

PREPARATION DE THYMIDINE MARQUEE
AVEC DU TRITIUM

par

W. G. VERLY et G. HUNEBELLE (Liège)

Extrait du « Bulletin des Sociétés Chimiques Belges » N° 66, 1957

LOUVAIN
IMPRIMERIE CEUTERICK
1957

PREPARATION DE THYMINDE MARQUEE AVEC DU TRITIUM

par

W. G. VERLY et G. HUNEBELLE (Liège)

RÉSUMÉ

1) De la thymidine est marquée avec du tritium par échange avec les hydrogènes d'eau tritiée à 100°C pendant 24 heures en présence de catalyseur d'Adams réduit;

2) Les tritiums labiles sont éliminés à chaud dans une solution aqueuse de NaOH. La soude et la thymidine sont séparées, après transformation de la soude en sulfate de sodium, en dissolvant la thymidine dans le butanol bouillant;

3) La thymidine brute obtenue est purifiée par traitement par le charbon actif et cristallisations dans le butanol. Le rendement global est de 50 %;

4) L'activité spécifique de la thymidine tritiée ainsi préparée est de 14,9 millicuries par millimole; 0,85 atome d'hydrogène par molécule de thymidine ont été remplacés par des hydrogènes de l'eau tritiée et occupent des positions stables;

5) La totalité de la radioactivité se trouve dans la fraction pyrimidique.

La biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) intéresse beaucoup les biologistes; elle suit un mécanisme précis qui assure la continuité des espèces. Le rôle génétique de l'ADN semble dû à son action, directe ou indirecte, sur la synthèse des protéines et en particulier des enzymes.

La thymine, qui est un des constituants de l'ADN, ne se trouve pas dans l'ARN (acide ribonucléique). Cependant les noyaux cellulaires n'utilisent guère la thymine pour faire la synthèse de l'ADN mais plutôt le désoxyriboside de thymine que l'on appelle thymidine.

Nous avons préparé de la thymidine marquée avec du tritium et possédant une très grande radioactivité spécifique de manière à ce qu'elle puisse être utilisée pour des études cytologiques par la méthode de l'autoradiographie (1). La méthode de préparation de ce nucléoside marqué, par échange catalytique entre de l'eau

(1) FIRKET, H., résultats non publiés.

tritiée et de la thymidine ordinaire, est analogue à celle utilisée par Eidinoff et ses collaborateurs (2) pour obtenir des purines tritiées ou deutérées. Taylor et al. (3) ont aussi préparé de la thymidine tritiée; ils ne donnent aucun détail sur le procédé de synthèse, ni sur la pureté du produit obtenu.

DETAILS EXPERIMENTAUX

ECHANGE CATALYTIQUE

On met dans un tube 200 mg de catalyseur d'Adams fraîchement réduit (*), 205 mg de thymidine California Foundation for Biochemical Research (CFBR) et 1 ml d'eau tritiée fournie par Harwell et ayant une radioactivité de 2 curies. Le tube est scellé sous vide et agité pendant 24 heures à 100°C.

A cause de la très grande radioactivité, nous utilisons des appareils en verre pyrex complètement soudés, sans robinet ni joint rodé.

Le catalyseur d'Adams, sous eau après réduction, est transféré dans un tube A; l'eau est ensuite enlevée à la pipette aussi complètement que possible. Après l'introduction de la thymidine, le tube A est soudé à la partie gauche de l'appareil représenté dans la figure 1. Le tube B, qui contient l'eau tritiée, muni d'un capillaire scellé (« break seal ») sur lequel est déposé un petit cylindre de fer entouré de verre, est soudé au bras droit du même appareil.

Pour ne pas sécher le catalyseur, le tube A est plongé dans la carbolgace avant de faire le vide dans l'appareil. Après avoir vérifié l'étanchéité du tout avec un détecteur de fuite du type Tesla, on scelle en coupant au chalumeau au niveau de l'étranglement *a* prévu pour faciliter cette opération.

B est ouvert en brisant son capillaire au moyen du cylindre de fer manœuvré de l'extérieur par un aimant; il est alors placé dans un courant d'air chaud pour accélérer la distillation de l'eau radioactive dans le tube à réaction A. Lorsqu'il n'y a visiblement plus d'eau en B, on chauffe toute la partie droite de l'appareil avec une flamme molle, puis on scelle à l'étranglement *b*. La partie droite de l'appareil est mise avec les déchets radioactifs; la partie gauche (que l'on appellera A') est sortie de la carbolgace et placée dans l'étuve à 100°C où elle est agitée pendant 24 heures.

RÉCUPÉRATION DE L'EAU TRITIÉE ET FILTRATION DU CATALYSEUR

A cause de la grande radioactivité, cette opération est faite en deux temps : distillation de l'eau tritiée dans un système clos; reprise du résidu dans de l'eau ordinaire et filtration.

La distillation de l'eau tritiée se fait dans un appareil analogue à celui qui a servi à l'introduire dans le tube A'. Le tube A', après introduction d'une pièce de fer entourée de verre, est soudé au bras droit de l'appareil représenté

(*) EIDINOFF, M. L. et KNOLL, J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1992, (1953).

(3) TAYLOR, J. H., WOODS, P. S. et HUGHES, W. L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **43**, 122, (1957).

(*) PtO₂ est préparé à partir de chloroplatinate d'ammonium (*Organic Syntheses*, vol. I, p. 466). 200 mg de PtO₂ sont réduits sous eau à l'aide d'hydrogène dans l'appareil de Parr (2 atmosphères, 80°C, 30 minutes).

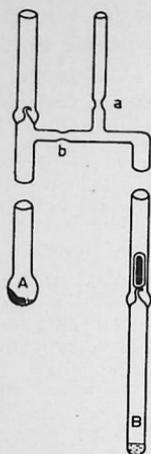


Fig. 1

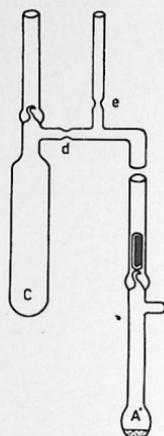


Fig. 2

dans la figure 2. On fait le vide; on vérifie l'étanchéité; on scelle en *e*; le capillaire fermé de *A'* est brisé et le récepteur *C* est plongé dans l'azote liquide. Quand toute l'eau a distillé ou sublimé en *C*, on chauffe la partie droite de l'appareil pendant 1 heure dans un courant d'air chaud avant de le sceller à l'étranglement *d*. Le tube *C* contient l'eau radioactive récupérée.

Le tube *A'* est alors ouvert en dessous de son moignon latéral et la partie supérieure mise avec les déchets radioactifs. Dans la partie inférieure, qui est le tube *A*, on met de l'eau très chaude pour dissoudre la thymidine. La solution et le catalyseur sont repris à la pipette et filtrés; le tube *A* et le filtre sont rincés abondamment à l'eau chaude. Le filtrat qui est incolore est évaporé à sec sous pression réduite.

ELIMINATION DES ATOMES DE TRITIUM QUI OCCUPENT DES POSITIONS LABILES

Le résidu obtenu par évaporation du filtrat est dissous dans 5 ml de NaOH 0.2 N. La solution est chauffée à 100°C pendant 5 minutes (elle jaunit), refroidie, neutralisée par H₂SO₄ N jusqu'au pH 6.5 (papier indicateur universel) et évaporée à sec sous pression réduite.

La séparation de la thymidine et du sulfate de sodium se fait avec du butanol bouillant qui dissout la thymidine. La solution butanolique qui est jaune, est passée à travers un filtre Schleicher und Schüll 589/3 en ayant soin de la maintenir très chaude pendant la filtration, et le filtrat évaporé à sec sous pression réduite.

PURIFICATION DE LA THYMININE

L'échange catalytique est accompagné d'une destruction partielle de la thymidine (voir la discussion) et le résidu obtenu par évaporation de la solution butanolique contient, outre la thymidine, de la thymine et des sucres plus ou moins altérés par NaOH; il est d'ailleurs jaune. On le cristallise deux

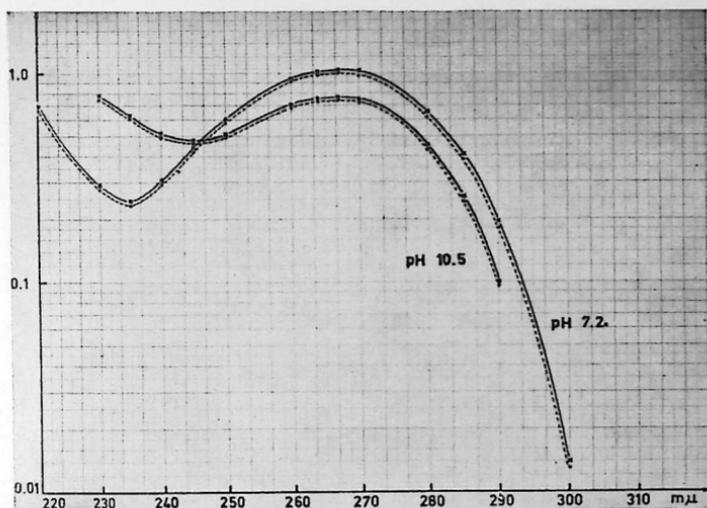


Fig. 3 — Spectres ultraviolets de la thymidine tritiée (trait plein) et de la thymidine CFBR (trait discontinu) aux pH 7.2 et 10.5 en coordonnées semi-logarithmiques. A chaque pH, les deux courbes sont superposables ce qui indique l'identité chimique des produits.

TABLEAU I

*Spectres ultraviolets de la thymidine tritiée et de la thymidine CFBR.
Rapports des absorptions à deux longueurs d'onde différentes*

λ m μ	pH 7.2			pH 10.5		
	litt. (*)	CFBR	tritiée	litt. (*)	CFBR	tritiée
250/260	0.65	0.64	0.64	0.75	0.73	0.72
280/260	0.72	0.68	0.70	0.67	0.64	0.64
290/260	0.235	0.20	0.21	0.16	0.14	0.14

(*) BEAVEN et al., dans Chargaff et Davidson, *The Nucleic Acids*, vol. I, p. 509 (Academic Press, 1955).

fois dans 2 ml de butanol : après l'avoir dissous dans le butanol bouillant, on le laisse cristalliser à la température du laboratoire pendant 24 heures. Les cristaux ainsi obtenus restent jaunes et n'ont pas un point de fusion correct. On les dissout dans 10 ml de méthanol et la solution bouillante est agitée pendant 2 minutes avec environ 100 mg de charbon actif. Après filtration, la solution est évaporée à sec sous pression réduite et le résidu est cristallisé dans le butanol.

On obtient ainsi 70 mg de cristaux blancs qui ont la forme d'aiguilles des cristaux de thymidine. Ils fondent à 185-186°C (corr.) comme la thymidine CFBR utilisée dans la réaction d'échange isotopique. Les spectres d'absorption ultraviolets des thymidines tritiée et CFBR ne sont pas distinguables (fig. 3, tableau I); l'absorption millimolaire du produit tritié à 267 m μ au pH 7.2 est de 9,81, tandis que celle de la thymidine CFBR est de 9,87.

30 mg de thymidine tritiée moins pure (P.F. : 183-187°C (corr.)) sont isolés des eaux-mères par cristallisation dans le méthanol après traitement par le charbon actif. Le rendement global est donc voisin de 50 %.

RADIOACTIVITÉ DE LA THYMINDE TRITIÉE

La thymidine tritiée est diluée 11.400 fois par de la thymidine CFBR. Le produit dilué est brûlé et l'eau de combustion réduite en hydrogène; la radioactivité spécifique de cet hydrogène est mesurée dans une chambre à ionisation suivant la méthode de Verly et al. (4). Corrigée pour la dilution, la radioactivité est de 14.9 ± 0.1 millicuries par millimole de thymidine.

Afin de déterminer la part de la radioactivité présente dans la fraction pyrimidique, on hydrolyse le produit dilué et on mesure la radioactivité de la thymine isolée du milieu. Corrigée pour la dilution de la thymidine, la radioactivité est de 14.9 ± 0.3 millicuries par millimole de thymine.

100 mg de thymidine tritiée diluée sont dissous dans 4 ml de HCl 6N; la solution est chauffée en tube scellé pendant 3 heures à 120°C. Après évaporation sous pression réduite, le résidu est dissous quatre fois dans l'eau et la solution évaporée pour éliminer complètement le HCl. Il est ensuite repris dans 10 ml de méthanol et traité à l'ébullition pendant 2 minutes par environ 100 mg de charbon actif. Après filtration, le volume de la solution est réduit sous vide. On obtient ainsi des cristaux de thymine pure comme le montrent leur forme de parallélogrammes et de trapèzes plats, la transformation en aiguilles quand on les chauffe, l'absence de fusion, mais un début de sublimation avant 300°C. Le spectre ultraviolet est le même que celui de la thymine Fluka puriss. (fig. 4, tableau II). L'absorption millimolaire est de 5.25 au pH 10,5 à 291 m μ tandis que celle de la thymine Fluka mesurée dans les mêmes conditions est de 5.23.

DISCUSSION

Pendant le traitement par le catalyseur d'Adams, des hydrogènes de la thymidine sont remplacés par des hydrogènes de l'eau tritiée : la thymidine est ainsi marquée. Parmi les atomes de tritium qui entrent dans les molécules du nucléoside, certains occupent

(4) VERLY, W. G., BRICTEUX-GRÉGOIRE, S., KOCH, G. et ESPREUX, G., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 64, 491, (1955).

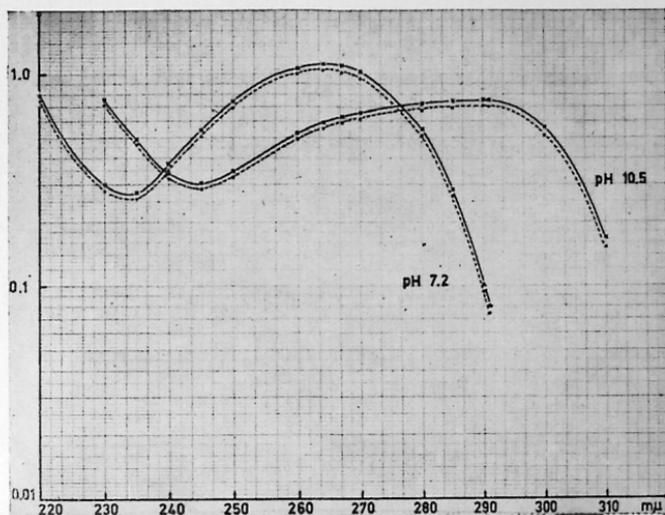


Fig. 4 — Spectres ultraviolets de la thymine provenant de l'hydrolyse de la thymidine tritiée diluée (trait plein) et de la thymine Fluka (trait discontinu) aux pH 7.2 et 10.5 en coordonnées semi-logarithmiques. A chaque pH, les deux courbes sont superposables ce qui indique l'identité chimique des produits.

TABLEAU II

Spectres ultraviolets de la thymine provenant de l'hydrolyse de la thymidine tritiée diluée et de la thymine Fluka. Rapports des absorptions à deux longueurs d'onde différentes

λ m μ	pH 7.2			pH 10.5		
	litt. (*)	Fluka	tritiée	litt. (*)	Fluka	tritiée
250/260	0.67	0.69	0.69	0.65	0.66	0.66
280/260	0.53	0.51	0.51	1.31	1.36	1.37
290/260	0.09	0.09	0.09	1.41	1.42	1.43

(*) BEAVEN et al., dans Chargaff et Davidson, *The Nucleic Acids*, vol. I, p. 503 (Academic Press, 1955).

des positions stables en l'absence de catalyseur, tandis que d'autres (comme ceux du groupe imidé de la fraction thymine et des groupes hydroxyle du désoxyribose) sont labiles, c.-à-d. plus ou moins facilement échangeables avec les hydrogènes du milieu. Pour utiliser le produit marqué dans des expériences de biologie, il faut le débarrasser de ses tritiums labiles. La labilité dépend de la tendance à l'ionisation du groupement qui contient le tritium; il est devenu classique, pour éliminer les tritiums labiles, de favoriser l'émission des ions hydrogène en chauffant le produit tritié dans un milieu aqueux basique. Après ce traitement, les tritiums qui restent dans la thymidine sont très solidement attachés au reste de la molécule comme on aura l'occasion de le montrer dans la suite.

Destruction de la thymidine au cours de la préparation

Le traitement par NaOH n'est pas accompagné d'une destruction importante de la thymidine. La thymidine pure chauffée dans NaOH 0.2 N ne jaunit pas; après neutralisation avec H_2SO_4 , extraction au butanol, filtration et évaporation du filtrat, on obtient un résidu qui est de la thymidine pure.

La thymidine est partiellement détruite pendant le chauffage dans l'eau en présence du catalyseur. Cette destruction est une hydrolyse avec production de thymine.

103 mg de thymidine CFBR, 100 mg de catalyseur d'Adams fraîchement réduit et 2 ml d'eau sont chauffés sous vide à 170°C en agitant pendant 46 heures. Après ce traitement, le tube contient une substance peu soluble dans l'eau froide. Après filtration à chaud pour enlever le catalyseur, le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite et le résidu dissous dans le méthanol bouillant. La solution méthanolique jaune est traitée par le charbon actif et filtrée chaude. Le volume du filtrat est réduit et des cristaux apparaissent lorsque la solution se refroidit; ils sont recristallisés dans le méthanol. On obtient ainsi 31 mg de thymine pure comme le montrent la forme des cristaux, l'absence de fusion avant 300°C et le spectre ultraviolet (tableau III). Ceci signifie que le traitement à 170°C dans l'eau pendant 46 heures, en présence de catalyseur d'Adams, hydrolyse au moins 60 % de la thymidine mise en œuvre.

Lorsque la thymine est trop abondante dans le milieu réactionnel, la purification de la thymidine devient difficile parce que la thymine est très peu soluble à froid dans les alcools (méthanol,

TABLEAU III

*Spectres ultraviolets de la thymine isolée du milieu d'échange catalytique à haute température et de la thymine Fluka.
Rapports des absorptions à deux longueurs d'onde différentes*

λ m μ	pH 7.2			pH 10.5		
	litt. (*)	Fluka	isolée	litt. (*)	Fluka	isolée
250/260	0.67	0.68	0.69	0.65	0.66	0.66
280/260	0.53	0.51	0.51	1.31	1.34	1.35
290/260	0.09	0.096	0.095	1.41	1.38	1.38

éthanol, propanol, butanol) que nous utilisons pour la cristallisation de la thymidine. Il faudrait envisager des séparations chromatographiques, mais celles-ci ne paraissent pas aisées.

Dans les conditions décrites (100°C, 24 heures), la destruction de la thymidine n'est pas trop importante, ce qui permet de la repurifier assez facilement par des cristallisations consécutives à un traitement par le charbon actif. Il conviendrait cependant d'étudier systématiquement l'effet de la température et de la durée de chauffage sur la destruction de la thymidine et sur l'échange des hydrogènes de manière à obtenir une activité spécifique maximum pour une destruction de thymidine qui reste compatible avec sa purification ultérieure.

Le catalyseur d'Adams utilisé pour l'échange doit être complètement réduit sinon il agit comme oxydant et aggrave la destruction de la thymidine : à la fin de l'échange catalytique, la solution est jaune et il est très difficile de réisoler la thymidine.

Notons encore qu'il est préférable, après le traitement par NaOH, de décolorer le résidu obtenu par évaporation du filtrat butanolique par le charbon actif avant de cristalliser. Les cristallisations, avant le traitement par le charbon actif, sont peu utiles

(*) BEAVEN et al., dans Chargaff et Davidson, *The Nucleic Acids*, vol. I, p. 503 (Academic Press, 1955).

et ne permettent pas de se débarrasser du pigment qui s'adsorbe sur les cristaux.

La radioactivité

La thymidine tritiée que nous avons préparée a une activité de 14.9 millicuries par millimôle. C'est l'ordre de grandeur pratique pour les travaux de cytologie qui utilisent la radioautographie. Un noyau de cellule d'oiseau (p. ex. de fibroblaste de poulet) fixe, avant de se diviser, environ 2.4×10^{-12} millimôle de thymidine qu'il répartit ensuite entre les deux noyaux fils. Si nous supposons des conditions expérimentales telles que la totalité de la thymidine fixée pour la synthèse de l'ADN est la thymidine tritiée introduite dans le milieu où vivent les cellules, chaque noyau fils reçoit une radioactivité de 56 désintégrations par jour. Ces valeurs seraient environ doublées pour des cellules de mammifère.

La radioactivité de l'eau tritiée qui a servi à l'échange est de 18 millicuries par milliatome-gramme d'hydrogène. Donc, en moyenne, 0.85 atome d'hydrogène par molécule de thymidine ont été remplacés par des hydrogènes de l'eau tritiée pendant le traitement par le catalyseur et occupent des positions stables.

Il est nécessaire de savoir quelle fraction de la radioactivité de la thymidine se trouve dans sa portion pyrimidique pour pouvoir interpréter les résultats des autoradiographies. Il n'est pas exclu, en effet, qu'il existe des réactions de transfert de désoxyribose qui introduiraient la radioactivité du désoxyribose de la thymidine dans d'autres désoxyribosides de l'ADN. Il conviendrait aussi d'être certain que le seul rôle du désoxyribose introduit sous la forme de thymidine soit de participer à la synthèse de l'ADN et qu'en particulier il ne puisse pas être oxydé en ribose et pénétrer dans l'ARN.

La thymine isolée après hydrolyse de la thymidine a la même activité par millimôle que la thymidine elle-même. Cela signifie que la totalité de la radioactivité du désoxyriboside se trouve dans sa portion pyrimidique; le désoxyribose ne contient pas d'hydrogène échangeable catalytiquement qui occupe une position stable dans NaOH 0.2 N. Il est très heureux que la totalité de la radioactivité de la thymidine tritiée préparée par échange catalytique suivant la méthode que nous avons décrite, soit dans la fraction thymine; cela réduit grandement le nombre d'hypothèses nécessaires pour

interpréter les résultats des autoradiographies. Il n'est donc pas utile d'envisager une synthèse de thymidine à partir de thymine tritiée pour localiser la radioactivité dans la portion pyrimidique; la synthèse de la thymidine n'a jamais été réalisée par voie chimique, mais Friedkin et Roberts (6) ont réussi une synthèse enzymatique en mettant de la thymine et du désoxyribose-1-phosphate en présence d'un extrait de foie ou de rein de mammifère.

Il faut des moyens énergiques pour hydrolyser la thymidine et l'on pouvait craindre que le traitement à 120°C dans HCl 6 N ne labilise une partie des tritiums fixés dans la fraction thymine. Le fait de retrouver la totalité de la radioactivité de la thymidine dans la thymine isolée après hydrolyse, exclut cette possibilité. Une autre expérience confirme cette conclusion : la thymine provenant de l'hydrolyse de thymidine ordinaire par HCl 6 N tritié pendant 3 heures à 120°C, après plusieurs dissolutions dans l'eau suivies d'évaporations (pour éliminer les tritiums très labiles fixés par les groupements NH) est pratiquement dépourvue de radioactivité. Ceci illustre la très grande stabilité des tritiums introduits dans la thymidine par échange catalytique et qui résistent au traitement par NaOH; seules des réactions métaboliques seront capables de libérer du tritium de la thymidine tritiée introduite dans les cellules.

Laboratoire des Isotopes,
Service de Pathologie Générale,
UNIVERSITÉ DE LIÈGE.

(6) FRIEDKIN, M. et ROBERTS, D., *J. Biol. Chem.*, **207**, 257, (1954).