



## REVIEW SERIES

Developments  
in the  
peaceful  
applications  
of  
nuclear  
energy

No. 2

**Tritium: Dosage,  
Préparation  
de Molécules  
Marquées et  
Applications  
Biologiques**

International  
Atomic  
Energy  
Agency  
Vienna 1960



**REVIEW SERIES**

Developments  
in the  
peaceful  
applications  
of  
nuclear  
energy

**No. 2**

**Tritium: dosage,  
préparation  
de molécules  
marquées et  
applications biologiques**

Walter G. Verly

International  
Atomic  
Energy  
Agency  
Vienna 1960

FOREWORD  
AVANT-PROPOS  
ПРЕДИСЛОВИЕ  
PREFACIO

In terms of its Statute, the International Atomic Energy Agency is required to develop, assemble and make available in an accessible form technical information relating to the nature and peaceful uses of atomic energy. One of the ways in which the Secretariat of the Agency is giving effect to this statutory provision is by issuing publications of various kinds, including where appropriate periodical and serial publications.

The "Review Series" comprises review articles, published at intervals and giving a general account of recent developments in some major field of the peaceful application of nuclear energy and other scientific and technical information material. Specialists from Member States of the Agency have been invited to prepare the reviews. It is hoped that the series will help specialists in Member States to keep in touch with recent developments in the field of nuclear energy and will assist less advanced countries in developing their scientific and educational activities in this field.

The individual reviews of this series are published in one of the Agency's working languages, English, French, Russian or Spanish, but each issue includes either a summary or an introduction in all four working languages of the Agency.

\* \* \*

En application de son Statut, l'Agence internationale de l'énergie atomique développe, rassemble et met à la disposition de ses Membres, sous une forme accessible, des renseignements techniques sur la nature et l'utilisation de l'énergie atomique à des fins pacifiques.

L'un des moyens par lesquels le Secrétariat donne effet à cette disposition statutaire consiste à publier des ouvrages spéciaux, des collections et des périodiques.

La collection «Monographies» comprend des articles analytiques faisant le point de la situation dans d'importants domaines de l'utilisation de l'énergie nucléaire à des fins pacifiques, ainsi que de brèves notes et autres documents d'information de caractère scientifique et technique. L'Agence a demandé à des spécialistes ressortissants d'Etats Membres de rédiger ces articles. On espère que cette collection aidera les spécialistes des Etats Membres à se tenir au courant des faits nouveaux dans le domaine nucléaire et qu'elle permettra aux pays moins avancés d'étendre leur activité scientifique et pédagogique dans ce domaine.

Chaque numéro de la collection n'est publié que dans une seule des langues de travail de l'Agence: anglais, espagnol, français ou russe, mais il doit contenir un résumé ou un avant-propos dans les quatre langues de travail.

Согласно своему Уставу Международное агентство по атомной энергии обязано развивать, собирать и предоставлять в доступной форме технические сведения касающиеся природы атомной энергии и ее применения в мирных целях.

Одним из путей выполнения этой задачи Секретариатом Агентства является издание соответствующих разовых, периодических и серийных публикаций.

Серия „Обзоров“ издается аperiодически и состоит из обзорных статей, дающих общий анализ состояния и развития важнейших проблем мирного применения ядерной энергии, а также из коротких заметок и другого научного и технического материала информационного характера. В подготовке обзоров принимают участие ученые различных государств-членов Агентства. Можно надеяться, что данная серия изданий поможет постоянно знакомить специалистов государств-членов с последними достижениями в области ядерной энергии и поможет менее развитым странам в деле развития их науки и образования в этой области.

Отдельные обзоры этой серии издаются на одном из четырех рабочих языков Агентства (английском, французском, русском или испанском). В каждом выпуске публикуется резюме или введение на всех четырех рабочих языках Агентства.

\* \* \*

En virtud de su Estatuto, el Organismo Internacional de Energía Atómica debe desarrollar, reunir y facilitar en forma accesible la información técnica relacionada con la naturaleza de la energía atómica y su utilización con fines pacíficos.

Una de las maneras como la Secretaría del Organismo cumple esta disposición estatutaria consiste en editar colecciones de diversos géneros, incluidas publicaciones periódicas y obras especiales.

Los trabajos de esta colección de monografías comprenden artículos en los que se hace un análisis general del estado actual de importantes problemas que plantea la utilización de la energía atómica con fines pacíficos, así como otros documentos informativos de carácter científico y técnico. Se ha invitado a especialistas de los Estados Miembros a que redacten esas monografías. Es de esperar que esta colección ayudará a mantener informados a los especialistas de los Estados Miembros sobre los progresos más recientes en el campo de la energía nuclear y será útil en los países menos avanzados para desarrollar las actividades científicas y educativas en esa materia.

Las monografías de esta Colección se publican en uno de los idiomas de trabajo del Organismo, a saber, español, francés, inglés y ruso; pero cada número contiene un resumen o una introducción en estos cuatro idiomas.

*Starting Cole*

March 1960

Readers are invited to send their suggestions and other correspondence regarding the Series to the Director, Division of Scientific and Technical Information, International Atomic Energy Agency, Vienna I, Kärntner-Ring 11—13, Austria.

The opinions expressed in this review are not necessarily those of the Agency and the authors are solely responsible for them.

\* \* \*

Les lecteurs sont priés d'adresser leurs suggestions et commentaires et, en général, toute la correspondance concernant cette collection au Directeur de la Division de la documentation scientifique et technique, Agence internationale de l'énergie atomique, Vienne I, Kärntner-Ring 11—13, Autriche.

Les opinions exprimées dans cette monographie ne sont pas nécessairement approuvées par l'Agence et n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs.

\* \* \*

Предложения и другие замечания относительно данной серии просьба направлять на имя директора Отдела научной и технической информации Международного агентства по атомной энергии по адресу: Вена I, Кернтнерринг 11—13, Австрия.

Мнения, выраженные в настоящем обзоре, не всегда отражают позицию Агентства, и авторы обзорных статей несут единоличную ответственность за них.

\* \* \*

Se ruega a los lectores que para toda consulta o sugerencia sobre estas publicaciones se dirijan por escrito al Director de la División de Información Científica y Técnica, Organismo Internacional de Energía Atómica, Kärntner-Ring 11—13, Viena I (Austria).

Las opiniones expresadas en esta monografía no son necesariamente aprobadas por el Organismo, y solamente los autores tienen la responsabilidad para ellas.

## TABLE DES MATIÈRES

	page
Abstract .....	9
1. DOSAGE DU TRITIUM .....	10
A. Milieu hétérogène: Mesure avec compteur Geiger ou proportionnel, sans fenêtre, à courant gazeux .....	10
B. Milieu homogène .....	12
a. Mesure sous la forme de gaz .....	12
b. Mesure sous la forme de solution liquide .....	16
c. Mesure sous la forme de solution solide .....	19
C. Divers .....	19
2. PRÉPARATION DE PRODUITS TRITIÉS .....	20
A. Synthèses biologiques .....	20
B. Les préparations chimiques .....	20
a. Synthèses .....	21
b. Les échanges .....	23
i) Échanges catalytiques .....	23
ii) Irradiation avec des tritons de recul .....	24
iii) Bombardement avec des ions tritium ( $T_2^+$ ) .....	24
iv) Échange avec de l'hydrogène tritié .....	24
v) Autres échanges .....	25
3. BIOLOGIE .....	26
A. Recherches biochimiques et physiologiques .....	26
a. Étude du comportement des atomes d'hydrogène au cours des transformations métaboliques .....	26
b. Tritium, traceur accessoire du carbone .....	27
B. La sélection isotopique .....	29
C. Autoradiographie .....	33
D. Utilisation du tritium en clinique .....	36
4. LES DANGERS DU TRITIUM .....	38
Bibliographie .....	40
Summary .....	45
Résumé .....	47
Резюме .....	50
Resumen .....	53

# TRITIUM: DOSAGE, PRÉPARATION DE MOLECULES MARQUÉES ET APPLICATIONS BIOLOGIQUES

WALTER G. VERLY

Laboratoire des isotopes, Institut Léon Fredericq (Biochimie) de l'Université de Liège et Centre nucléaire belge.

## Abstract

Of the different methods used for assaying tritium, liquid scintillation and gas countings are the most useful. The different ways of preparing tritiated compounds, biological and chemical, syntheses and exchanges, are described. In a few biological experiments, tritium has been used to trace the fate of hydrogen atoms; more often, it was a label for a whole molecule or part of it. In the latter case, its superiority  $C^{14}$  rests on the ease of tritiated compounds preparation by exchange, on the higher specific activities attainable and on the low cost of the isotope. Isotope selection may occur and disturb the experimental results; but it can also be used to detect new biochemical pathways. At the cellular level, tritium yields the most precise autoradiograms because of the low energy of its  $\beta$  radiation; using specific labelled precursors is a means of studying the biochemistry of a single cell. The possible utilization of tritium in radiotherapy and the hazards involved by absorption of the isotope are discussed.

L'hydrogène possède un isotope radioactif ayant une masse de 3 unités et que l'on appelle tritium. Sa demi-vie est de 12,5 ans environ; il se désintègre en  $He^3$  en émettant un électron négatif. L'énergie cinétique maximum de l'électron éjecté du noyau est de 18.000 eV, mais sa valeur moyenne n'est que de 5.690 eV.

Plusieurs raisons expliquent l'intérêt du biologiste pour le tritium:

— étant un isotope de l'hydrogène, il peut servir à marquer la plupart des molécules organiques;

— à sa demi-vie de 12,5 ans correspond une activité spécifique de 30 curies par milliatome-gramme. On mesure sans difficulté des concentrations de tritium dans l'hydrogène de  $10^{-14}$  et, comme on peut se procurer du tritium presque pur, on voit que l'on dispose d'un traceur extrêmement sensible. Il est, par exemple, environ 1.000 fois plus sensible que le  $C^{14}$  qui est handicapé par sa demi-vie de près de 6.000 ans.

D'autre part, la demi-vie de 12,5 ans permet de réaliser toutes les expériences sans hâte nuisible et on peut constituer des réserves de produits tritiés;

— la faible énergie du rayonnement  $\beta$  de l'hydrogène radioactif permet de localiser les produits tritiés avec une très grande précision dans les cellules des tissus; elle permet aussi d'entrevoir une radiothérapie qui agirait sur une seule cellule sans léser les cellules voisines;

— le faible prix du tritium, 3 dollars le curie, permet de mettre en œuvre les grosses activités nécessaires pour atteindre les activités spécifiques élevées indispensables à certains travaux.

Avant de parler des utilisations des produits tritiés en biologie, nous dirons quelques mots des méthodes utilisées pour le dosage du tritium et pour la préparation des produits tritiés.

## 1 — DOSAGE DU TRITIUM

La difficulté du dosage du tritium, qui a longtemps retardé son emploi par les biologistes, est due à la faible énergie de son rayonnement  $\beta$  qui ne pénètre pas à plus de 8  $\mu$  dans un milieu de densité unitaire. Aucune fenêtre utilisable n'est suffisamment mince pour laisser passer ce rayonnement, aussi faut-il placer la substance tritiée à l'intérieur du volume sensible du détecteur utilisé pour mesurer sa radioactivité. D'autre part, si le produit tritié se trouve sous la forme d'une phase solide séparée, le rendement de la mesure est faible parce qu'une grande partie du rayonnement est absorbée dans le produit marqué. Pour avoir un bon rendement, il faut disperser le produit tritié de manière à supprimer l'auto-absorption: on le dissout dans la matière qui occupe le volume sensible du détecteur; cette solution peut être gazeuse, liquide ou solide.

### A. Milieu hétérogène: Mesure avec compteur Geiger ou proportionnel, sans fenêtre, à courant gazeux

Ce système est utilisé par de nombreux auteurs (EIDENOFF et KNOLL <sup>(1)</sup>; BANKS, CRAWHALL et SMYTH <sup>(2)</sup>; VERLY, BRICTEUX-GRÉGOIRE, KOCH et DEMEY <sup>(3)</sup>). Il consiste à placer l'échantillon tritié solide directement sous l'anode d'un tube compteur qui est traversé par un courant gazeux par ex. Tracerlab windowless flow counter SC—16.

Cette méthode souffre de la perte de rendement due à l'auto-absorption. L'épaisseur infinie pour le tritium est de 0,8 mg/cm<sup>2</sup> et, pour cette épaisseur, le rendement de comptage est de 2% seulement <sup>(1)</sup> (le rendement est le rapport du nombre de coups enregistrés au nombre total de

désintégrations qui se sont produites dans l'échantillon pendant le même temps).

BANKS et coll. <sup>(2)</sup>, VERLY et coll. <sup>(3)</sup> ont, par ailleurs, noté que, dès que le dépôt du produit tritié avait une certaine épaisseur, les résultats des mesures devenaient fort irréguliers. BANKS et coll. <sup>(2)</sup> ont pu stabiliser leurs résultats en mélangeant le produit tritié avec du graphite de manière à le rendre conducteur de l'électricité.

VERLY, BRICTEUX-GRÉGOIRE, KOCH et DEMEY <sup>(3)</sup> ont noté que, lors de la mesure de l'activité d'un échantillon tritié épais, la radioactivité «apparente» (c.-à-d. le nombre de coups enregistrés par unité de temps) diminuait avec le temps pour se stabiliser après 30 à 60 minutes. Ils ont attribué cette décroissance à un dépôt de charges positives à la surface de l'échantillon; ces charges créent une barrière de potentiel que les électrons de faible énergie ne peuvent pas franchir. L'importance de cette barrière de potentiel dépend de la radioactivité de l'échantillon et de sa résistance électrique. Le tableau I montre l'influence de la radioactivité spécifique pour des échantillons de même surface et de même épaisseur dépassant l'épaisseur infinie; le rapport des activités spécifiques des échantillons I et III, connu par l'opération de dilution, est de 99,88, la valeur calculée à partir des mesures prises à la 30ème minute n'est que de 36,4. Le tableau I permet aussi de constater la décroissance de la radioactivité entre la première et la 30ème minute. On voit que cette méthode de mesure est inutilisable.

TABLEAU I

	I c/min	II c/min	III c/min	I/II	I/III
1ère min	8.056 ± 90	943 ± 31	173 ± 13	8,5 ± 0,3	46,6 ± 4,0
30ème min	4.508 ± 67	610 ± 25	124 ± 8	7,4 ± 0,4	36,4 ± 2,8
rapports connus par les dilutions				10,68	99,88

Ce défaut, si évident pour le tritium, existe aussi pour le C<sup>14</sup> quand on le mesure dans un tube compteur sans fenêtre, mais il est plus difficilement reconnaissable parce que l'énergie du rayonnement  $\beta$  du C<sup>14</sup> est, en moyenne, à peu près 10 fois plus grande.

Lorsque le dépôt tritié n'a que quelques  $\mu\text{g}$  par  $\text{cm}^2$  et qu'il se trouve sur un support conducteur, la décroissance dans le temps de la radioactivité apparente ne se manifeste plus (la résistance électrique est très petite). Toutefois les résultats des mesures montrent une erreur qui dépasse largement l'erreur statistique du comptage. L'évaporation de la

solution qui sert à la préparation de ces petits échantillons, laisse de petits cristaux dont les dimensions ne sont pas négligeables pour le rayonnement  $\beta$  du tritium; le pourcentage du rayonnement émis qui est absorbé dans ces cristaux, varie d'un dépôt à l'autre malgré un poids constant. D'autre part, ces microcristallisations seront différentes suivant le composé tritié; si on peut encore comparer, en se basant sur la moyenne des mesures faites sur de nombreuses préparations, la radioactivité de deux échantillons différents de la même substance chimique, les radioactivités de substances tritiées différentes ne pourront pas être comparées par cette méthode. DEMEY et VERLY <sup>(4)</sup> ont observé une différence significative de 10% entre l'activité spécifique, par millimôle, de N- $\alpha$ -naphtylacétamide et de monoacétate de cortisol préparés à partir du même anhydride acétique tritié, activité mesurée sur des dépôts de 195  $\mu$ g placés sur des supports conducteurs.

WINAND <sup>(5)</sup> semblerait avoir évité les inconvénients des microcristallisations en sublimant sous vide le solvant de la solution congelée sur le support conducteur.

KISIELESKI et SMETANA <sup>(6)</sup> ont décrit un compteur sans fenêtre destiné à enregistrer automatiquement la radioactivité de chromatogrammes sur papier de produits tritiés.

## B. Milieu homogène

### a. MESURE SOUS LA FORME DE GAZ

On trouve dans la littérature la description de nombreuses méthodes pour préparer un gaz tritié à partir de substances organiques marquées au tritium, et GLASCOCK <sup>(7)</sup> a publié une excellente monographie sur cette question.

L'appareil utilisé par EIDINOFF <sup>(8)</sup> et par VERLY <sup>(9)</sup> pour préparer de l'hydrogène tritié dérive de celui de GRAFF et RITTENBERG <sup>(10)</sup>. Le composé organique est brûlé dans un courant d'oxygène purifié et l'eau de combustion est réduite en hydrogène sous vide sur du zinc <sup>(10)</sup> ou du magnésium (GRENON et VIALARD <sup>(11)</sup>). Le zinc est chauffé entre 400 et 420° C, la réduction complète nécessite plusieurs passages de la vapeur d'eau à travers le four à zinc. Le magnésium chauffé à 550° C présente l'avantage de réduire l'eau en une seule fois, ce qui permet de simplifier l'appareil (KOCH <sup>(12)</sup>); le tube à réduction doit être remplacé de temps en temps, car

le magnésium, sous vide, sublime progressivement vers les parties plus froides.

Cet appareil à combustion et réduction, qu'il utilise du zinc ou du magnésium, présente un déplorable effet de mémoire localisé principalement dans le tube à réduction et qui va en s'aggravant au fur et à mesure que le tube vieillit. Il faut équilibrer l'appareil avec l'hydrogène tritié provenant du produit dont on veut mesurer la radioactivité; cet équilibre n'est parfois atteint qu'après 4 à 5 opérations (figure 1). Pour

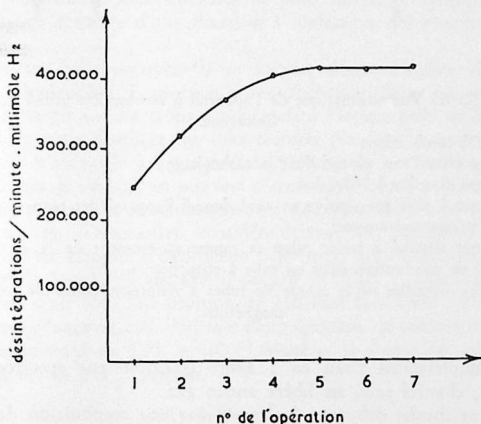


Figure 1: Après combustion et réduction d'un produit non radioactif, l'appareil est utilisé pour préparer de l'hydrogène à partir de thymidine tritiée. La figure montre que l'activité spécifique de l'hydrogène tritié augmente d'une opération à la suivante avant de se stabiliser à partir de la cinquième; ces opérations doivent être faites sans interruption.

supprimer cet inconvénient, CICCARONE, THOMAS et VERLY<sup>(13)</sup> utilisent un nouveau tube pour chaque réduction. Une rampe formée par plusieurs tubes contenant le métal réducteur est greffée sur l'appareil à combustion (figure 2); l'eau de combustion est distillée sous vide dans l'un des tubes qui est scellé au chalumeau. Quand le métal utilisé est le zinc, le tube est chauffé à 640° C, température recommandée par WILZBACH<sup>(14)</sup>; mais le zinc granulé chauffé à cette température libère du gaz, ce qui empêche une mesure correcte de l'activité spécifique de l'hydrogène tritié obtenu par réduction. Par contre, le magnésium en tournures chauffé à 550° C

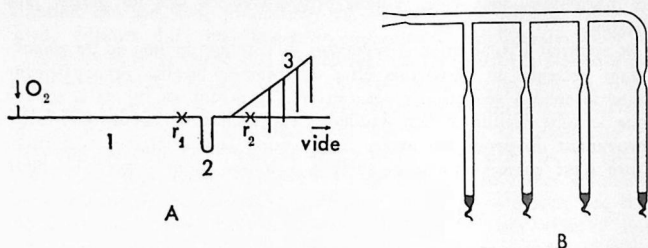


Figure 2: A) Vue schématique de l'appareil à combustion utilisé par Verly et Ciccarone.

- 1 = tube à combustion;
  - 2 = piège pour l'eau, plongé dans la carboglace;
  - 3 = rampe de tubes à réduction;
  - $r_1$  = robinet à voie progressive en aval duquel l'appareil est tenu sous vide par une pompe mécanique;
  - $r_2$  = robinet destiné à isoler piège et rampe au moment de la distillation de l'eau de combustion dans un tube à réduction.
- B) Vue plus détaillée de la rampe de tubes à réduction garnis de tournures de magnésium.

réduit complètement l'eau en 1 heure (contrôlé par spectrométrie de masse) et, chauffé seul, ne libère aucun gaz.

D'autres méthodes débutent également par une combustion dans l'oxygène, mais l'eau de combustion subit un traitement différent. WHITE, CAMPBELL et PAYNE<sup>(15)</sup> la font réagir avec du carbure d'aluminium et ROBINSON<sup>(16)</sup> avec de l'iodure de méthyl-magnésium pour obtenir du méthane; GLASCOCK<sup>(17, 18, 7)</sup> la traite par le bromure de n-butyl-magnésium pour obtenir du n-butane et BIGGS, KRITCHEVSKY et KIRK<sup>(19)</sup> la réduisent en hydrogène à l'aide de  $LiAlH_4$ . Les gaz tritiés ainsi obtenus ne contiennent que la moitié des hydrogènes de l'eau de combustion; les auteurs mentionnés n'ont cependant observé aucun effet isotopique appréciable.

La méthode de WILZBACH, KAPLAN et BROWN<sup>(14)</sup> permet de réaliser en une étape la combustion et la réduction; un tube est utilisé pour chaque échantillon de sorte que les contaminations (effet de mémoire) ne sont pas à craindre. Le composé organique est placé dans un mélange d'oxyde de nickel et de zinc granulé avec un peu d'eau; le tube en pyrex spécial est scellé sous vide et chauffé 1 heure à  $640^{\circ}C$ . Le produit de l'opéra-

tion est un mélange d'hydrogène et de méthane tritiés qui est transféré quantitativement dans une chambre à ionisation.

La mesure de l'activité de ces gaz tritiés se fait, soit dans une chambre à ionisation, soit dans un tube compteur.

#### a) *Chambre à ionisation:*

WILZBACH, VAN DYKEN et KAPLAN<sup>(20)</sup> de même que VERLY, BRICTEUX-GRÉGOIRE, KOCH et ESPREUX<sup>(21)</sup> ont utilisé un électromètre à lame vibrante *Applied Physics Corporation* pour suivre la vitesse de charge de l'électrode centrale d'une chambre à ionisation qui contenait le gaz tritié.

VERLY et ses collaborateurs<sup>(21)</sup> se servent d'une chambre de 100 ml remplie d'hydrogène à pression atmosphérique; dans ces conditions, 90% de l'énergie des électrons produits dans l'espace utile de la chambre sont utilisés pour produire des ions récoltés par les électrodes. Il n'y a donc guère d'avantage à augmenter le volume de la chambre ou à employer un gaz possédant un pouvoir d'arrêt supérieur à celui de l'hydrogène pour augmenter le rendement; les deux procédés ont, par contre, le désavantage d'augmenter considérablement le *background*: lorsque la chambre est remplie d'hydrogène à pression atmosphérique, le *background* est de  $3 \times 10^{-17}$  ampère; il passe à  $15 \times 10^{-17}$  quand la chambre est remplie d'air sous une pression de 760 mm Hg. Dans les conditions décrites par VERLY et coll.<sup>(21)</sup>, une désintégration de tritium par seconde donne un courant de  $1,71 \times 10^{-17}$  ampère; la limite de sensibilité de l'appareil est de  $10^{-17}$  ampère.

#### β) *Tube compteur:*

Il peut fonctionner dans la zone GEIGER ou dans la zone proportionnelle.

En emplissant un tube avec du n-butane tritié sous une pression de 14 cm Hg, GLASCOCK<sup>(7, 17)</sup> trouve vers 3.500 volts, dans la zone GEIGER, un plateau qui a une longueur de 400 à 800 volts et une pente de 3% par 100 volts.

D'autres auteurs opèrent dans la zone proportionnelle, notamment en introduisant le tritium sous la forme d'hydrogène et en complétant le remplissage avec du méthane (BERNSTEIN et BALLENTINE<sup>22</sup>; EIDINOFF<sup>8</sup>; VERLY, HUNEBELLE et THOMAS, <sup>23</sup>). Avec les tubes du type BERNSTEIN-BALLENTINE et une pression totale de 760 mm Hg, on trouve un plateau vers 4.000 à 4.500 volts qui a une longueur de 500 à 600 volts et une pente de 1% par 100 volts. Lorsqu'on augmente la proportion d'hydrogène, le plateau se déplace vers les petites tensions et se raccourcit; néanmoins, quand les 2/3 du gaz sont de l'hydrogène, on dispose encore d'un plateau de 200 volts. En utilisant un discriminateur inférieur et

un discriminateur supérieur après l'amplificateur linéaire, de manière à rejeter les impulsions trop fortes ou trop faibles pour être dues au tritium, le *background* est de 90 coups par minute quand le tube est entouré de 5 cm de plomb. Pratiquement toutes les désintégrations qui se produisent dans le cylindre délimité par la cathode sont comptées de sorte qu'il est possible d'utiliser l'appareil pour des mesures absolues approximatives.

On voit que le tube compteur peut mesurer des activités totales plus petites que la chambre à ionisation. En ce qui concerne les mesures des activités spécifiques basses, les deux méthodes se valent probablement. On peut mettre jusqu'à 2,5 millimoles d'hydrogène dans le tube de BERNSTEIN-BALLENTINE, d'autre part on peut augmenter le volume de la chambre à ionisation et la pression de l'hydrogène qu'elle contient.

Il est important de noter que, contrairement à d'autres auteurs (par ex. <sup>22</sup>), VERLY et ses collaborateurs (<sup>21</sup>, <sup>23</sup>) n'ont observé d'effet de mémoire ni dans la chambre à ionisation ni dans le tube proportionnel. Ces chambres sont évacuées 5 minutes avec une pompe mécanique entre deux mesures; l'hydrogène tritié introduit est toujours rigoureusement sec.

#### b. MESURE SOUS LA FORME DE SOLUTION LIQUIDE

L'appareil utilisé porte le nom de scintillateur liquide. De nombreux modèles existent actuellement dans le commerce; le plus utilisé semble être le Tri-Carb fabriqué par Packard Instrument Company, La Grange, Ill., USA. L'auto-absorption est supprimée par la dispersion de l'échantillon tritié dans le détecteur qui est un liquide scintillant.

Les scintillateurs liquides ont été utilisés pour la première fois pour doser le tritium par FARMER et BERSTEIN (<sup>24</sup>) et par HAYES et GOULD (<sup>25</sup>); ils constituent actuellement la méthode la plus utilisée pour doser l'hydrogène radioactif. L'emploi d'un scintillateur liquide est relativement simple, or on sait que la difficulté de la mesure du tritium par les méthodes gazeuses est responsable du lent développement de son utilisation par les biologistes malgré les avantages évidents de ce radio-isotope.

De nombreux renseignements sur les mesures par scintillation liquide se trouvent dans les comptes rendus de la conférence qui s'est tenue à la *Northwestern University* en août 1957 (<sup>26</sup>). La solution scintillante contient généralement du 2,5-diphényloxazole (PPO) et du 1,4-di(2-(5-phényloxazolyl))benzène (POPOP) dissous dans le toluène ou le xylène. Le POPOP, ajouté en petites quantités, modifie la longueur d'onde des quanta lumineux de manière à mieux l'adapter à la sensibilité des photo-

photomultiplicateurs utilisés pour compter les scintillations provoquées par les électrons de désintégration. Les scintillations dues au tritium sont très faibles, aussi est-il nécessaire, pour les compter, de soumettre les photomultiplicateurs à une tension élevée de manière à amplifier suffisamment les signaux électriques. On diminue le bruit de fond des photomultiplicateurs, important à ces tensions, en refroidissant (habituellement vers 0° C) l'échantillon et les photomultiplicateurs; de plus, un circuit de coïncidence permet de distinguer les scintillations qui sont vues simultanément par deux photomultiplicateurs, du bruit de fond qui survient au hasard dans chacun d'eux. Il convient cependant de noter que *Nuclear Enterprises, Ltd* construit un appareil monocal, sans coïncidence ni refroidissement, qui permet de doser le tritium.

La nature non polaire du solvant de la solution scintillante oblige à diviser les produits tritiés dont on veut mesurer la radioactivité en deux catégories: ceux qui sont solubles dans le solvant et ceux qui ne le sont pas.

#### a) Substances solubles dans le toluène ou le xylène:

Avec ces substances, s'il n'y a pas de *quenching* appréciable (voir plus loin), on obtient sans difficulté des rendements de comptage qui atteignent 30%. La plupart des auteurs ne cherchent cependant pas à obtenir un rendement maximum; pour la stabilité et la reproductibilité du comptage, ils choisissent au contraire, pour la mesure, une bande d'énergie qui ne contient pas la totalité du spectre du tritium et ils soumettent les photomultiplicateurs à une tension qui donne le résultat maximum: c'est le «balance point» des auteurs anglo-saxons. On sait que de petites variations de la haute tension d'un photomultiplicateur modifient considérablement la grandeur du signal sortant; mais si on travaille au «balance point», ce que la bande choisie perd d'un côté, elle le regagne de l'autre, de sorte que le résultat n'en est pas modifié. Sur l'appareil *Packard Tri-Carb*, en utilisant une bande passant entre 10 et 60 volts, le rendement est de 20% avec un mouvement propre de 55 coups par minute.

La difficulté de l'interprétation des mesures par scintillation liquide résulte de ce que ni le rendement, ni le *background* ne sont constants: ils varient avec la nature de l'échantillon soumis à la mesure.

Beaucoup de substances éteignent une partie de la scintillation due à la désintégration du tritium (effet *quenching*): le spectre du radioisotope se déplace vers les petites tensions. Pour retrouver le «balance point», il faut chercher une nouvelle tension optimale, plus élevée, pour les photomultiplicateurs; mais, malgré cela, le rendement de comptage décroît. L'addition de naphthalène diminue l'effet «quenching» (FURST, KALL-

MANN et BROWN, <sup>27</sup>; LANGHAM, EVERSOLE, HAYES et TRUJILLO, <sup>28</sup>). L'oxygène a un effet *quenching* appréciable, son enlèvement des solutions scintillantes augmente le rendement de comptage.

Il est donc nécessaire de mesurer, à l'aide d'un étalon, le rendement dans chaque cas particulier. A cet effet, nous possédons, dans notre laboratoire, une solution dans le toluène de N- $\alpha$ -naphtylacétamide tritiée de haute activité spécifique mesurée avec précision par une méthode gazeuse. Pour le calcul du rendement, l'échantillon est partagé en deux; à une fraction, on ajoute une certaine quantité d'étalon, tandis qu'à l'autre, on ajoute un volume égal de toluène; on sait que l'étalon n'a aucun effet «quenching» à la concentration utilisée.

Le *background* doit aussi être soigneusement contrôlé sur un échantillon analogue mais non radioactif. Des cas de chémi-luminescence ont été décrits dans la littérature (HERBERG, <sup>29</sup>).

#### *$\beta$ ) Produits qui ne sont pas solubles dans le toluène et le xylène:*

L'eau tritiée sera d'abord prise comme exemple. Il faut utiliser un solvant intermédiaire de manière à n'avoir qu'une seule phase; ce solvant peut être de l'éthanol ou mieux du p-dioxane car l'éthanol possède une action *quenching* supérieur à celle du dioxane. L'addition de naphthalène augmente le rendement qui reste cependant inférieur à ce qu'il est pour les substances directement solubles dans le toluène et qui n'ont pas d'effet *quenching* marqué. Par exemple, dans l'appareil Tri-Carb, pour la bande passant entre 10 et 60 volts et la haute tension optimale, le rendement de comptage est de 16% pour une solution qui contient 0,3 ml d'eau dans un volume total de 16 ml avec du dioxane comme solvant intermédiaire et du naphthalène.

Pour mesurer les activités spécifiques les plus basses possible, il faut introduire dans l'échantillon qui sert à la mesure la plus grande quantité d'eau. Ce résultat est obtenu en supprimant totalement le toluène et en le remplaçant par le p-dioxane (FURST, KALLMANN et BROWN, <sup>27</sup>; LANGHAM, EVERSOLE, HAYES et TRUJILLO, <sup>28</sup>). VERLY et DULCINO (<sup>30</sup>) ont pu introduire 2 cm<sup>3</sup> d'eau dans 16 ml de solution scintillante dont voici la composition: 13,2 ml de dioxane contenant 64 mg PPO, 1,6 mg POPOP et 1.280 mg naphthalène + 0,8 ml éthanol + 2 ml eau tritiée. Avec le Tri-Carb, bande passant entre 10 et 60 volts et tension optimale, le rendement de comptage est de 9%. C'est le remplacement total du toluène par le dioxane qui a permis l'introduction d'une aussi grande quantité d'eau; l'addition d'éthanol est nécessaire pour tenir la solution liquide à 0° C. Les conditions sont néanmoins critiques, car si on ajoute moins d'eau, la solution gèle; si on ajoute plus d'eau, le naphthalène précipite. Ce mélange permet de mesurer des concentrations de 10<sup>-11</sup> curie par ml

d'eau, soit 10.000 fois moins que la dose tolérable dans l'eau du corps humain. On voit l'intérêt que présente cette solution scintillante pour la mesure de la radioactivité de l'eau des urines des personnes qui travaillent avec de grandes quantités d'hydrogène radioactif.

Des méthodes ont aussi été imaginées pour mettre des substances polaires en solution dans le liquide scintillant à base de toluène sans utiliser de solvant intermédiaire. VAUGHAN, STEINBERG et LOGAN<sup>(31)</sup> utilisent de l'hyamine (détergent cationique) sous la forme de base pour solubiliser des acides aminés et des protéines. Des homogénats entiers de tissus, après digestion dans la formamide, ont aussi été introduits dans des solutions scintillantes (KINNORY et coll.,<sup>32</sup>). Dans ces cas tout particulièrement, des échantillons correspondants mais non radioactifs doivent être soigneusement préparés pour vérifier la valeur du *background*; rappelons que c'est dans des échantillons de ce genre que HERBERG<sup>(29)</sup> a observé de la chémi-luminescence.

On fait également des mesures sur des suspensions de substances insolubles et insolubilisables; ces suspensions sont stabilisées par un composé gélifiant (FUNT,<sup>33</sup> WHITE et HEFT,<sup>34</sup>). On revient ici à des méthodes hétérogènes et, pour que l'auto-absorption reste négligeable, il est nécessaire que les grains du produit tritié en suspension soient extrêmement fins.

#### C. MESURE SOUS LA FORME DE SOLUTION SOLIDE

Par incorporation du tritium dans un plastique scintillant qui peut être placé devant un photomultiplicateur.

#### C. Divers

Ils se rattachent à l'une ou l'autre catégorie précédente. FUNT et HETHERINGTON<sup>(35)</sup> utilisent un capillaire à paroi de plastique scintillant plongé dans un bain de silicone et placé devant un photomultiplicateur. Ce dispositif permet un enregistrement continu de la radioactivité qui se trouve dans un courant de matière; si cette dernière est un gaz, le rendement de comptage sera excellent pour le tritium, mais il ne pourra pas être très élevé si c'est un liquide.

ROUCAYROL, OBERHAUSEN et SCHUBLER<sup>(36)</sup> imprègnent des chromatogrammes sur papier avec une solution scintillante et les présentent à un photomultiplicateur; les photons ayant une pénétration supérieure aux électrons, le rendement est augmenté. Ce système, excellent pour le  $C^{14}$  et le  $S^{35}$ , ne semble pas encore au point pour le tritium.

L'autoradiographie des chromatogrammes sur papier de produits tritiés donne aussi un pauvre rendement parce que la plus grande partie du rayonnement du tritium est absorbée dans le papier. WILSON<sup>(37)</sup> a

amélioré ce rendement en imprégnant le papier d'une solution liquide scintillante qui le rend translucide; les rayons  $\beta$  sont transformés en photons qui atteignent plus facilement le film photographique.

## 2 — PRÉPARATION DE PRODUITS TRITIÉS

La solidité des liaisons chimiques qui unissent les atomes d'hydrogène au reste de la molécule est très variable. La liaison peut être solide, de type covalentiel, c'est le cas dans le groupe méthyle, mais elle peut aussi être de type ionique et extrêmement labile en milieu aqueux comme celle de l'hydrogène d'un groupe carboxylique. Il existe des intermédiaires, mais, schématiquement, on peut classer les atomes d'hydrogène des molécules organiques en deux catégories: les hydrogènes stables et les hydrogènes labiles; ces derniers, qui ne sont que faiblement attachés au reste de la molécule, s'échangent plus ou moins rapidement avec les atomes d'hydrogène de l'eau.

Pour les expériences de biologie, seuls les hydrogènes stables des molécules peuvent être marqués avec du tritium. Les produits tritiés doivent être complètement débarrassés de l'hydrogène radioactif qui occupe des positions labiles; on y parvient en dissolvant la substance dans l'eau ou, mieux, dans une solution basique qui favorise l'émission et l'échange des protons.

### A. Synthèses biologiques

Cette méthode a été peu utilisée jusqu'à présent.

EDINOFF, REILLY, KNOLL et MARRIAN<sup>(38)</sup> ont cultivé de la levure dans de l'eau tritiée en présence d'acétate sodique tritié; des cellules, ils ont ensuite isolé l'adénine, la guanine, la cytosine et l'uracile qui étaient radioactives. L'abondance de l'eau dans les milieux biologiques empêche d'obtenir par cette méthode des activités spécifiques élevées.

Plus intéressant est l'emploi d'un précurseur spécifique tritié. AYRES, PEARLMANN, TAIT et TAIT<sup>(39)</sup> ont préparé de l'aldostérone et de la corticostérone tritiées à partir de progestérone tritiée ajoutée à des surrénales de boeuf. Il s'agit d'un modèle qui peut être imité pour préparer d'autres molécules tritiées.

Signalons encore la biosynthèse d'anticorps marqués au tritium obtenue par CRAWHALL, HAWKINS et SMYTH<sup>(40)</sup>; ces auteurs ont administré de la tritio-valine à des lapins qui recevaient des injections d'albumine de boeuf.

### B. Les préparations chimiques

On peut les classer dans deux catégories principales: synthèse et échange.

## a. SYNTHÈSES

Cette méthode, qui est la plus élégante, permet généralement de placer le radioisotope exactement et exclusivement où on le désire. Ce sont des synthèses qui permettent d'atteindre les activités spécifiques les plus élevées et qui donnent les meilleurs rendements calculés pour l'isotope. La plus simple consiste à saturer une double liaison à l'aide d'hydrogène tritié en présence d'un catalyseur. On peut, pour la réduction, utiliser du tritium pur; le produit de la réaction possède alors une radioactivité spécifique de 60 curies par millimôle. GLASCOCK et REINIUS<sup>(41)</sup> ont décrit un appareil qui permet d'opérer ces réductions à très petite échelle.

Par réduction catalytique, GLASCOCK et REINIUS<sup>(41)</sup> ont obtenu de l'acide stéarique tritié à partir d'acide élaïdique et de l'hexoestrol tritié à partir de dinoestrol. PEARLMANN<sup>(42)</sup> a réduit de l'acétate d'hydroxypregna-5,16-diène-20-one et préparé de la progestérone tritiée ayant une activité de 0,5 curie par millimôle. OSINSKI et PESSES<sup>(43)</sup> ont présenté un travail analogue. D'autres stéroïdes tritiés ont été élaborés à partir des précurseurs adéquats, notamment de l'oestrone, de l'oestradiol-17 $\beta$  et de l'oestriol tritiés (O'DONNELL et PEARLMANN,<sup>44</sup>). De l'adrénaline et de la noradrénaline tritiées en position  $\beta$  peuvent être obtenues par réduction catalytique d'adrénalone et de noradrénalone (LA BROUSSE, AXELROD et KETY,<sup>45</sup>; KOCH,<sup>46</sup>).

Une triple liaison permet théoriquement d'introduire une activité de 120 curies par millimôle. En présence de platine, le butynediol est réduit par l'hydrogène tritié en myleran marqué (KOCH, VERLY et BACQ,<sup>47</sup>; KOCH,<sup>48</sup>).

La L-phénylalanine tritiée sur les carbones  $\alpha$  et  $\beta$  a été préparée par réduction de l'acide  $\alpha$ -acétamino-cinnamoyl-L-glutamique, suivie de séparation des diastéréoisomères et d'hydrolyse de l'acide acétyl-L-phényl-alanyl-L-glutamique (WINAND, BRICTEUX-GRÉGOIRE et VERLY<sup>49</sup>). C'est en hydrogénant de la 2-phényl-4-isopropylidèneoxazol-5-one, puis en hydrolysant le produit de réduction que CRAWHALL et SMYTH<sup>(50)</sup> ont préparé de la valine tritiée.

TORSTEN<sup>(51)</sup> a réduit le groupe aldéhyde de la streptomycine avec de l'hydrogène tritié pour obtenir de la dihydrostreptomycine marquée. Dans le cas de l'acide stéarique tritié préparé à partir de l'acide élaïdique, GLASCOCK et REINIUS<sup>(52)</sup> ont constaté que la totalité du tritium ne se trouvait pas attachée aux carbones 9 et 10 entre lesquels se trouvait la double liaison; en présence de catalyseur, il y a migration de l'isotope le long de la chaîne carbonée. Ce fait est probablement à rapprocher de

la méthode d'étiquetage par échange catalytique dont nous parlerons bientôt.

L'hydrure tritié de boro-lithium est obtenu en chauffant l'hydrure ordinaire en présence d'hydrogène tritié (SMITH, WILZBACH et BROWN, <sup>53</sup>); cette substance peut servir à préparer par réduction de nombreuses molécules tritiées.

Quand on ne dispose pas d'un précurseur capable d'être réduit de manière à placer le tritium où l'on désire qu'il soit, il faut recourir, comme pour les molécules marquées au  $C^{14}$ , aux procédés compliqués de la synthèse organique.

Le méthanol tritié a été préparé par VERLY et coll. (<sup>54</sup>) et VERLY (<sup>55</sup>) de la manière suivante: de l'acide  $\beta$ -naphtoïque est dissous dans du dioxane qui contient de l'eau tritiée, puis traité par le diazométhane. Le tritium carboxylique labile introduit par échange est ainsi incorporé dans un groupe méthyle où il est solidement lié. Le  $\beta$ -naphtoate de tritio-méthyle est hydrolysé à sec par KOH pour obtenir le méthanol.

Le méthanol tritié peut aussi être obtenu par réduction du  $CO_2$  par de l'hydrure tritié de boro-lithium (<sup>53</sup>).

Le méthanol tritié sert de précurseur à l'iodure de méthyle tritié (<sup>53, 55</sup>) qui peut être transformé, par la synthèse de Gabriel, en tritiométhylamine (VERLY, <sup>56</sup>); La L-méthionine marquée dans le groupe méthyle est préparé à partir d'iodure de tritiométhyle et de L-homocystine (VERLY, <sup>55</sup>), tandis que la tritiométhylamine réagit avec le chloroacétyl-catéchol pour donner de l'adrénalone et, par réduction, de l'adrénaline marquées dans le groupe méthyle (KOCH, <sup>12</sup>; VERLY, <sup>56</sup>). La localisation du tritium dans le groupe méthyle de l'adrénaline de synthèse a été prouvée par dégradation chimique de la molécule (KOCH, <sup>12</sup>; VERLY, <sup>57</sup>).

La préparation de l'acétate et de l'anhydride acétique tritiés est basée sur des réactions d'échange et des réactions chimiques. De l'acide malonique est chauffé en présence d'eau tritiée, puis décarboxylé; l'acide acétique tritié est neutralisé par la soude. L'anhydride tritié s'obtient par échange thermique entre l'anhydride acétique ordinaire et l'acétate sodique marqué (AVIVI, SIMPSON, TAIT et WHITEHEAD, <sup>58</sup>).

ARNSTEIN et CRAWHALL (<sup>59</sup>) ont synthétisé de la formaldéhyde tritiée et de la cystine marquée avec du tritium soit en position  $\alpha$ , soit en position  $\beta$ . Après échange entre l'eau tritiée et le chlorhydrate d'aminomalonate d'éthyle, ce dernier est décarboxylé en ( $\alpha$ - $H^3$ )-glycine qui est décomposée par la ninhydrine en formaldéhyde tritiée. L'acide  $\alpha$ -acétamino- $\beta$ -benzylthiométhylmalonique tritié par échange dans les groupes carboxyle est décarboxylé en S-benzyl-( $\alpha$ - $H^3$ )-cystéine; après réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide, la ( $\alpha$ - $H^3$ )-cystéine est oxydée en

( $\alpha$ -H<sup>3</sup>)-cystine. C'est à partir de formaldéhyde tritiée que ARNSTEIN et CRAWHALL on préparé la ( $\beta$ -H<sup>3</sup>)-cystéine et la ( $\beta$ -H<sup>3</sup>)-cystine.

## b. LES ÉCHANGES

### i) Échanges catalytiques

Ceux-ci sont obtenus en chauffant le composé non marqué dans l'eau ou l'acide acétique tritié en présence de platine ou de palladium comme catalyseur.

La méthode a d'abord été appliquée à la préparation de stéroïdes marqués par FUKUSHIMA et GALLAGHER<sup>(60, 61)</sup>, et FUKUSHIMA, KRITCHEVSKY, EIDINOFF et GALLAGHER<sup>(62)</sup>. Ces auteurs ont étudié la distribution de l'isotope après échange pour le cholestérol<sup>(60)</sup> et pour la cortisone<sup>(62)</sup>. La même méthode a été utilisée par EIDINOFF et KNOLL<sup>(63)</sup> pour obtenir des purines et des pyrimidines tritiées. Plus récemment, on a préparé des nucléosides tritiés: thymidine (HUGHES,<sup>64, 65</sup>; VERLY et HUNEBELLE,<sup>66</sup>), uridine (HUGHES,<sup>64</sup>), 5-bromodésoxyuridine (EIDINOFF, CHEONG et RICH,<sup>67</sup>). C'est aussi par échange catalytique que KRITCHEVSKY, McCANDLESS, KNOLL et EIDINOFF<sup>(68)</sup> ont pu tritier la trioléine.

Contrairement aux synthèses chimiques (voir cependant GLASCOCK et REINIUS,<sup>52</sup>), les échanges catalytiques, même après élimination des atomes de tritium labiles, ne placent pas le radioisotope dans une position unique et prévisible: il occupe habituellement plusieurs positions à des concentrations différentes (voir FUKUSHIMA et coll.,<sup>60, 62</sup>).

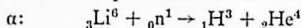
A titre d'exemple d'échange catalytique, nous prendrons la préparation de la thymidine tritiée telle qu'elle est décrite par VERLY et HUNEBELLE<sup>(66)</sup>. De la thymidine ordinaire est dissoute dans de l'eau tritiée à laquelle on ajoute du catalyseur d'Adams fraîchement réduit; on chauffe en tube scellé, puis l'eau et le catalyseur sont enlevés. Pour éliminer les atomes de tritium labiles, le résidu est chauffé dans une solution de soude; celle-ci est ensuite neutralisée par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et la solution évaporée à sec. Le nouveau résidu est extrait avec du butanol bouillant dans lequel le sulfate de sodium est insoluble, puis décoloré au charbon actif. La thymidine, partiellement hydrolysée au cours de l'échange, est purifiée par chromatographie et cristallisation. L'hydrolyse du produit marqué montre que la totalité du tritium se trouve dans la pyrimidine.

De manière à pouvoir utiliser sans risque de grandes quantités d'hydrogène radioactif, VERLY et HUNEBELLE<sup>(66)</sup> utilisent des appareils en verre pyrex entièrement scellés, sans robinet ni joint rodé.

### *ii) Irradiation avec des tritons de recul*

Cette méthode a reçu peu d'applications intéressant le biologiste; elle a été très rapidement remplacée par la méthode de WILZBACH (voir plus loin) pour la préparation des produits tritiés.

Le procédé décrit par ROWLAND, TURTON et WOLFGANG<sup>(69, 70)</sup> consiste à mettre dans une pile atomique un mélange de sel de lithium et du composé hydrogéné que l'on désire marquer. Les neutrons lents réagissent avec le  $\text{Li}^6$  pour donner des tritons (noyaux de tritium) et des particules  $\alpha$ :



Les tritons qui échappent des grains de sel de lithium, bombardent la substance hydrogénée et peuvent y remplacer des protons.

Après l'irradiation, le produit doit être purifié et débarrassé des atomes de tritium labiles. L'irradiation détruit une partie des molécules; en particulier, les molécules dans lesquelles un triton a pris la place d'un proton sont très souvent détruites: il s'ensuit que la radioactivité spécifique de certains produits de dégradation est plus élevée que celle de la substance mère, d'où la nécessité d'une purification soigneuse. En principe, la méthode marque tous les hydrogènes de la molécule mais avec des intensités différentes<sup>(71, 72)</sup>.

ROWLAND et WOLFGANG<sup>(72)</sup> ont cherché les conditions qui leur donnaient le plus fort marquage avec le minimum de destruction. Dans la même publication<sup>(72)</sup>, ils donnent la liste des produits qui ont été tritiés par cette méthode.

### *iii) Bombardement avec des ions tritium ( $\text{T}^+$ )*

WOLFGANG, PRATT et ROWLAND<sup>(73)</sup> accélèrent des ions tritium avec une différence de potentiel de 500 volts pour bombarder une cible qui porte le produit hydrogéné à marquer. Après purification, le produit contient du tritium.

### *iv) Échange avec de l'hydrogène tritié*

Cette méthode mise au point par WILZBACH<sup>(74)</sup> jouit actuellement du plus grand prestige; théoriquement, elle permet de marquer n'importe quelle substance hydrogénée même celles qui ne sont pas actuellement accessibles à la synthèse organique.

Le procédé est simple et rapide: la substance à marquer, gazeuse ou sous la forme d'un mince film liquide ou solide, est exposée à de l'hydrogène tritié (habituellement 100% de tritium). La radiation du tritium fournit l'énergie nécessaire pour rompre la liaison entre des atomes d'hydrogène

et le reste de la molécule; le tritium occupe alors ces places devenues vacantes (AHRENS, SAUER et WILLARD, <sup>75</sup>).

Mais ici, comme pour l'irradiation par des tritons de recul, la plus grande partie de la radioactivité se trouve dans des produits de dégradation. La purification constitue la partie la plus laborieuse de l'opération; elle doit être poursuivie jusqu'à ce que l'activité spécifique du produit tritié soit constante. Les tritium labiles sont enlevés et le radioisotope occupe finalement toutes les positions stables, bien qu'à des concentrations différentes (WILZBACH, <sup>74</sup>). Les activités spécifiques que l'on peut atteindre par cette technique sont de l'ordre de 10 millicuries par gramme; elles sont donc très inférieures à celles que l'on obtient par réduction avec de l'hydrogène tritié.

Dans sa première publication, WILZBACH (<sup>74</sup>) signale la préparation, par échange avec de l'hydrogène tritié, de toluène, n-heptane, acide benzoïque, saccharose et digitoxine marqués. A cette liste, sont venus s'ajouter: 20 $\beta$ -hydroxycholestérol, déhydroisoandrosterone, désoxycorticostérone, proline, hydroxyproline, acide p-aminosalicylique, adénine, thymidine, morphine, réserpine, méprobamate, acide gibérellique (WILZBACH, <sup>76</sup>). La méthode est utilisée pour préparer des protéines tritiées; il est évident qu'ici le seul procédé concurrent pourrait être la biosynthèse (cf <sup>40</sup>). STEINBERG, VAUGHAN, ANFINSEN et GORRY (<sup>77</sup>) ont obtenu du lysozyme et de la ribonucléase tritiés, et HOLT, NOLTE et HOLT (<sup>78</sup>), de l'insuline tritiée. FONG, SCHWARZ, POPENOE, SILVER et SCHOESSLER (<sup>79</sup>) ont tritié la vasopressine. LEMMON, TOLBERT, STROHMEIER et WHITTEMORE (<sup>80</sup>) ont montré que les agents ionisants augmentent l'échange entre l'hydrogène tritié et la substance hydrogénée (benzène dans leurs expériences). Pour une source extérieure de radiations (Co<sup>60</sup>) toutefois, la destruction du composé hydrogéné progresse plus rapidement que le gain de l'échange: une augmentation par un facteur 200 de l'énergie absorbée, multiplie par 7 seulement l'activité spécifique du composé marqué. Par contre, une décharge électrique silencieuse (courant alternatif, 20.000 volts, 1 milliampère pendant 1 heure) permet d'augmenter considérablement l'incorporation du tritium dans le produit à marquer (10.000 fois dans l'expérience citée) sans aggraver la destruction. Notons que ce procédé où l'on utilise un courant alternatif sert simplement à produire des ions sans les accélérer; il est différent de celui de WOLFGANG et coll. (<sup>73</sup>) (cf paragraphe iii) qui utilisent une d. d. p. continue pour accélérer des ions tritium.

#### v) Autres échanges

WRIGHT et WELLER (<sup>81</sup>) ont marqué des hydrocarbures par échange avec des hydrures deutérés de baryum et de calcium.

GURIN et DELLUVA <sup>(82)</sup> ont obtenu de la phénylalanine tritiée en chauffant de la DL-phénylalanine dans de l'acide sulfurique tritié.

### 3 — BIOLOGIE

#### A. Recherches biochimiques et physiologiques

##### a. ÉTUDE DU COMPORTEMENT DES ATOMES D'HYDROGÈNE AU COURS DES TRANSFORMATIONS MÉTABOLIQUES

Un radioisotope permet de marquer un atome qui occupe une position particulière dans une molécule et de suivre le sort de cet atome au cours des transformations que subit la molécule dans le courant métabolique. Cette utilisation exige, comme on le voit, de placer le tritium dans une seule position parfaitement définie; seule la synthèse organique permet d'atteindre ce résultat.

Pour marquer l'hydrogène, le tritium présente, par rapport au deutérium, l'avantage d'une beaucoup plus grande sensibilité. Pour le biologiste, les dosages de deutérium perdent tout intérêt quand la concentration tombe au-dessous de  $10^{-4}$ , tandis qu'il peut mesurer des concentrations de tritium de  $10^{-14}$ . Néanmoins, l'existence de deux isotopes rares de l'hydrogène permet d'envisager des expériences dans lesquelles deux atomes d'hydrogène de la même molécule seraient suivis simultanément et indépendamment. THOMPSON et BALLOU <sup>(83, 84, 85, 86, 87)</sup>, BOGDANOV, SHALNOV et STUCKENBERG <sup>(88)</sup>, PINSON et ANDERSON <sup>(89)</sup> ont étudié le métabolisme de l'eau marquée au tritium et l'incorporation de son hydrogène dans les différentes fractions des constituants tissulaires. Le renouvellement des molécules ainsi marquées peut alors être suivi; il est très lent pour certaines catégories, notamment pour le collagène qui ne paraît guère participer à l'état dynamique des constituants des tissus décrit par SCHOENHEIMER (THOMPSON et BALLOU, <sup>86</sup>). SMITH, EMERSON, TEMPLE et GALBRAITH <sup>(90)</sup> ont trouvé que le mammifère peut oxyder l'hydrogène tritié en eau; les bactéries intestinales semblent responsables de cette oxydation. NORRIS, RUBEN et ALLEN <sup>(91)</sup> n'ont pas observé d'incorporation significative de tritium dans la chlorophylle au moment de l'illumination de cellules végétales plongées dans de l'eau tritiée.

L'origine biologique du groupe méthyle de l'adrénaline a pu être précisée grâce à l'emploi de l'hydrogène radioactif. On savait que le carbone du groupe méthyle de la méthionine était utilisé pour la biosynthèse de l'adrénaline et qu'il était vraisemblablement incorporé dans le groupe méthyle de cette dernière (KELLER, BOISSONAS et du VIGNEAUD, <sup>92</sup>). Pour démontrer

que la bioréaction entre la méthionine et l'adrénaline était une trans-méthylation (= transfert d'un groupe méthyle intact), il fallait prouver que les 3 atomes d'hydrogène restaient fixés au carbone pendant toute l'opération. Dans ce but, VERLY<sup>(93)</sup> a administré à des rats un mélange de L-méthionine marquée avec du  $C^{14}$  dans le groupe méthyle et de L-méthionine tritiée dans le méthyle, puis extrait l'adrénaline des surrénales et isolé, par dégradation chimique, son groupe méthyle. Le rapport des concentrations en tritium et  $C^{14}$  ( $T/C^{14}$ ) était un peu plus élevé dans le groupe méthyle de l'adrénaline que dans le groupe méthyle de la méthionine administrée; ce qui s'accorde le mieux avec l'hypothèse d'une trans-méthylation.

ARNSTEIN et CRAWHALL<sup>(59)</sup> se sont servis de cystine marquée en  $\alpha$  ou en  $\beta$  par du tritium pour étudier le mécanisme de la biosynthèse de la pénicilline.

#### b. TRITIUM, TRACEUR ACCESSOIRE DU CARBONE

Le plus souvent, le tritium est utilisé pour marquer la molécule entière et la suivre au cours de processus physiologiques d'absorption, de transport, etc. qui ne sont pas accompagnés de transformation moléculaire, ou pour des études métaboliques dans lesquelles de grandes parties de la molécule restent intactes. On dit souvent que, dans ces cas, le tritium est un traceur accessoire du carbone. Pour ces expériences, la position du tritium dans la molécule a moins d'importance, et les méthodes d'échange aussi bien que les synthèses peuvent être employées pour la préparation des produits tritiés.

Il faut donc être certain qu'une grande partie de la molécule qui contient le tritium, ne subit aucun changement au cours de la réaction étudiée. Nous illustrerons cette notion par deux exemples: si on utilise de l'acétate marqué avec du tritium et du  $C^{14}$  dans le méthyle pour étudier la biosynthèse du cholestérol, non seulement le rapport des concentrations  $T/C^{14}$  est plus faible dans le cholestérol isolé que dans l'acétate, mais le pourcentage de tritium perdu varie d'une expérience à l'autre (voir aussi RITTENBERG et BLOCH,<sup>94</sup>). Par contre le cholestérol marqué avec du tritium par échange catalytique convient parfaitement pour les études physiologiques de son absorption, distribution et renouvellement: BIGGS et KRITCHEVSKY<sup>(95)</sup>, après avoir donné un mélange de cholestérols marqués avec du  $C^{14}$  et du  $H^3$ , ont observé que le rapport des concentrations  $T/C^{14}$  dans le cholestérol sérique ne changeait pas pendant les 10 jours suivant l'administration et restait égal à celui du cholestérol administré.

Mais si le tritium n'est qu'un traceur accessoire du carbone, quel peut être son avantage sur le  $C^{14}$ ? Nous en énumérerons trois: — la relative

facilité de la préparation des composés tritiés par des réactions d'échange ou même de réduction catalytique, comparée à la difficulté des synthèses organiques nécessaires pour les produits marqués au  $C^{14}$ . On peut aussi, par échange, tritier des molécules qui sont actuellement inaccessibles à la synthèse organique, par ex. les protéines;

— l'activité spécifique élevée que peuvent atteindre les produits tritiés (plusieurs curies à la millimole; la firme Schwartz prépare une thymidine qui a une activité spécifique de 3 curies par millimole). Le  $C^{14}$ , à cause de sa demi-vie beaucoup plus longue, ne permet d'obtenir que des activités 1.000 fois plus faibles. Cet avantage de l'hydrogène radioactif est décisif pour les substances qui agissent à très faible dose: vitamines, hormones, certains médicaments. On fait le même travail avec 1  $\mu$ g de substance au lieu de 1 mg! Aussi est-ce là un champ d'application du tritium en biologie qui se développera de plus en plus;

— le faible prix du tritium comparativement à celui du  $C^{14}$  est aussi un élément à ne pas négliger.

GURIN et DELLUVA <sup>(82)</sup>, en se servant de phénylalanine tritiée, ont montré que cet aminé était un précurseur biologique de l'adrénaline; ils ont obtenu le même résultat avec de la  $C^{14}$ -phénylalanine.

De nombreuses études de métabolisme ont été réalisées avec des stéroïdes tritiés. En plus des travaux déjà anciens de FUKUSHIMA, GALLAGHER et leurs collaborateurs, il convient de citer les travaux de BERGSTROM et LINDSTEDT <sup>(96)</sup> qui ont montré la transformation du 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -dihydroxycoprostanone en acide cholique chez le rat, et les travaux de PEARLMAN <sup>(97)</sup> sur le métabolisme de la progestérone chez la femme enceinte.

GLASCOCK et REINIUS <sup>(52)</sup>, GLASCOCK, DUNCOMBE et REINIUS <sup>(98)</sup> ont étudié l'origine des graisses du lait de la chèvre en se servant d'acide stéarique tritié. Ils ont montré que l'acide stéarique se transforme en acide oléique; une partie des acides gras à longue chaîne que l'on trouve dans le lait a une origine alimentaire, tandis que les acides gras à chaîne courte sont élaborés par l'organisme.

C'est en utilisant de l'adrénaline et de la noradrénaline marquées avec du tritium que l'on a montré que la 3-O-méthylation, découverte par AXELROD <sup>(99)</sup> dans le foie de rat, est aussi la voie principale du catabolisme de ces amines sympathicomimétiques chez l'homme; la S-adenosyl-méthionine est le donneur de méthyle et la réaction est catalysée par la catéchol-O-méthyltransférase; ce sont les dérivés 3-méthoxy qui subissent l'action de la monoaminoxidase qui les transforme en acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique (LA BROSE, AXELROD et KETY, <sup>45</sup>). WEIL-MALHERBE, AXELROD et TOMCHICK <sup>(100)</sup>, après injection intraveineuse de  $H^3$ -adrénaline, ont observé que cette substance ne pénètre dans le tissu cérébral qu'au niveau de l'hypothalamus.

En partant d'acide nicotinique marqué avec du tritium dans le cycle pyridine, DAWSON et coll. <sup>(101)</sup> ont montré que les alcaloïdes du groupe nicotine du tabac trouvent dans l'acide nicotinique l'origine de leur noyau pyridine.

Citons aussi le beau travail de FONG et coll. <sup>(79)</sup> qui montre que la lysine-vasopressine, l'hormone antidiurétique, est fixée dans le rein par des liaisons disulfures.

HOLT, NOLTE et HOLT <sup>(78)</sup> ont constaté que l'insuline tritiée est fixée principalement par l'hypophyse, les surrénales et le foie et qu'elle est dégradée surtout par le rein et le foie; ces auteurs ont étudié l'influence de la cortisone et de l'hormone hypophysaire somatotrope sur la fixation et la dégradation de l'insuline.

Des travaux sur l'absorption, le transport et l'excrétion des médicaments ont également utilisé le tritium. Telles sont les études de SNELL et de ses collaborateurs <sup>(102)</sup> sur la terramycine, la tétracycline, l'oléandomycine, DE TORSTEN <sup>(103)</sup> sur la dihydrostreptomycine et de SPRATT et OKITA <sup>(104)</sup> sur la digitoxine.

L'anhydride acétique tritié a été utilisé comme réactif en chimie analytique (AVIVI, SIMPSON, TAIT et WHITEHEAD, <sup>58</sup>). Ces auteurs emploient une méthode de double marquage pour doser la cortisone et l'hydrocortisone dans le sang périphérique; après addition de C<sup>14</sup>-cortisone et de C<sup>14</sup>-hydrocortisone et acétylation par l'anhydride acétique tritié, les acétates sont isolés; les dosages de tritium donnent les quantités d'acétate isolé tandis que les mesures de C<sup>14</sup> permettent de calculer les rendements des opérations. DEMEY et VERLY (4), en utilisant de l'anhydride acétique tritié ont trouvé des conditions qui permettent de transformer quantitativement quelques µg de cortisol en monoacétate.

## B. La sélection isotopique

La masse du tritium (H<sup>3</sup>) est 3 fois plus grande que celle du protium (H<sup>1</sup>), l'isotope le plus abondant de l'hydrogène naturel (99,98%). Les vitesses de réaction des produits tritiés sont parfois différentes de celles des produits non marqués correspondants: il y a sélection isotopique. Celle-ci peut avoir une importance considérable en biologie.

L'énergie d'activation nécessaire pour libérer un atome d'hydrogène lié covalentiellement à un carbone est environ 1500 calories plus élevée si l'hydrogène est du tritium au lieu d'être du protium. Si on soumet à un enzyme oxydant un mélange de liaisons C—H et C—T (H = H<sup>1</sup> et T = H<sup>3</sup>), les premières seront rompues statistiquement plus fréquemment que les secondes, d'où, avant d'atteindre l'équilibre thermodynamique, une

modification de l'activité spécifique de la substance mise en oeuvre et du produit de la réaction. Le tritium ne peut donc pas, dans ces conditions, servir pour mesurer la vitesse de la réaction subie par le produit non marqué. La même sélection isotopique existe pour le deutérium, quoiqu'à un moindre degré.

La vitesse d'oxydation par la succino-déshydrogénase est diminuée de 30% quand l'acide succinique ordinaire est remplacé par de l'acide  $\alpha, \alpha$ -dideutéro-succinique, et de 60% pour l'acide tétradeutéro-succinique (THORN, <sup>105</sup>).

Le carbone du méthanol est un précurseur biologique des groupes méthyle de la choline des tissus du rat (DU VIGNEAUD et VERLY, <sup>106</sup>), mais le méthanol est d'abord oxydé avant d'être réduit en méthyle de choline (DU VIGNEAUD, VERLY, WILSON, RACHELE, RESSLER et KINNEY, <sup>107</sup>). On dispose donc d'un système biologique pour étudier l'influence de l'effet isotopique sur la rupture de la liaison carbone-hydrogène. VERLY, RACHELE, DU VIGNEAUD, EIDINOFF et KNOLL (<sup>54</sup>) ont préparé, puis administré à un rat un mélange de méthanols deutéré et tritié ( $\text{CD}_3\text{OH}$  et  $\text{CH}_3\text{TOH}$ ) ( $\text{D} = \text{H}^2$ ); la choline isolée des tissus a été dégradée et le rapport des con-

TABLEAU II

Deutérium, tritium et  $\text{C}^{14}$  dans les groupes méthyle de la choline après administration de méthanol triplement marqué.

		Isotopes dans le groupe méthyle							
		D at % excès	T d/min./ m-mole $\times 10^{-4}$	$\text{C}^{14}$ c/min./ m-mole $\times 10^{-4}$	$\text{D}/\text{C}^{14} \times 10^6$	$\text{T}/\text{C}^{14}$	rapport D	rapport T	T/D
Méthanol injecté		79,2	1.370	213	37,2	6,43			
Choline	Rat 1	0,550	32,5	6,77	8,12	4,80	0,22	0,75	3,4
	Rat 2	0,458	24,7	5,60	8,18	4,42	0,22	0,69	3,1

Le «rapport D» est calculé en divisant le rapport  $\text{D}/\text{C}^{14}$  trouvé dans le méthyle de la choline par le rapport  $\text{D}/\text{C}^{14}$  du méthyle du méthanol. On se sert de la même manière des rapports  $\text{T}/\text{C}^{14}$  pour calculer les «rapports T». Les valeurs de la dernière colonne représentent le quotient du «rapport T» par le «rapport D».

centrations T/D dans son groupe méthyle, mesuré. S'il n'y avait eu aucun effet isotopique, il est évident que le rapport T/D aurait dû être le même dans les groupes méthyle de la choline isolée que dans celui du méthanol administré; or, on peut voir (tableau II) qu'il était 3 fois plus grand!

Cet effet isotopique peut conduire à des erreurs d'interprétation. Dans l'expérience de VERLY et coll. <sup>(54)</sup>, le mélange administré contenait, en plus du  $\text{CD}_3\text{OH}$  et du  $\text{CH}_2\text{TOH}$ , du méthanol marqué avec du  $\text{C}^{14}$ . Le tableau II montre que le rapport  $\text{D/C}^{14}$  dans les groupes méthyle de la choline était 22% de ce qu'il était dans le méthanol. Interprété, sans tenir compte de la possibilité d'un effet isotopique, le résultat signifierait que, en moyenne, 78% des atomes d'hydrogène du groupe méthyle du méthanol seraient perdus au cours des bioréactions, ce qui laisserait supposer que le méthanol est d'abord oxydé en formiate. Mais le même tableau II montre que le rapport  $\text{T/C}^{14}$  dans les groupes méthyle de la choline était 72% de ce qu'il était dans le méthanol, ce qui signifierait que 28% seulement des atomes d'hydrogène seraient perdus et que l'oxydation n'aurait pas dépassé le stade de formaldéhyde! Les deux interprétations sont en flagrante contradiction: l'effet isotopique empêche de connaître le niveau d'oxydation atteint par le méthanol avant de pouvoir servir à la biosynthèse du groupe méthyle de la choline.

Pour apprécier la valeur relative des effets isotopiques pour le deutérium et le tritium, la comparaison de méthanol trideutéié  $\text{CD}_3\text{OH}$  et de méthanol monotritié  $\text{CH}_2\text{TOH}$  n'est pas correcte; l'oxydation de  $\text{CH}_2\text{TOH}$  en formaldéhyde ou formiate est l'occasion d'une sélection isotopique intramoléculaire qui n'existe pas dans le cas de  $\text{CD}_3\text{OH}$ . Pour remédier à cette objection, RACHELE, KUCHINSKAS, KNOLL et EIDINOFF <sup>(108)</sup> ont donné à des rats un mélange de  $\text{CH}_3\text{DOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{TOH}$  et  $\text{C}^{14}\text{H}_3\text{OH}$ ; dans cette expérience, le rapport  $\text{D/C}^{14}$  dans les groupes méthyle de la choline était 66% et le rapport  $\text{T/C}^{14}$ , 84%, de ce qu'ils étaient dans le groupe méthyle du méthanol administré; la rétention du tritium est ici 1,3 fois plus grande que celle du deutérium. Ces auteurs ont aussi isolé le formiate des urines et trouvé dans celui-ci un facteur de fractionnement de 1,7.

Cette étude sur l'oxydation du groupe méthyle faite à l'aide des isotopes de l'hydrogène montre que le résultat dépend de l'isotope utilisé mais aussi de la manière dont le groupement est marqué. D'autre part, il est évident qu'un double marquage intermoléculaire du groupe méthyle (par ex. un mélange de  $\text{CD}_3\text{OH}$  et de  $\text{C}^{14}\text{H}_3\text{OH}$ ) ne donne aucune indication sur le niveau d'oxydation atteint par le méthanol avant de servir à la biosynthèse de la choline. Pour obtenir cette information sur le mécanisme de la bioréaction, il serait nécessaire d'utiliser un double étiquetage intramoléculaire, c.-à.-d. une seule variété isotopique de la molécule contenant les deux traceurs, par ex.  $\text{C}^{13}\text{D}_3\text{OH}$ , et ne se prêtant pas à une sélection

intramoléculaire. Avec un tel marquage, si le mécanisme de la bioréaction n'est pas altéré, la comparaison du rapport D/C<sup>13</sup> dans les groupes méthyle de choline et du méthanol, doit indiquer le pourcentage d'hydrogène perdu en moyenne par le groupe méthyle du méthanol avant d'être réduit en méthyle de choline et permettre de faire une hypothèse concernant le niveau d'oxydation atteint (VERLY, <sup>109, 110</sup>).

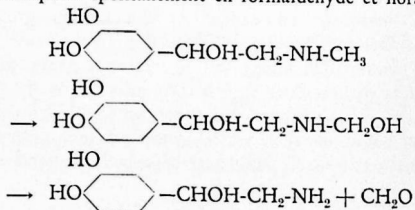
RACHELE, KUCHINSKAS, KRATZER et DU VIGNEAUD (<sup>111</sup>) ont constaté que, donné à des rats sous la forme de méthionine, le groupe-C<sup>14</sup>D<sub>3</sub> était oxydé moins rapidement que le groupe-C<sup>14</sup>H<sub>3</sub>.

WEINBERGGER et PORTER (<sup>112</sup>) ont noté que l'incorporation du deutérium n'était que 50% et celle du tritium 40% de celle du protium dans les constituants des cellules de *Chlorella pyrenoidosa* en croissance rapide dans de l'eau contenant du deutérium et du tritium.

Lorsqu'on donne à des rats de l'eau deutérée et tritiée, on observe aussi une incorporation préférentielle de l'isotope le plus léger dans les constituants de tissus: acides gras (GLASCOCK et DUNCOMBE, <sup>113</sup>; EIDINOFF, PERRI, KNOLL, MARANO et ARNHEIM, <sup>114</sup>), graisses totales (THOMPSON et BALLOU, <sup>115</sup>), cholestérol (EIDINOFF, KNOLL, MARANO, PERRI et ROSENFELD, <sup>116</sup>), glycogène hépatique (<sup>114</sup>).

On entrevoit la possibilité d'utiliser la sélection isotopique pour découvrir de nouvelles voies biochimiques.

Dans l'expérience déjà citée où VERLY (<sup>93</sup>) a administré à un rat un mélange de méthionines marquées dans le groupe méthyle, l'une avec du tritium, l'autre avec du C<sup>14</sup>, on a constaté que le rapport T/C<sup>14</sup> dans le groupe méthyle de l'adrénaline isolée des surrénales était plus élevé que dans celui de la méthionine ingérée. L'hypothèse d'une transméthylation, c.-à-d. du transfert du groupe méthyle entier, de la méthionine à l'adrénaline est la plus vraisemblable, car c'est cette réaction qui peut apporter le plus de tritium à l'adrénaline. Mais la transméthylation peut simplement maintenir la valeur du rapport T/C<sup>14</sup>. L'excès constaté doit être attribué à une réaction secondaire d'oxydation du groupe méthyle au cours de laquelle se produit un effet isotopique. Cette réaction pourrait être une oxydation du groupe méthyle de l'adrénaline elle-même en un groupe hydroxyméthyle. La N-hydroxyméthylnoradrénaline ainsi formée devrait se décomposer spontanément en formaldéhyde et noradrénaline.



Cette voie métabolique suggérée par un effet isotopique semble bien exister. HUNZINGER, RITZEL et STAUB <sup>(118)</sup> ont observé que des infusions lentes d'adrénaline sont suivies d'une augmentation très importante de la quantité de noradrénaline dans le plasma.

### C. Autoradiographie

Parmi les radioisotopes, le tritium émet les rayons  $\beta$  les moins pénétrants; les électrons qui ont la plus grande énergie cinétique (18.000 eV) parcourent 8  $\mu$  et ceux qui ont une énergie moyenne (5690 eV), 1,2  $\mu$  dans un milieu de densité unitaire (eau par ex.).

La faiblesse du rayonnement du tritium permet une localisation très précise de ce radioisotope dans les cellules vivantes. Cette localisation se fait par la technique de l'autoradiographie: le specimen habituellement fixé (parfois simplement séché) (BOYD, <sup>119</sup>), coupe histologique ou frottis de cellules, est couvert d'une émulsion nucléaire. On utilise un *stripping film* ou une émulsion liquide coulée sur l'objet. La couche sensible a une épaisseur de 5  $\mu$  au maximum (il n'y a aucun avantage à l'augmenter à cause de la faible pénétration du rayonnement du tritium); c'est une émulsion de grains de AgBr (45% en volume, 80% en poids) ayant un diamètre de 0,2  $\mu$  environ dans une matrice de gélatine. La densité de l'émulsion est 3,5 et la trajectoire maximum d'un électron de tritium dans ce milieu, 2  $\mu$ . L'expérience montre d'ailleurs, qu'après développement, les grains d'argent se trouvent presque tous à moins de 1  $\mu$  de l'endroit où la désintégration s'est produite (voir aussi BEISCHER <sup>120</sup>); ceci donne une idée du pouvoir de résolution du tritium combiné à la technique de l'autoradiographie.

Les premières autoradiographies d'objets tritiés ont été obtenues par EIDINOFF, FITZGERALD, SIMMEL et KNOLL <sup>(121, 122)</sup> avec des levures et des paramécies qui avaient été cultivées en présence d'eau et d'acétate tritiés. CHAPMAN-ANDRESEN <sup>(123)</sup> compare le pouvoir de résolution du tritium et du  $C^{14}$  en obtenant des autoradiogrammes de *Senedesmus* marqués avec l'un ou l'autre isotope; comme il fallait s'y attendre, les résultats obtenus avec le tritium sont beaucoup plus précis.

La préparation de thymidine tritiée par HUGHES <sup>(64)</sup> et par VERLY et HUNEBELLE <sup>(66)</sup> a provoqué un véritable engouement pour les études autoradiographiques à l'aide de tritium. La thymidine tritiée est un précurseur très spécifique de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et le tritium non soluble qui reste dans la cellule après fixation est presque exclusivement situé dans l'ADN; on peut d'ailleurs le montrer en traitant la préparation par la désoxyribonucléase qui solubilise la substance tritiée (FICQ et PAVAN, <sup>124</sup>). L'autoradiographie détecte le tritium, mais n'identifie pas la molécule tritiée; les études de métabolisme à l'échelle cytologique nécessitent l'emploi de précurseurs relativement spécifiques.

TAYLOR, WOODS et HUGHES <sup>(125, 64)</sup> ont étudié, avec de la thymidine tritiée, le mécanisme de la multiplication des chromosomes chez *Vicia faba*; ils arrivent à la conclusion que le chromosome est initialement formé par deux filaments qui se multiplient indépendamment. Les auteurs signalent des cas de *crossing over* rendus visibles par le radioisotope.

FIRKET et VERLY <sup>(126, 127, 128)</sup> montrent que la synthèse de l'ADN dans les fibroblastes de poulet en culture précède la mitose de 7 heures en moyenne; qu'à l'anaphase, les deux groupes de chromosomes emportent à peu près la même quantité de l'ancien et du nouvel ADN; que les cellules qui ne se multiplient pas, ne montrent aucun renouvellement de leur ADN. Une étude analogue a été faite par PAINTER et DREW <sup>(129)</sup> sur des cellules cancéreuses.

FICQ et PAVAN <sup>(124)</sup> observent une forte incorporation de la thymidine tritiée dans les nodules (*puffs*) des chromosomes polythènes de *Rhyncosciara angelae*; ces zones sont le siège d'une grande activité qui est peut-être en rapport avec le contrôle génétique du chromosome car elles incorporent également les acides aminés marqués.

BOND, CRONKITE, FLIEDNER et SCHORK <sup>(130)</sup> trouvent dans le sang périphérique des monocytes capables de faire la synthèse de l'ADN; ils se demandent s'il ne s'agit pas de cellules mésenchymateuses primitives capables de recoloniser les moëlles en cas de nécessité. CRONKITE et coll. <sup>(131)</sup> ont utilisé de la thymidine tritiée pour étudier le renouvellement des cellules blanches du sang et la cinétique de la multiplication cellulaire dans la moëlle.

HARRIS <sup>(132)</sup> a montré que la synthèse de l'ADN commence près du nucléole, ce qui confirme l'observation de FIRKET <sup>(127)</sup>. L'incorporation du tritium de la thymidine tritiée dans les oeufs en développement de la *Drosophila* est un phénomène discontinu, contrairement à l'incorporation du tritium de l'uridine tritiée ou de la glycine tritiée (KING et BURNETT, <sup>133</sup>); après la thymidine tritiée, les noyaux de quelques cellules, à l'exclusion du nucléole, sont marqués; après l'uridine tritiée, toutes les cellules sont marquées, mais la concentration du tritium va en décroissant du nucléole, au nucléoplasme et au cytoplasme; après la glycine tritiée, toutes les cellules sont uniformément marquées.

La beauté et la précision de ces autoradiographies où l'on peut voir, par exemple, que le tritium se trouve dans les chromosomes et non dans le suc nucléaire d'un fibroblaste de poulet en prophase (voir les très belles images de FIRKET, <sup>127</sup>), ont attiré l'attention des cytologistes sur le tritium. Ce radioisotope permet d'obtenir les activités spécifiques élevées nécessaires pour les travaux d'histoautoradiographie. Nous voyons là un champ d'application du tritium qui est en pleine expansion.

Les autoradiographies au tritium donnent des renseignements purement qualitatifs: elles permettent de reconnaître les structures tritiées, mais elles ne donnent pas la mesure de la quantité de tritium contenue dans ces structures. Le nombre de grains d'argent développés dans l'émulsion serait proportionnel à la quantité de tritium (c.-à-d. qu'il en serait une mesure relative) si la structure tritiée n'avait pas d'épaisseur et se trouvait au contact direct de l'émulsion (ou séparée par un mince écran d'épaisseur constante). Dans les cellules, le tritium se trouve dans des organites qui ont une épaisseur et qui peuvent ne pas être tout contre l'émulsion. L'absorption du rayonnement  $\beta$  du tritium par le milieu cellulaire n'est pas négligeable si on considère que  $1\text{ }\mu$  environ de cytoplasme est capable d'arrêter complètement la moitié des électrons de désintégration.

Dans les cultures de fibroblastes de poulet, il y a des noyaux presque sphériques et d'autres en forme d'ellipsoïdes plus ou moins aplatis. Si on suppose, en première approximation, qu'ils ont tous le même volume, l'inverse de leur surface est proportionnel à leur épaisseur. Dans les conditions où les cultures de FIKET ont été faites en présence de thymidine tritiée, les noyaux sont presque tous tangents à l'émulsion quand on fait

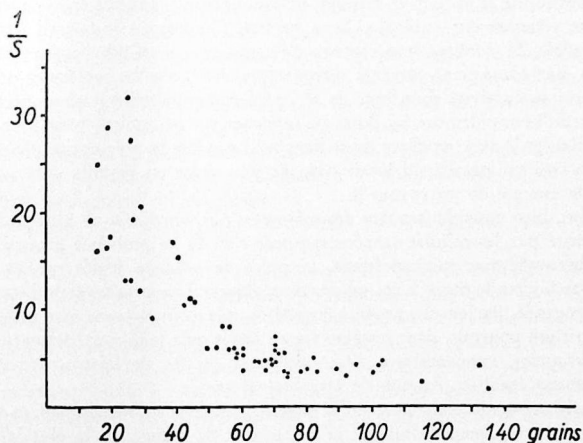


Figure 3: Fibroblastes de poulet cultivés en présence de thymidine tritiée. Nombre de grains d'argent au-dessus des noyaux en fonction de l'inverse de la surface de leur projection dans un plan parallèle au film autoradiographique (prise comme mesure de l'épaisseur du noyau).

l'autoradiographie. La figure 3 montre que le nombre de grains d'argent développés est statistiquement plus élevé au-dessus des noyaux aplatis qu'au-dessus des noyaux arrondis; l'allure générale de la courbe est, comme on doit s'y attendre, celle d'une courbe d'auto-absorption de rayons  $\beta$  (FIRKET <sup>127</sup>; VERLY, FIRKET et HUNEBELLE, <sup>128</sup>).

Il faut donc se méfier de l'impression que donne, de la distribution du tritium dans une cellule ou un tissu, un simple coup d'oeil sur un autoradiogramme. Il faudrait, pour chaque organite, compter les grains d'argent et appliquer un facteur de correction qui tiendrait compte de la forme de la structure analysée (dans laquelle la distribution du radioisotope est supposée homogène) et de l'épaisseur qui la sépare de l'émulsion radiographique. Nous trouvons ici un problème qui demande une solution urgente: la mesure relative (et absolue si on dispose d'un étalon) du tritium qui se trouve dans une cellule ou dans une portion de cellule.

#### D. Utilisation du tritium en clinique

Le tritium, sous la forme d'eau tritiée est utilisé pour mesurer l'eau totale de l'organisme.

La possibilité d'utiliser le tritium en radiothérapie anticancéreuse mérite d'être sérieusement explorée. Dans ce but, l'hydrogène radioactif réunit une série de qualités importantes: c'est un isotope de l'hydrogène et il peut, par conséquent, servir à marquer presque toutes les molécules organiques; son activité spécifique de 30 curies par milliatome-gramme permet d'atteindre rapidement les doses de rayonnement nécessaires pour tuer les cellules, et le prix modique du tritium rend possible la préparation de produits très radioactifs; la localisation de son action est permise grâce à la faible énergie de ses rayons  $\beta$ .

Il faut, bien entendu, trouver des substances qui sont fixées en plus grande quantité par les cellules cancéreuses; mais c'est là un problème général de la chimiothérapie anticancéreuse. L'emploi de produits tritiés permet de ne pas limiter le choix à des substances toxiques; n'importe quelle substance hydrogénée, par ex. un produit normal du métabolisme, peut être utilisée. Le tritium pourrait, dans certains cas, ne servir qu'à renforcer l'action d'un médicament anticancéreux. Des perfusions locales devraient permettre de mieux localiser l'action de la substance tritiée.

Le tritium est le seul émetteur de rayons  $\beta$  capable de réaliser une radiothérapie strictement cellulaire: la radiation  $\beta$  du tritium est la plus faible qui soit connue, sa pénétration moyenne dans un milieu de densité unitaire est de 1  $\mu$ , c.-à-d. d'un ordre de grandeur inférieur aux dimensions d'une cellule. Les désintégrations du tritium irradient uniquement la cellule qui contient le composé tritié sans avoir aucun effet nocif sur les cellules

voisines. Cette action extrêmement délicate s'oppose à la brutalité des émetteurs  $\beta$  utilisés actuellement en radiothérapie comme le  $P^{32}$  et le  $I^{131}$  dont les rayonnements sont beaucoup plus pénétrants (pénétration moyenne: 2 mm pour  $P^{32}$ ) et qui agissent à l'échelle de l'organe.

Des travaux effectués avec de la thymidine tritiée indiquent la possibilité d'utiliser le tritium pour tuer plus ou moins spécifiquement certaines cellules; le tritium de la thymidine est incorporé seulement dans l'ADN des cellules qui se préparent à se diviser (FIRKET et VERLY, <sup>126, 127</sup>). PAINTER, DREW et HUGHES (<sup>134</sup>) ont montré que la thymidine tritiée est capable d'inhiber *in vitro* la croissance de cellules HeLa. Dans une population mixte, la thymidine tritiée agit plus fortement sur les cellules qui se multiplient rapidement comme le montrent très bien les expériences de LUBIN (<sup>135</sup>) d'isolement de mutants bactériens: dans un milieu minimum qui contient de la thymidine tritiée, les cellules de type sauvage se multiplient et prennent du tritium contrairement aux mutants; après avoir été replacées dans un milieu non marqué, les bactéries sont tenues à basse température pour arrêter toute division; les cellules du type sauvage qui contiennent du tritium sont irradiées et tuées tandis que les mutants survivent.

Pour estimer si le tritium peut servir pour tuer une cellule, on a fait le calcul suivant: pour délivrer 500 rep à un noyau de  $1.000 \mu^3$ , il faut 4.000 désintégrations de tritium; avant de se diviser, une cellule de mammifère fixe  $5 \times 10^{-12}$  millimole de thymidine; pour délivrer les 500 rep en 1 jour, il faut que l'activité spécifique de la thymidine dans le pool cellulaire soit de 0,3 curie par millimole.

L'existence dans l'organisme de tissus normaux dont les cellules se multiplient très rapidement, rend problématique l'emploi de thymidine tritiée comme médicament anticancéreux.

Des études avec du myleran tritié ont été entreprises dans notre laboratoire.

L'utilisation du tritium pour tuer des cellules pose le problème de la relation dose-effet. Il est d'ailleurs vraisemblable que, pour le tritium, la dose létale cellulaire dépende de la localisation du radioisotope dans la cellule. Si les autoradiographies, grâce à leur exquise précision (voir plus haut), permettent de reconnaître cette localisation, elles ne peuvent pas, actuellement, servir à mesurer la quantité de tritium qui se trouve dans la cellule. Nous avons déjà signalé qu'il est urgent de trouver un moyen original pour réparer cette lacune.

La dose de radiations reçue par la cellule dépend de la quantité de tritium prise au moment de l'administration du produit tritié, mais aussi du *turnover* cellulaire de ce tritium. Si ce *turnover* est nul comme dans le cas du tritium de la thymidine fixé dans l'ADN (seule la dilution peut

jouer si la cellule reste capable de se multiplier), une loi du tout ou rien entre en jeu: la cellule qui prend du tritium, meurt, celle qui n'en prend pas, survit; pour avoir un effet différent sur deux populations, il faut que beaucoup de cellules d'une espèce et très peu de l'autre prennent le produit marqué (cf. les expériences de LUBIN, <sup>135</sup>). Mais le plus souvent les produits tritiés disparaissent progressivement de la cellule; pour qu'il y ait action différentielle, il faut qu'une espèce cellulaire se caractérise soit par une prise plus considérable du produit tritié, soit par un *turnover* plus lent. Les intégrales tritium-heures devront être calculées et choisies de manière à tuer la cellule cancéreuse tout en lésant le moins possible la cellule normale.

#### 4 — LES DANGERS DU TRITIUM

A cause de la très faible énergie de son rayonnement  $\beta$ , le tritium n'est pas un danger tant qu'il reste en dehors du corps humain. La situation change évidemment quand il est absorbé.

La question de la toxicité du tritium fixé dans les tissus n'est pas simple; comme pour tous les radioisotopes, elle dépend de la nature du composé tritié qui est absorbé, de la localisation de ce produit ou de ses métabolites dans des organes radiosensibles et du *turnover* de la substance-mère et des métabolites dans ces organes. La quantité de radioactivité absorbée (exprimée en curies) est évidemment un facteur primordial, mais elle ne doit pas faire perdre de vue l'importance de la radioactivité spécifique: très souvent, le pourcentage de radioactivité retenu dans l'organisme sera d'autant plus élevé que l'activité spécifique sera plus grande (le pourcentage utilisé diminue avec la quantité de produit administré).

Pour le tritium, la localisation doit être considérée non seulement à l'échelle des organes et des tissus, mais aussi à l'intérieur de la cellule parce que la longueur de la trajectoire de ses électrons est petite par rapport aux dimensions cellulaires. Par exemple, l'effet mutagène de la thymidine tritiée doit être beaucoup plus grand que celui calculé d'après l'hypothèse d'une distribution homogène du radioisotope dans la cellule parce que le produit est concentré et son action radiologique localisée dans les noyaux des cellules qui se divisent.

On ne dispose actuellement de données que sur la toxicité de l'hydrogène tritié et de l'eau tritiée (PINSON et coll. <sup>89, 136, 137, 138</sup>).

En ce qui concerne l'hydrogène tritié inhalé, 0,05% est oxydé en eau (PINSON et ANDERSON, <sup>89</sup>). Par contre le tritium inhalé sous la forme de vapeurs d'eau, est retenu quantitativement dans l'organisme (PINSON, ANDERSON et LOTZ, <sup>137</sup>). Les vapeurs d'eau tritiée pénétrèrent aussi dans

l'organisme à travers la peau; cette voie pourrait être aussi importante que la voie respiratoire (PINSON, ANDERSON et LOTZ <sup>138</sup>).

L'eau est distribuée d'une manière homogène dans l'organisme et son renouvellement est rapide; sa demi-vie biologique est chez l'homme de 9 à 14 jours (1 à 2 jours chez la souris, 3 à 5 jours chez le rat). Chez la souris, 0,5 à 1% de l'eau absorbée est incorporée par le métabolisme dans des molécules organiques, principalement dans les organes à métabolisme actif. Ces composés tritiés néoformés peuvent chez la souris être grossièrement divisés en deux groupes d'importance à peu près égale; ceux du premier groupe possèdent une demi-vie de 9 jours environ, et ceux du deuxième une demi-vie de 90 jours (THOMPSON, <sup>83</sup>).

En augmentant l'absorption de liquide, on diminue la demi-vie de l'eau et, en même temps, la toxicité de l'eau tritiée qui aurait pu pénétrer dans l'organisme. PINSON et ANDERSON (<sup>89</sup>) citent le cas d'un homme chez qui la demi-vie de l'eau avait pu être réduite à 2,5 jours.

La demi-vie physique du tritium ne doit pas être considérée parce que les demi-vies biologiques des substances tritiées sont beaucoup plus courtes. D'autre part, la radiation du tritium étant peu énergétique (1 électron de tritium produit en moyenne 150 paires d'ions seulement), une quantité donnée de radioactivité exprimée en curies, distribuée d'une manière uniforme dans le corps, a un faible effet biologique.

La LD-50 (30 jours) dose létale en 30 jours pour 50% des individus), après une seule injection d'eau tritiée, est de 1 millicurie par gramme chez la souris (BRUES, STROUD et RIETZ, <sup>139</sup>). La dose relative est plus faible pour l'homme où le *turnover* de l'eau et des molécules marquées par le métabolisme est plus lent, de l'ordre de 10 curies pour un homme de 70 Kg.

La quantité maximum de tritium qui peut, sans dommage, se trouver continuellement dans le corps d'un homme de 70 Kg, est de 10 millicuries; cette quantité donne une irradiation hebdomadaire de 0,3 rep (<sup>140</sup>). On a récemment ramené la limite tolérable à 1 mC pour un homme de 70 Kg (<sup>141</sup>) (0,1 rep par semaine dans les tissus hydratés qui représentent la moitié du poids du corps; énergie moyenne  $\times$  coefficient d'efficacité biologique  $\times$  facteur de non uniformité = 10 KeV).

La faiblesse du rayonnement du tritium rend difficile sa détection dans l'atmosphère des laboratoires. On peut évacuer une chambre à ionisation, puis la remplir avec l'air ambiant (voir par ex. ZIEGLER et SCHWEBEL, <sup>142</sup>), mais le procédé a le désavantage d'être discontinu. EUTSLER et coll. (<sup>143</sup>) font circuler l'air continuellement à travers la chambre et ont ainsi une mesure continue; l'appareil est muni d'un dispositif d'alarme.

On doit analyser régulièrement les urines des personnes qui manipulent de grandes quantités de tritium. Si le tritium se trouve exclusivement sous la

forme d'eau dans l'organisme, la dose tolérable doit rester au-dessous de  $2 \times 10^{-7}$  curie par ml <sup>(140)</sup> ou 10 fois moins <sup>(141)</sup>. Ces mesures se font aisément par scintillation liquide.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) M. L. EIDINOFF et J. E. KNOLL; *Science*, 112, 250 (1950).
- (2) T. E. BANKS, J. C. CRAWHALL et D. G. SMYTH; *Biochem. J.*, 64, 411 (1956).
- (3) W. G. VERLY, S. BRICTEUX-GRÉGOIRE, G. KOCH et E. DEMEY; 2ème Conf. internat. Genève, P/121 (1958).
- (4) E. DEMEY et W. G. VERLY; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 66, 62 (1958).
- (5) M. WINAND; Communication personnelle.
- (6) W. E. KISIELESKI et F. SMETANA; *Atompraxis*, 4, Heft 7/8 (1958).
- (7) R. F. GLASCOCK; *Isotopic gas analysis for biochemists*, Academic Press, New York (1954).
- (8) M. L. EIDINOFF dans (54).
- (9) W. G. VERLY; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 64, 402 (1956).
- (10) J. GRAFF et D. RITTENBERG; *Anal. Chem.*, 24, 878 (1952).
- (11) M. GRENON et R. VIALARD; *J. Chim. Phys.*, 49, 623 (1952).
- (12) G. KOCH; Thèse de doctorat, Liège (1958).
- (13) P. A. CICCARONE, G. THOMAS et W. G. VERLY; *Nukleonik*, 1 (9), 329 (1959).
- (14) K. E. WILZBACH, L. KAPLAN et W. G. BROWN; *Science*, 118, 522 (1953).
- (15) D. F. WHITE, I. G. CAMPBELL et P. R. PAYNE; *Nature*, 166, 628 (1950).
- (16) C. V. ROBINSON; *Rev. Sci. Instruments*, 22, 353 (1951).
- (17) R. F. GLASCOCK; *Nucleonics*, 9 (5), 28 (1951).
- (18) R. F. GLASCOCK; *Biochem. J.*, 52, 699 (1952).
- (19) M. W. BIGGS, D. KRITCHEVSKY et M. R. KIRK; *Anal. Chem.*, 24, 223 (1952).
- (20) K. E. WILZBACH, A. R. VAN DYKEN et L. KAPLAN; *Anal. Chem.*, 26, 880 (1954).
- (21) W. G. VERLY, S. BRICTEUX-GRÉGOIRE, G. KOCH et G. ESPREUX; *Bull. Soc. chim. Belg.*, 64, 491 (1955).
- (22) W. BERNSTEIN et R. BALLENTINE; *Rev. Sci. Instruments*, 21, 158 (1950).
- (23) W. G. VERLY, G. HUNEBELLE et G. THOMAS; Centre Belge d'étude de l'énergie nucléaire, R. 1468 (1958) et *Nukleonik*, 1 (9), 325 (1959).
- (24) E. C. FARMER et I. A. BERSTEIN; *Science*, 117, 279 (1953).
- (25) F. N. HAYES et R. G. GOULD; *Science*, 117, 480 (1953).
- (26) C. G. BELL, Jr. et F. N. HAYES; *Liquid scintillation counting*, Pergamon Press, Londres (1958).

- (27) M. FURST, H. KALLMANN et F. H. BROWN; *Nucleonics*, 13 (4), 58 (1955).
- (28) W. H. LANGHAM, W. J. EVERSOLE, F. N. HAYES et T. T. TRUJILLO; *J. Lab. Clin. Med.*, 47, 819 (1956).
- (29) R. J. HERBERG; *Science*, 128, 199 (1958).
- (30) W. G. VERLY et J. DULCINO; non publié.
- (31) M. VAUGHAN, D. STEINBERG et J. LOGAN; *Science*, 126, 446 (1957).
- (32) D. S. KINNORY, E. L. KANABROCKI, J. GRECO, R. L. VEATCH, E. KAPLAN et Y. T. OESTER, dans (26), p. 223.
- (33) B. L. FUNT; *Nucleonics*, 14 (8), 83 (1956).
- (34) C. G. WHITE et S. HEFT; *Nucleonics*, 14 (10), 46 (1956).
- (35) B. L. FUNT et A. HETHERINGTON; *Science*, 129, 1429 (1959).
- (36) J. C. ROUCAYROL, E. OBERHAUSEN et R. SCHUBLER; UNESCO/NS/RIC/6 (1958).
- (37) A. T. WILSON; 2ème Conf. internat. Genève, P/1506 (1958).
- (38) M. L. EIDINOFF, H. C. REILLY, J. E. KNOLL et D. H. MARRIAN; *J. Biol. Chem.*, 199, 511 (1952).
- (39) P. J. AYRES, W. H. PEARLMAN, J. F. TAIT et A. S. TAIT; *Biochem. J.*, 70, 230 (1958).
- (40) J. C. CRAWHALL, J. D. HAWKINS et D. G. SMYTH; *Biochem. J.*, 69, 286 (1958).
- (41) R. F. GLASCOCK et L. R. REINIUS; Radioisotope Conference, Oxford, vol. I, p. 262 (1954).
- (42) W. H. PEARLMAN; *Biochem. J.*, 66, 17 (1957).
- (43) P. A. OSINSKI et M. P. PESESSE; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 66, 440 (1958).
- (44) V. J. O'DONNELL et W. H. PEARLMAN; *Biochem. J.*, 69, 38P (1958).
- (45) E. H. LA BROSSE, J. AXELROD et S. S. KETY; *Science*, 128, 593 (1958).
- (46) G. KOCH; non publié.
- (47) G. KOCH, W. G. VERLY et Z. M. BACQ; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 67, 117 (1959).
- (48) G. KOCH; *Bull. Soc. chim. Belg.*, 68, 59 (1959).
- (49) M. WINAND, S. BRICTEUX-GRÉGOIRE et W. G. VERLY; non publié.
- (50) J. C. CRAWHALL et D. G. SMYTH; *Biochem. J.*, 69, 280 (1958).
- (51) A. TORSTEN; *Nature*, 177, 379 (1956).
- (52) R. F. GLASCOCK et L. R. REINIUS; *Biochem. J.*, 62, 529 (1956).
- (53) N. H. SMITH, K. E. WILZBACH et W. G. BROWN; *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1033 (1955).
- (54) W. G. VERLY, J. R. RACHELE, V. DU VIGNEAUD, M. L. EIDINOFF et J. E. KNOLL; *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 5944 (1952).
- (55) W. G. VERLY; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 64, 350 (1956).
- (56) W. G. VERLY; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 64, 360 (1956).
- (57) W. G. VERLY; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 64, 365 (1956).
- (58) P. AVIVI, S. A. SIMPSON, J. F. TAIT et J. K. WHITEHEAD; Radioisotope Conference, Oxford, vol. I, p. 313 (1954).
- (59) H. R. V. ARNSTEIN et J. C. CRAWHALL; *Biochem. J.*, 67, 180 (1957).

- (60) D. K. FUKUSHIMA et T. F. GALLAGHER; *J. Biol. Chem.*, **198**, 861 (1952).
- (61) D. K. FUKUSHIMA et T. F. GALLAGHER; *J. Biol. Chem.*, **198**, 871 (1952).
- (62) D. K. FUKUSHIMA, T. H. KRITCHEVSKY, M. L. EIDINOFF et T. F. GALLAGHER; *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 487 (1952).
- (63) M. L. EIDINOFF et J. E. KNOLL; *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1992 (1953).
- (64) W. L. HUGHES; 2ème Conf. internat. Genève, P/842 (1958).
- (65) W. L. HUGHES; dans Symposium on tritium in tracer applications, New York, p. 38 (1957).
- (66) W. G. VERLY et G. HUNEBELLE; *Bull. Soc. chim. Belg.*, **66**, 640 (1957).
- (67) M. L. EIDINOFF, L. CHEONG et M. A. RICH; *Science*, **129**, 1550 (1959).
- (68) D. KRITCHEVSKY, R. F. McCANDLESS, J. E. KNOLL et M. L. EIDINOFF; *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6655 (1955).
- (69) F. S. ROWLAND, C. N. TURTON et R. WOLFGANG; Abstr. ACS 126ème réunion, 57 R (sept. 1954).
- (70) R. WOLFGANG, F. S. ROWLAND et C. N. TURTON; *Science*, **121**, 715 (1955).
- (71) F. S. ROWLAND, C. N. TURTON et R. WOLFGANG; *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2354 (1956).
- (72) F. S. ROWLAND et R. WOLFGANG; *Nucleonics*, **14** (8), 58 (1956).
- (73) R. WOLFGANG, TH. PRATT et F. S. ROWLAND; *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5132 (1956).
- (74) K. E. WILZBACH; *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1013 (1957).
- (75) R. W. AHRENS, M. C. SAUER et J. E. WILLARD; *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3285 (1957).
- (76) K. E. WILZBACH; dans Symposium on tritium in tracer applications, New York, p. 3 (1957).
- (77) D. STEINBERG, M. VAUGHAN, C. B. ANFINSEN et J. GORRY; *Science*, **126**, 447 (1957).
- (78) C. v. HOLT, I. NOLTE et L. v. HOLT; 2ème Conf. intern. Genève, P/979 (1958).
- (79) C. T. O. FONG, I. L. SCHWARTZ, E. A. POPENOE, L. SILVER et M. A. SCHOESSLER; *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2592 (1959).
- (80) R. M. LEMMON, B. M. TOLBERT, W. STROHMEIER et I. M. WITTE-MORE; *Science*, **129**, 1740 (1959).
- (81) L. WRIGHT et S. WELLER; *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5948 (1954).
- (82) S. GURIN et A. M. DELLUVA; *J. Biol. Chem.*, **170**, 545 (1947).
- (83) R. C. THOMPSON; *J. Biol. Chem.*, **197**, 81 (1952).
- (84) R. C. THOMPSON; *J. Biol. Chem.*, **200**, 731 (1953).
- (85) R. C. THOMPSON et J. E. BALLOU; *J. Biol. Chem.*, **208**, 883 (1954).
- (86) R. C. THOMPSON et J. E. BALLOU; *J. Biol. Chem.*, **223**, 795 (1956).
- (87) R. C. THOMPSON; *Nucleonics*, **12** (9), 31 (1954).

- (88) K. M. BOGDANOV, M. I. SHALNOV et J. M. STUCKENBERG; 2<sup>ème</sup> Conf. intern. Genève, P/2070 (1958).
- (89) E. A. PINSON et E. C. ANDERSON; AECU-937 (nov. 1950).
- (90) G. N. SMITH, R. J. EMERSON, L. A. TEMPLE et T. N. GALBRAITH; *Arch. Biochem. Biophys.*, 46, 22 (1953).
- (91) T. H. NORRIS, S. RUBEN et M. B. ALLEN; *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 3037 (1942).
- (92) E. B. KELLER, R. A. BOISSONNAS et V. DU VIGNEAUD; *J. Biol. Chem.*, 183, 627 (1950).
- (93) W. G. VERLY; *Arch. intern. physiol. bioch.*, 64, 372 (1956).
- (94) D. RITTENBERG et K. BLOCH; *J. Biol. Chem.*, 160, 417 (1945).
- (95) M. BIGGS et D. KRITCHEVSKY; *Arch. Biochem.*, 36, 430 (1952).
- (96) S. BERGSTRÖM et S. LINDSTEDT; *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 556 (1956).
- (97) W. H. PEARLMAN; *Biochem. J.*, 67, 1 (1957).
- (98) R. F. GLASCOCK, W. G. DUNCOMBE et L. R. REINIUS; *Biochem. J.*, 62, 535 (1956).
- (99) J. AXELROD; *Science* 126, 400 (1957).
- (100) H. WEIL-MALHERBE, J. AXELROD et R. TOMCHICK; *Science*, 129, 1226 (1959).
- (101) R. F. DAWSON, D. R. CHRISTMAN, R. C. ANDERSON, M. L. SOLT, A. F. D'ADAMO et U. WEISS; *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 2645 (1956).
- (102) J. F. SNELL; dans Symposium on tritium in tracer applications, New York, p. 23 (1957).
- (103) A. TORSTEN; *Acta Radiologica* (suppl. 142) (1956).
- (104) J. L. SPRATT et G. T. OKITA; 2<sup>ème</sup> Conf. intern. Genève, P/848 (1958).
- (105) M. B. THORN; *Biochem. J.*, 49, 602 (1951).
- (106) V. DU VIGNEAUD et W. G. VERLY; *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1049 (1950).
- (107) V. DU VIGNEAUD, W. G. VERLY, J. E. WILSON, J. R. RACHELE, C. RESSLER et J. M. KINNEY; *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2782 (1951).
- (108) J. R. RACHELE, E. J. KUCHINSKAS, J. E. KNOLL et M. L. EIDINOFF; *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 4342 (1954).
- (109) W. G. VERLY; 3<sup>ème</sup> Congrès intern. biochim., Bruxelles, Conférence et Rapports, p. 240 (1955).
- (110) W. G. VERLY; *Rev. ferm. et ind. alim.*, 11, 1 (1956).
- (111) J. R. RACHELE, E. J. KUCHINSKAS, F. H. KRATZER et V. DU VIGNEAUD; *J. Biol. Chem.*, 215, 593 (1955).
- (112) D. WEINBERGER et J. W. PORTER; *Arch. Biochem. Biophys.*, 50, 160 (1954).
- (113) R. F. GLASCOCK et W. G. DUNCOMBE; *Biochem. J.*, 58, 440 (1954).
- (114) M. L. EIDINOFF, G. C. PERRI, J. E. KNOLL, B. J. MARANO et J. ARNHEIM; *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 248 (1953).
- (115) R. C. THOMPSON et J. E. BALLOU; *J. Biol. Chem.*, 206, 101 (1954).

- (116) voir M. L. EIDINOFF; dans Symposium on tritium in tracer applications, New York, p. 34 (1957).
- (117) W. A. HUNZINGER, G. RITZEL et H. STAUB; *Helv. Chim. Acta*, **39**, 131 (1956).
- (118) G. RITZEL, W. A. HUNZINGER et H. STAUB; *Experientia*, **14**, 205 (1958).
- (119) G. A. BOYD; *Autoradiography in Biology and Medicine*, Academic Press, New York (1955).
- (120) D. E. BEISCHER; *Nucleonics*, **11** (12), 24 (1953).
- (121) M. L. EIDINOFF, P. J. FITZGERALD, E. B. SIMMEL et J. E. KNOLL; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **77**, 225 (1951).
- (122) P. J. FITZGERALD, M. L. EIDINOFF, J. E. KNOLL et E. B. SIMMEL; *Science*, **114**, 494 (1951).
- (123) C. CHAPMAN-ANDRESEN; *Exptl. Cell Research*, **4**, 239 (1953).
- (124) A. FICQ et C. PAVAN; *Nature*, **180**, 983 (1957).
- (125) J. H. TAYLOR, P. S. WOODS et W. L. HUGHES; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **43**, 122 (1957).
- (126) H. FIRKET et W. G. VERLY; *Nature*, **181**, 274 (1958).
- (127) H. FIRKET; Recherches sur la synthèse des acides désoxyribonucléiques et la préparation à la mitose dans des cellules cultivées 'in vitro'; Vaillant Carmanne, Liège (1957).
- (128) W. G. VERLY, H. FIRKET et G. HUNEBELLE; 2ème Conf. intern. Genève, P/323 (1958).
- (129) R. B. PAINTER et R. M. DREW; *Laboratory Investigations*, **8**, 278 (1959).
- (130) V. P. BOND, E. P. CRONKITE, T. M. FLIEDNER et P. SCHORK; *Science*, **128**, 202 (1958).
- (131) E. P. CRONKITE, T. M. FLIEDNER, V. P. BOND, J. R. RUBINI, G. BRECHER et H. QUASTLER; 2ème Conf. intern. Genève, P/840 (1958).
- (132) H. HARRIS; *Biochem. J.*, **72**, 54 (1959).
- (133) R. C. KING et R. G. BURNETT; *Science*, **129**, 1674 (1959).
- (134) R. B. PAINTER, R. M. DREW et W. L. HUGHES; *Science* **127**, 1244 (1958).
- (135) M. LUBIN; *Science*, **129**, 838 (1959).
- (136) E. A. PINSON et E. C. ANDERSON; LA-1218 (1951).
- (137) E. A. PINSON, E. C. ANDERSON et V. LOTZ; LA-1465 (1952).
- (138) E. A. PINSON, E. C. ANDERSON et V. LOTZ; LA-1466 (1952).
- (139) A. M. BRUES, A. N. STROUD et L. RIETZ; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **79**, 174 (1952).
- (140) Bureau of Standards; Handbook 52, p. 15.
- (141) National Committee of Radiological Protection, U.S.A. (1958).
- (142) C. A. ZIEGLER et A. SCHWEBEL; *Nucleonics*, **15** (1), 64 (1957).
- (143) B. C. EUTSLER, G. L. EVANS, R. D. HIEBERT, R. N. MITCHELL, M. C. ROBBINS et R. J. WATTS; *Nucleonics*, **14** (9), 114 (1956).

## TRITIUM: DOSAGE, PREPARATION OF LABELLED MOLECULES AND BIOLOGICAL APPLICATIONS.

### Summary

This review consists of four chapters, beginning with a survey on tritium counting and followed, in logical sequence, by methods used in tritium-labelling, tritium applications and safety aspects. It is based on a selection of recently-published literature and the author's own personal experience in the field.

The first chapter deals with the preparation of tritiated samples (solid, gaseous, liquid and solid solution) suitable for the various counting techniques discussed. References are given to approximately 40 articles, providing a fairly comprehensive picture of the methods used.

The difficulties of solid sample counting are examined and it is shown that, even with windowless Geiger or proportional flow-counters, the method is not suitable for precise quantitative determinations. The weak energy of beta-particles, because of self-absorption, necessitates the use of very thin samples, thus giving rise to further problems.

The author describes various methods for the preparation of gases (primarily hydrogen) for filling ionization chambers and gas-counters operating either in the Geiger or proportional region. The proportional gas-counter technique was the first technique giving results which permitted serious quantitative work with tritium.

For liquid samples, the only possible method is that of scintillation counting, where the sample must be incorporated, in soluble or insoluble form into the scintillator, the main constituents of which are toluene, xylene or dioxane. Light-quenching, permissible water concentration, gellification, suspensions and self-absorption problems are mentioned, together with incorporation of tritium samples into plastic scintillators during polymerization. Also mentioned is the technique of passing gaseous or liquid samples through cavities of plastic scintillators, and the auto-radiography of paper chromatograms: the former technique can be successfully used for continuous gas flows; the latter cannot be used for quantitative determinations.

In the chapter on the preparation of tritium-labelled compounds, brief mention is made of the character and stability of the hydrogen bond in various compounds, and descriptions are given of the methods of preparation and labelling of substances according to the principles involved. Examples are included of biological synthesis, but naturally more stress is placed on chemical and radiochemical methods, which are sub-divided into synthesis and exchange reactions. Surveys are made of almost all

tritium compounds reported in the scientific literature and related to biological systems. Details of the procedures are given where it is considered necessary, either on account of their complexity or for further illustration.

The section on chemical preparations commences with the hydrogenation of unsaturated hydrogen bond in the presence of appropriate catalysts, proceeds to more complicated synthesis, and includes the eventual application of tritium exchange: in particular, examples are given of tritium-labelled compounds of the groups of steroids, amino-acids, proteins and hormones, respectively. In the section covering exchange reactions, the author surveys "classical" exchange of tritium in the presence of catalysts, which has found application in labelling steroids and derivatives of nucleic acids. Recently-developed methods, particularly the recoil triton method and the WILZBACH method in which the compound to be labelled is simply exposed to tritium, are also discussed. The WILZBACH method was successfully used for compounds of very different structure. Typical substances are listed.

In the main section on tritium application, the author cites the works of several authors who used tritium to trace the fate of hydrogen atoms. However, he stresses its use as a tracer in the physiological processes of absorption, transfer, etc., which are not accompanied by molecular changes, or for studies of metabolism in which large parts of the molecule remain intact. In these cases the tritium is used to label the whole molecule.

Literature is presented on metabolic studies utilizing tritiated steroids and hormones, and brief mention is made concerning research on the absorption, transfer, and excretion of medicaments using tritium-labelling as a tool.

The phenomenon of isotopic selection is of considerable importance to the biologist, and it is pointed out that this phenomenon may lead to the exploration of fresh processes of biochemistry. The influence of isotopic effect on the rupture of the carbon-hydrogen bond is discussed in relation to the biosynthesis of choline. In the studies of the oxydation of methanol labelled with hydrogen isotopes, it is shown that the result depends not only on the isotope used but also on the manner in which the group labelled. In addition, it is clear that a double intermolecular labelling of the methyl group is not a guide to the level of oxidation reached by the methanol before its participation in the biosynthesis of the choline. In order to obtain this information on the mechanism of the bio-reaction, it would be necessary to use a double intramolecular labelling, where a single isotopic variety of a molecule containing two tracers is not liable to intramolecular selection.

At the cellular level tritium yields the most precise radiographs due to the low energy of its radiation. Autoradiography is able to detect the

tritium but it cannot identify the tritiated molecule; metabolic studies at the cytological level call for the use of relatively specific precursors. The author cites literature showing that tritium is a valuable tool in histoautoradiographical studies, due to its specific activity, and indicates that this application of tritium is being explored intensively. He points out, however, the imperfection in its use, namely that it yields only qualitative and not quantitative data.

He suggests the possibility of using tritium in anti-cancer radiotherapy pointing out its possible advantages: the localization of its action; as an isotope of hydrogen it can be used to label almost all organic molecules; its specific activity makes it possible to achieve rapidly the radiation dose required to kill cells; and its moderate price makes it feasible to prepare highly radioactive materials.

In the last section the dangers of tritium are briefly touched upon. It is pointed out that at the present time data are available only regarding the toxicity of tritiated hydrogen and tritiated water.

## TRITIUM: DOSAGE, PRÉPARATION DE MOLÉCULES MARQUÉES ET APPLICATIONS BIOLOGIQUES.

### Resumé

Cette monographie comprend quatre chapitres: le premier est une étude sur le comptage du tritium; il est suivi, dans l'ordre logique, d'exposés sur les méthodes employées pour le marquage du tritium, les applications du tritium et les problèmes de sécurité. La monographie est fondée sur une sélection des travaux publiés récemment et sur l'expérience que l'auteur a personnellement acquise dans ce domaine.

Le premier chapitre traite de la préparation d'échantillons au tritium (solides, gazeux, liquides, ainsi que d'échantillons solides en solution) convenant aux diverses techniques de comptage considérées. On s'y réfère à une quarantaine d'articles, donnant ainsi un tableau relativement complet des méthodes utilisées.

Il ressort d'un examen des difficultés de comptage des échantillons solides que, même si l'on recourt au compteur Geiger sans fenêtre ou à des compteurs proportionnels, la méthode ne se prête pas à une détermination quantitative précise. En raison de l'auto-absorption, la faible énergie des particules bêta exige l'emploi d'échantillons très minces, ce qui pose des problèmes additionnels.

L'auteur décrit diverses méthodes de préparation de gaz (notamment de l'hydrogène) utilisées pour remplir des chambres d'ionisation et des compteurs à gaz fonctionnant dans la même gamme que les compteurs Geiger ou que les compteurs proportionnels. La technique des compteurs à gaz proportionnels a été la première à donner des résultats permettant d'effectuer des travaux quantitatifs sérieux sur le tritium.

Pour les échantillons liquides, la seule méthode possible est celle des compteurs à scintillations où l'échantillon doit être inséré, sous une forme soluble ou insoluble, dans le scintillateur, dont les principaux éléments constitutifs sont le toluène, le xylène ou le dioxane. L'auteur mentionne les problèmes que posent l'affaiblissement des scintillations, la concentration admissible d'eau, la gélification, les produits en suspension et l'auto-absorption, ainsi que l'insertion pendant la polymérisation d'échantillons de tritium dans des scintillateurs plastiques. Il signale également la méthode qui consiste à envoyer des échantillons gazeux ou liquides à travers les cavités de scintillateurs plastiques, de même que l'auto-radiographie des chromatogrammes sur papier: la première de ces méthodes peut être appliquée avec succès aux flux continus de gaz, tandis que la deuxième ne saurait servir aux déterminations quantitatives.

Dans le chapitre relatif à la préparation de composés marqués au tritium, l'auteur mentionne brièvement la nature et la stabilité de l'hydrogène utilisé comme liant dans divers composés; il expose les méthodes de préparation et de marquage des substances d'après les principes en cause. Il donne des exemples de synthèse biologique, mais il insiste bien entendu sur les méthodes chimiques et radiochimiques, lesquelles se subdivisent en réactions de synthèse et réactions d'échange. Il étudie presque tous les composés de tritium dont il est question dans les ouvrages scientifiques traitant des systèmes biologiques. Des détails sur les procédures adoptées sont donnés chaque fois que cela est jugé nécessaire, que ce soit en raison de leur complexité ou aux fins de meilleure illustration.

Dans la partie relative aux préparations chimiques, l'auteur traite d'abord de l'hydrogénation du liant non saturé d'hydrogène en présence de catalyseurs appropriés; il passe ensuite aux synthèses plus compliquées et expose enfin l'application éventuelle de l'échange de tritium; il donne des exemples de composés marqués au tritium appartenant respectivement aux groupes des stéroïdes, des aminoacides, des protéines et des hormones. Dans la partie relative aux réactions d'échange, l'auteur passe en revue l'échange «classique» de tritium en présence de catalyseurs, qui a trouvé une application dans le marquage des stéroïdes et des dérivés d'acides nucléiques. Il expose également les méthodes récemment mises au point, notamment la méthode du triton de recul et la méthode de WILZBACH où le composé à marquer est simplement exposé à l'action du tritium. La

méthode de WILZBACH a été appliquée avec succès à des composés de structures très diverses. L'auteur énumère les différentes substances types.

Dans le chapitre consacré aux applications du tritium, l'auteur cite les travaux de plusieurs savants qui ont eu recours au tritium pour retracer le sort des atomes d'hydrogène. Il insiste cependant sur l'emploi du tritium comme indicateur dans les procédés physiologiques d'absorption, de transfert, etc., qui ne s'accompagnent d'aucune modification moléculaire, ou encore dans les études du métabolisme où des parties importantes de la molécule restent intactes. Dans ces cas, on se sert du tritium pour marquer l'ensemble de la molécule.

L'auteur cite des articles sur les études du métabolisme au moyen des stéroïdes et des hormones au tritium; il fait brièvement mention des recherches relatives à l'absorption, au transfert et à l'excrétion de produits médicaux, faites à l'aide de composés marqués au tritium.

Le phénomène de la sélection isotopique présente un intérêt considérable pour le biologiste; l'auteur fait ressortir que ce phénomène pourrait conduire à l'exploration de nouveaux procédés de biochimie. L'influence de l'effet isotopique sur la rupture du lien carbone-hydrogène est étudiée dans ses rapports avec la biosynthèse de la choline. Dans les études sur l'oxydation du méthanol marqué à l'aide d'isotopes de l'hydrogène, on montre que le résultat ne dépend pas seulement de l'isotope employé mais encore de la façon dont le groupe est marqué. En outre, il est évident qu'un marquage intermoléculaire double du groupe méthyle ne peut servir d'indice pour déterminer le degré d'oxydation que le méthanol atteint avant d'entrer en jeu dans la biosynthèse de la choline. Afin d'obtenir ce renseignement sur le mécanisme de la bioréaction, il faudrait recourir à un marquage intermoléculaire double dans tous les cas où une seule variété isotopique d'une molécule contenant deux indicateurs ne se prête pas à une sélection intramoléculaire.

En raison de la faible énergie de ses rayonnements, le tritium donne les radiographies les plus précises au niveau de la cellule.

L'auto-radiographie permet de déceler le tritium, mais non d'identifier la molécule au tritium; des études du métabolisme au niveau cytotologique exigent l'emploi de précurseurs relativement précis. L'auteur cite des travaux d'où il ressort qu'en raison de son activité spécifique le tritium constitue un moyen extrêmement utile dans les enquêtes histo-autoradiographiques; il indique que cette application du tritium fait l'objet d'études très poussées. Il fait cependant remarquer que le tritium permet d'obtenir seulement des données qualitatives, et non des données quantitatives.

L'auteur estime que l'on pourrait utiliser le tritium en radiothérapie anticancéreuse et il fait ressortir les avantages que présenterait cette méthode: on peut localiser l'action du tritium; étant un isotope de l'hydrogène, le

tritium peut servir à marquer presque toutes les molécules organiques; son activité spécifique permet d'atteindre rapidement la dose nécessaire pour tuer les cellules; enfin, son prix modique rend possible la préparation de matières hautement radioactives.

Dans le dernier chapitre, l'auteur fait brièvement mention des dangers que présente le tritium. Il fait ressortir que les seuls renseignements actuellement disponibles sont ceux qui portent sur la toxicité de l'hydrogène au tritium et de l'eau au tritium.

## **ТРИТИЙ: ДОЗИРОВКА, ПОДГОТОВКА МЕЧЕНЫХ МОЛЕКУЛ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

### **Резюме**

Настоящий обзор состоит из четырех глав. Первая из них посвящена изучению подсчета содержания трития; затем в логической последовательности приводятся методы, используемые при мечении тритием, излагаются вопросы применения трития и вопросы безопасности. В основу обзора положены некоторая недавно вышедшая литература и личный опыт автора в этой области.

В первой главе рассматривается подготовка насыщенных тритием образцов (твердых, газообразных, жидких и твердых растворов), годных для различных рассматриваемых методов счета. Упомянуты приблизительно 40 статей, которые дают довольно полную картину используемых методов.

Рассматриваются трудности счета твердых образцов и показано, что даже с применением счетчика Гейгера без окна или пропорционального поточного счетчика этот метод не годится для точного определения количеств. Слабая энергия бета-частиц из-за их самопоглощения заставляет применять очень тонкие образцы, что вызывает дополнительные проблемы.

Автор обзора описывает различные методы подготовки газов (главным образом водородного газа) для заполнения ионизационных камер и газовых счетчиков, которые работают в гейгеровском или пропорциональном диапазоне. Метод работы с пропорциональным газовым счетчиком явился первым методом, результаты которого позволили провести серьезный количественный анализ трития.

Для жидких образцов единственным возможным методом является сцинтилляционный счет там, где в сцинтиллятор должен быть введен образец в растворенной или нерастворенной форме, главными составными частями которого являются толуол, ксилол или диоксан. Упомянуты также проблемы как гашение, допустимая концентрация воды, желатирование, суспензии и самопоглощение, а также введение образцов трития в пластиковые сцинтилляторы во время полимеризации. Упомянется также метод прохождения газообразных или жидких образцов через резонаторы пластиковых сцинтилляторов и радио-автография хроматограм на бумаге: предыдущий метод может быть успешно применен для непрерывного потока газа; последний не может быть использован для определения количеств.

В главе о подготовке меченых тритием смесей кратко упоминается о природе и стабильности водородной связи в различных соединениях и дается описание методов предварительной обработки и мечення веществ согласно установленным законам. Приводятся примеры биологического синтеза, но, конечно, большее значение придается химическому и радиохимическому методам, которые подразделяются на синтез и реакции обмена. Делается обзор почти всех соединений трития, которые дает научная литература и которые относятся к биологическим системам. Там, где необходимо, приводятся подробности методов либо в связи с их сложностью, либо как дополнительная иллюстрация.

Раздел о химических препаратах начинается с гидрогенизации ненасыщенной водородной связи в присутствии соответствующих катализаторов, затем описывается более сложный синтез и говорится о возможном применении тритиевого обмена: в частности, приводятся примеры меченых тритием соединений групп стероидов, аминокислот, протеинов и гормонов. В разделе о реакциях обмена автор анализирует „классический“ обмен трития в присутствии катализаторов, который нашел применение в мечении стероидов и производных нуклеиновых кислот. В обзоре рассматриваются также недавно созданные методы, в частности метод тритона отдачи и метод Вилзбаха, при котором подвергается действию трития то соединение, которое должно быть мечено. Метод Вилзбаха был успешно применен для соединений различной структуры. В обзоре дается перечень типичных веществ.

В главном разделе о применении трития автор цитирует работы различных авторов, которые применяли тритий для того, чтобы проследить судьбу атомов водорода. Однако он подчеркивает значение трития для использования его в качестве меченого атома

в физиологических процессах поглощения, перехода из одного состояния в другое и т.д., которые не сопровождаются молекулярными изменениями, или для изучения обмена веществ, при котором большая часть молекулы остается нетронутой. В этих случаях тритий применяется для мечения всей молекулы.

В обзоре приводится литература по вопросу изучения обмена веществ с использованием насыщенных тритием стероидов и гормонов и кратко упоминаются научные исследования поглощения, перехода из одного состояния в другое и выделения лекарственных веществ с использованием трития в качестве меченого атома.

Явление избирательности поглощения изотопов представляет большое значение для биолога, и в обзоре указывается, что это явление может привести к изучению новых процессов биохимии. Влияние действия изотопов на разрыв связи углерода и водорода рассматривается в связи с биосинтезом холина. При изучении вопроса окисления метанола меченого изотопами водорода показано, что результат зависит не только от применяемого изотопа, но также от того, каким образом производится мечение этой группы. Кроме того, ясно, что двойное межмолекулярное мечение метиловой группы не является определителем уровня окисления, которого достигает метанол до его участия в биосинтезе холина. Для получения таких данных о механизме биореакции необходимо применить двойное межмолекулярное мечение там, где единственная изотопная разновидность молекулы, содержащей два меченых атома, не подвергается межмолекулярной избирательности.

В клеточной структуре тритий дает наиболее точную рентгенограмму вследствие его малой радиации. С помощью радиоавтографии можно обнаружить тритий, но нельзя обнаружить насыщенную тритием молекулу; изучение обмена веществ путем изучения клеточного состава требует применения сравнительно конкретных первичных частиц. Автор цитирует литературу, в которой показано, что тритий является важным инструментом в гистологическо-радиоавтографических исследованиях вследствие его специфической активности, и указывается, что это применение трития усиленно изучается. Вместе с тем указывается на то, что он имеет недостатки, а именно тритий дает только качественные, но не количественные данные.

Автор предлагает использовать тритий в лечении рака путем облучения, указывая на его возможное преимущество: локализовывание его действия; в качестве изотопа водорода он

может быть использован для мечения почти всех органических молекул; его специфическая активность дает возможность достичь быстро такой дозы облучения, которая требуется для уничтожения клеток; и его стоимость в настоящее время дает возможность получать высокоактивные материалы.

В последнем разделе кратко описывается опасность, которую несет с собой тритий. Указывается также, что в настоящее время имеются данные только в отношении токсичности насыщенного тритием водорода и насыщенной тритием воды.

## TRITIO: DOSIFICACIÓN, PREPARACIÓN DE MOLÉCULAS MARCADAS Y APLICACIONES BIOLÓGICAS.

### Resumen

La presente monografía está dividida en cuatro capítulos; en el primero, el autor pasa en revista a los procedimientos de recuento del tritio y en los siguientes, examina, siguiendo el orden lógico, los métodos utilizados para marcar con tritio, las aplicaciones de este indicador radiactivo y los problemas de seguridad que su empleo plantea. El autor basa su estudio en los trabajos recientemente publicados y en su propia experiencia práctica.

El primer capítulo está dedicado a la preparación de las muestras tritiadas (sólidas, gaseosas, o en forma de soluciones líquidas y sólidas) más adecuadas para la aplicación de las diferentes técnicas de recuento. Se hace referencia a unos 40 artículos que, en conjunto, ofrecen una idea panorámica de los procedimientos experimentales utilizados.

El recuento de las muestras sólidas presenta dificultades y el autor demuestra que, aun cuando se utilicen contadores Geiger sin ventana o contadores proporcionales de flujo gaseoso, este método no permite realizar determinaciones cuantitativas de gran precisión. Debido a la baja energía de las partículas beta emitidas por el tritio, es necesario emplear muestras muy delgadas a fin de disminuir la autoabsorción, lo que plantea nuevos problemas.

El autor describe diversos métodos de preparación de los gases (especialmente hidrógeno) utilizados para llenar las cámaras de ionización y los contadores de gas que se emplean en la zona de Geiger y en la región de proporcionalidad. El recuento de muestras gaseosas mediante contadores

proporcionales constituyó el primer procedimiento técnico cuyos resultados han permitido iniciar trabajos serios de determinación cuantitativa del tritio.

El recuento por centelleo representa el único método aplicable a las muestras líquidas; éstas deben incorporarse en forma soluble o insoluble en el centelleador, cuyo constituyente principal es el tolueno, el xilol o el dioxano. Se mencionan los problemas de extinción de la luminiscencia, concentración admisible de agua, gelificación, obtención de suspensiones y autoabsorción, así como la incorporación de muestras de tritio en los centelleadores plásticos durante la polimerización. También se describe la técnica consistente en hacer pasar muestras gaseosas o líquidas a través de cavidades practicadas en los centelleadores plásticos, y la autoradiografía del registro cromatográfico. El primer procedimiento puede ser utilizado con éxito cuando se trata de corrientes gaseosas ininterrumpidas, mientras que el último no se presta para realizar determinaciones cuantitativas.

En el capítulo referente a la preparación de compuestos marcados con tritio, el autor menciona brevemente las características y estabilidad del enlace de hidrógeno en varios compuestos y describe los métodos de preparación y marcado de distintas sustancias. Si bien cita ejemplos de síntesis biológicas, examina con más detalle los métodos químicos y radioquímicos, que se basan en reacciones de síntesis y de intercambio. Se estudian casi todos los compuestos del tritio de interés biológico mencionados en las publicaciones científicas. En los casos en que lo considera necesario, debido a su complejidad o para ofrecer una explicación más completa, el autor da detalles acerca de los procedimientos experimentales.

La sección sobre preparados químicos comienza con la hidrogenación de los enlaces de hidrógeno no saturados en presencia de catalizadores adecuados, y prosigue con la descripción de síntesis más complicadas, incluyendo las posibles aplicaciones del intercambio del tritio: se dan ejemplos del marcado de compuestos pertenecientes al grupo de los esteroides, aminoácidos, proteínas y hormonas. En esta sección, que abarca las reacciones de intercambio, el autor pasa revista al intercambio «clásico» del tritio en presencia de catalizadores, que se utiliza para marcar esteroides y derivados de los ácidos nucleicos. También estudia algunos métodos nuevos y, especialmente, el de tritones de retroceso y el método de WILZBACH, en los que el compuesto que se desea marcar se pone simplemente en presencia de tritio. El método de WILZBACH se ha aplicado con éxito a compuestos de estructura muy diferente. En el trabajo figura una lista de sustancias típicas.

En la sección principal sobre aplicaciones del tritio, el autor cita los trabajos de varios especialistas que han utilizado el tritio para estudiar

el camino seguido por los átomos del hidrógeno. Sin embargo, dedica especial atención, a sus aplicaciones como trazador en los procesos fisiológicos de absorción transferencia, etc., que no implican alteraciones de la estructura molecular o en los estudios metabólicos en los que una parte considerable de la molécula permanece intacta. En estos casos, el tritio se utiliza para marcar toda la molécula.

Se hace referencia a documentos sobre estudios metabólicos en que se emplean esteroides y hormonas tritiadas, y se mencionan brevemente las investigaciones sobre absorción, transferencia y excreción de medicamentos, llevadas a cabo con ayuda del tritio en calidad de trazador radiactivo.

El fenómeno de selección isotópica reviste considerable importancia para el biólogo, y el autor señala que este fenómeno permitirá sin duda explorar nuevos procesos bioquímicos. Analiza la influencia del efecto isotópico en la ruptura del enlace carbono-hidrógeno, en relación con la biosíntesis de la colina. En los estudios sobre oxidación del metanol marcado con isótopos del hidrógeno, demuestra que el resultado depende no solamente del isótopo utilizado, sino también de la manera de marcar el grupo metilo. Además, es evidente que un marcado intermolecular doble del grupo metilo no permite apreciar el grado de oxidación del metanol antes de que intervenga en la biosíntesis de la colina. Para poder obtener este tipo de información sobre el mecanismo de la biorreacción, sería preciso recurrir a un marcado intramolecular doble en los casos en que una sola variedad isotópica de una molécula que contenga dos indicadores radiactivos no se preste a la selección intramolecular.

Al nivel de las células, el tritio proporciona radiografías de alta precisión debido a la reducida energía de la radiación que emite. La autorradiografía permite identificar el tritio, pero no la molécula tritiada ;en los estudios sobre el metabolismo celular. es necesario utilizar precursores relativamente específicos. El autor menciona estudios que demuestran que el tritio constituye un medio auxiliar de valor en los estudios histoautorradiográficos, debido a su gran actividad específica e indica que estas utilizaciones del tritio se están explorando minuciosamente. Señala sin embargo que esta aplicación adolece de una limitación, a saber, que proporciona información cualitativa pero no cuantitativa.

El autor propone el empleo del tritio en la radioterapia anticancerosa y señala entre sus posibles ventajas: la localización de su acción; la posibilidad de utilizarlo, en su calidad de isótopo del hidrógeno, para marcar casi todas las moléculas orgánicas; su elevada actividad específica, que hace

posible alcanzar con rapidez la dosis de radiación necesaria para matar las células; y su precio moderado, que permite preparar materiales altamente radiactivos.

En la última sección, el autor menciona sucintamente los peligros que entraña el uso del tritio y señala que en la actualidad sólo se dispone de datos sobre la toxicidad del hidrógeno tritiado y del agua tritiada.