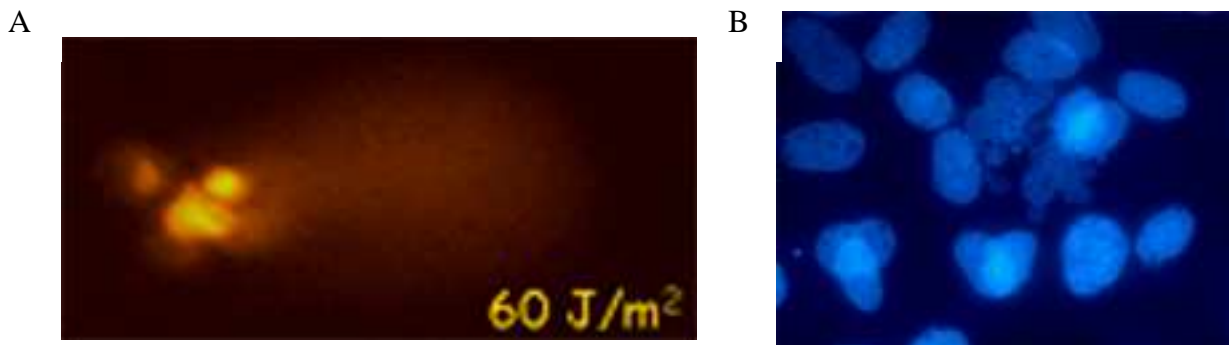


Figure 1 : Le laser ARF peut déclencher des cassures de l'ADN observées par le test de comètes (A). Lorsque l'ADN n'est pas réparé les cellules déclenchent l'apoptose (B).

Afin d'étudier plus spécifiquement les cassures double chaîne de l'ADN, la phosphorylation de l'histone H2Ax ( $\gamma$ H2Ax) a été étudiée par immunofluorescence à différentes doses d'irradiation laser sur des kératocytes, en comparaison à des cellules contrôles non irradiées. Les résultats montrent une augmentation dose dépendante du nombre de cellules marquées pour l'histone  $\gamma$ H2Ax sous forme de nombreux foyers. (Figure 2)

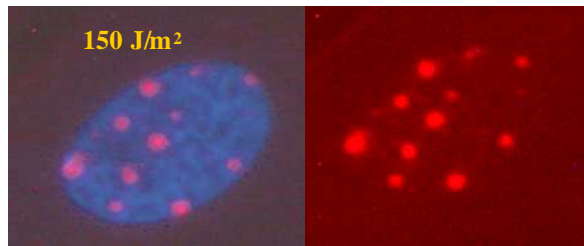


Figure 2 : L'irradiation laser 193 nm induit la formation de foyers  $\gamma$ H2Ax dans des kératocytes humains.

Les conséquences de cassures d'ADN non réparées peuvent être observées par la formation de micronoyaux (avec ou sans cytochalasine B, selon les cellules). Nos résultats montrent, là encore, une augmentation du nombre de micronoyaux lorsque les cellules ont été irradiées par le laser. Les techniques de cytogénétique nous ont permis de mettre en évidence la formation d'aberrations chromosomiques dès 30 minutes après irradiation laser et augmentant avec la dose d'exposition (de 10 à 150 joules.m<sup>2</sup>). Le nombre de cassures diminue avec le temps, sur une période de 10 jours post-irradiation, mais environ 10 % d'anomalies (pour 50 métaphases analysées par point) persistent dans les cellules irradiées.

En conclusion, la fréquence des phénomènes observés dans la cellule après irradiation laser tels que les cassures double brin marquées par les  $\gamma$ H2AX, la présence de micronoyaux et les cellules en apoptose augmentent proportionnellement avec les doses d'irradiation. Bien que faibles, ces doses peuvent être considérées comme génotoxiques pour les cellules du stroma, adjacentes à la zone d'ablation. En effet, même si les cellules survivent à ces irradiations en réparant les dommages de l'ADN, elles ne restent pas moins fragilisées. Ces atteintes pourraient induire un vieillissement accéléré des cellules et, par extrapolation, de la cornée du patient traité.

## Références

- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E., Tice, R., Waters, M. D. and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res* 463(2): 111-172.
- Chapel C, C. Billy, F. Hoffschir, S. Chanel et D. Courant. Toxicité cellulaire induite par l'irradiation Laser à 193 nm. *Laser Bioeffects*, Paris, June 2002
- Green, H., Boll, J., Parrish, J. A., Kochevar, I. E. and Oseroff, A. R. (1987). Cytotoxicity and mutagenicity of low intensity, 248 and 193 nm excimer laser radiation in mammalian cells. *Cancer Research* 47: 410 - 413.
- Rasmussen, R. E., Hammer-Wilson, M. and Berns, M. W. (1989). Mutation and sister chromatid exchange induction in chinese hamster ovary (CHO) cells by pulsed excimer laser radiation at 193 and 308 nm and continuous UV radiation at 254 nm. *Photochemistry and Photobiology* 49(N°4): 413 - 418.
- Rimoldi, D., Miller, A., Freeman, S. and Samid, D. (1991). DNA damage in cultured human skin fibroblasts exposed to excimer laser radiation. *J Invest Dermatol* 96(6): 898-902.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à adresser leurs remerciements à Monsieur le Professeur V. Borderie, Mme E. Zito, M.D (Service d'Ophthalmologie CHNU, Saint Antoine, Paris), Mme F. Hoffschir (DSV/DRR/ LRP) et Mme O. Rigaud (DSV/DRR/ LCE) pour leur aide et leurs précieux conseils.