

Exemples d'utilisation du Tritium en biologie

par W. G. VERLY

Agrégé, Université de Liège (Belgique)

L'hydrogène est l'espèce atomique la plus abondante dans la matière vivante. Pour comprendre les transformations métaboliques, il est souvent indispensable de connaître le sort des atomes d'hydrogène ; on dispose pour ces études de deux isotopes rares de l'hydrogène : le deutérium et le tritium. L'avantage incontestable du tritium est lié à sa radioactivité qui lui confère, par rapport au deutérium, une sensibilité 10^{10} fois plus grande. Pour étudier l'origine biologique du groupe méthyle de l'adrénaline des surrénales du rat, nous avons dû utiliser du tritium (1) ; le deutérium ne pouvait le remplacer parce que la dilution au cours des transformations métaboliques et des manipulations chimiques était trop considérable.

Lorsque la molécule étudiée n'est pas rompue par les processus métaboliques, il importe peu de marquer l'un ou l'autre de ses atomes. On a souvent le choix entre carbone et hydrogène. L'avantage du tritium sur le C^{14} se trouve dans une demi-période plus courte (12.5 ans au lieu de 5600) liée à une activité spécifique plus élevée (environ 1000 fois). Il arrive souvent que les biologistes soient limités par un manque de sensibilité de la méthode isotopique. Pour faire une étude détaillée du métabolisme d'une substance marquée au C^{14} , on est parfois obligé d'administrer des doses de l'ordre du milligramme par kilo d'animal. Si la substance soumise à l'étude est une hormone ou une vitamine qui agit physiologiquement à la dose du microgramme par kilo, la substance marquée au C^{14} administrée perturbe considérablement les métabolismes normaux. Si le C^{14} est remplacé par le tritium, la dose peut être réduite au 1/1000 ; ainsi les conditions expérimentales deviennent bien meilleures sinon tout à fait satisfaisantes.

Le tritium émet un rayonnement β très peu pénétrant. Dans un milieu de densité unitaire, la trajectoire de l'électron de désintégration a une longueur maximum de 8μ et une valeur moyenne de 1μ . La faible énergie cinétique de ces électrons ($E_{\max.} = 18000 \text{ eV}$; $E_{\text{moy.}} = 5690 \text{ eV}$) qui rendait difficile le dosage du tritium avant l'emploi des détecteurs à scintillation liquide, présente, à d'autres points de vue, des avantages incontestables ; c'est le cas notamment lorsqu'il s'agit de localiser par autoradiographie une substance marquée dans les cellules

d'un tissu ; le tritium permet une définition de 1μ inégale par les autres émetteurs de rayons β .

Nous avons préparé, en 1957, de la thymidine marquée avec du tritium dans sa portion pyrimidique (2) ; la thymidine est un précurseur très spécifique de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Firket (3) a mis des fibroblastes de poulet en culture en présence de cette thymidine tritiée ; après fixation, les cellules ont été couvertes d'une émulsion nucléaire. Après exposition et développement, les grains d'argent dans l'émulsion nucléaire se trouvent exclusivement au-dessus des noyaux des cellules au repos ou au-dessus des chromosomes dans les cellules en mitose. On sait que c'est dans le noyau et dans les chromosomes qu'est localisé l'ADN. La projection dans le plan de l'émulsion de la distance qui sépare le chromosome des grains d'argent excède rarement $0,5 \mu$.

L'extrême précision de ces autoradiographies montre très bien que seule la cellule qui contient du tritium est irradiée. On peut donc espérer arriver à une radiothérapie à l'échelle cellulaire : tuer des cellules au milieu d'autres cellules dont le métabolisme est différent. Cette possibilité intéresse les personnes qui s'occupent de cancérologie. La méthode a déjà permis d'isoler des mutants bactériens.

Le tritium, qui possède une masse de 3 unités, ne se comporte pas exactement comme l'hydrogène de masse 1 ; la différence observée au cours des réactions chimiques ou à l'équilibre thermodynamique constitue ce que l'on appelle l'effet isotopique. L'énergie d'activation nécessaire pour rompre la liaison C-H est de 1500 calories par mole plus élevée quand l'hydrogène possède une masse 3 au lieu de 1 ; lorsqu'on soumet à une action de déshydrogénation un mélange de C-H³ et de C-H¹, les liaisons C-H³ sont rompues statistiquement moins fréquemment que les liaisons C-H¹. Nous avons démontré, en 1952, l'importance considérable de cet effet isotopique *in vivo* en étudiant chez le rat l'oxydation du méthanol marqué simultanément avec du deutérium et du tritium (4).

Des rats ont reçu un mélange de L-méthionines marquées dans le groupe méthyle l'une avec du C¹⁴, l'autre avec du tritium. L'adrénaline a été isolée des surrénales et dégradée de manière à séparer son groupe méthyle ; le rapport des concentrations H³/C¹⁴ dans ce groupe méthyle était plus élevé que dans le groupe méthyle de la méthionine administrée (130 %) (1). Le but du travail était de savoir si le groupe méthyle de la méthionine était utilisé en entier pour la biosynthèse de l'adrénaline ou s'il était préalablement oxydé en formaldéhyde ou formiate qui aurait joué le rôle de précurseur du groupe méthyle de l'adrénaline. En l'absence de toute complication, la transméthylation doit s'accom-

pagner du maintien de la valeur du rapport H^3/C^{14} , tandis qu'une oxydation suivie de réduction doit la diminuer. Notre résultat indiquait une *augmentation* ; il s'explique le mieux par l'hypothèse d'une transméthylation compliquée par un effet isotopique. Nous croyons que cet effet isotopique se produit dans une réaction secondaire d'oxydation du groupe méthyle qui a pour résultat d'enrichir en tritium les groupes méthyle restés intacts. Des raisons nous ont conduit à penser que cette réaction d'oxydation avait pour substrat l'adrénaline elle-même.

L'oxydation du groupe méthyle de l'adrénaline conduirait vraisemblablement à la formation de N-hydroxyméthyl-noradrénaline qui devrait se décomposer en noradrénaline et formaldéhyde. Dans le but de vérifier notre hypothèse, nous avons préparé de l'adrénaline marquée avec du tritium en position β par réduction catalytique de la cétone correspondante à l'aide d'hydrogène tritié ; le produit de synthèse a été purifié par chromatographie. Quelques microgrammes de cette adrénaline tritiée ont été injectés lentement dans la veine fémorale d'un chat ; 30 secondes plus tard, le sang était recueilli par ponction cardiaque. Après addition au plasma d'adrénaline et de noradrénaline ordinaires comme entraîneurs, ces amines ont été adsorbées sur alumine, puis chromatographiées sur Amberlite XE-64. La noradrénaline était radioactive et possédait une activité totale égale à 15 % de celle de l'adrénaline isolée du plasma (5). Ceci démontre clairement que l'adrénaline est déméthylée en noradrénaline chez le chat ainsi qu'un effet isotopique nous l'avait fait supposer.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) VERLY, W. G. *Arch. intern. Physiol. Biochim.*, 1956, **64**, 346-397.
 - (2) VERLY, W. G. and HUNEBELLE, G. *Bull. soc. chim. Belg.*, 1957, **66**, 640.
 - (3) FIRKET, H. Recherches sur la synthèse des acides désoxyribonucléiques et la préparation à la mitose dans des cellules cultivées « in vitro ». Vaillant Carmann, 1957.
 - (4) VERLY, W. G., RACHELE, J. R., DU VIGNEAUD, V., EIDINOFF, M. L. et KNOLL, J. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 5941.
 - (5) VERLY, W. G., KOCH, G. et HUNEBELLE, G. *Arch. intern. Physiol. Biochim.*, 1960, **68**, 514.
-

RÉSUMÉ

Quand on administre à des rats de la L-méthionine marquée avec C^{14} et H^3 dans le groupe méthyle, le rapport des concentrations H^3/C^{14} est plus élevé dans le groupe méthyle de l'adrénaline isolée des surrénales que dans celui de la méthionine ingérée. Ce résultat est explicable par une réaction de transméthylation compliquée par une oxydation secondaire accompagnée d'un effet isotopique.

La vitesse d'oxydation *in vivo* du groupe méthyle est diminuée par l'introduction d'un isotope lourd de l'hydrogène dans ce groupement. Lorsqu'on a affaire à un mélange de méthyles à hydrogène léger et de méthyles à hydrogène lourd, la réaction d'oxydation a comme résultat l'enrichissement en hydrogène lourd des groupes qui n'ont pas encore réagi.

En nous servant d'adrénaline marquée avec H^3 en position β , nous avons pu démontrer l'existence d'une bioréaction de déméthylation que nous supposons oxydative.

Some examples of the use of Tritium in biology

SUMMARY

When L-methionin, C^{14} and H^3 labelled in the methyl group, is administered to rats, the H^3/C^{14} ratio found in the methyl group of adrenalin isolated from the suprarenal glands, is higher than in the methionin ingested. This observation can be explained by a transmethylation reaction accompanied by a secondary oxidation and an isotope effect.

The oxidation rate of the methyl group *in vivo* is reduced by the incorporation of a heavy hydrogen isotope. In a mixture of normal and heavy hydrogen methyl groups, the oxidation reaction results in an increase of the heavy hydrogen concentration in the groups which have not yet reacted.

Using adrenalin labelled with H^3 in position β , the occurrence of a demethylating bioreaction, supposed to be an oxidation, has been demonstrated.

Beispiele zur Tritium-Verwendung in der Biologie

ZUSAMMENFASSUNG

Wenn man Ratten L-Methionin verabfolgt, das in der Methylgruppe mit C^{14} und H^3 markiert ist, so ist das Konzentrationsverhältnis H^3/C^{14} in der Methylgruppe des aus der Nebenniere isolierten Adrenalins höher als dasjenige des ingierten Methionins. Dieses Resultat lässt sich einer Transmethylierungsreaktion erklären, die durch eine sekundäre, vom Isotopeneffekt begleitete Oxydation kompliziert wird.

Die Geschwindigkeit der Oxydation der Methylgruppen *in vivo* wird durch die Einführung eines Isotops schweren Wasserstoffes in diese Gruppierung verringert. Wenn man es mit einem Gemisch von Methylen und schwerem Wasserstoff und von Methylen und leichtem Wasserstoff zu tun hat, so besteht die Oxydationsreaktion in der Anreicherung von schwerem Wasserstoff in den Gruppen, die noch nicht reagiert haben.

Durch Verwendung von Adrenalin, das in Stellung β mit H^3 markiert war, haben wir zeigen können, dass eine Demethylierungsaktion, die wir für Oxydation halten, vorliegt.
