

Préparation et purification d'actinomycine-D-³H par une méthode spécifique

N. GROSSE, R. CARDINAUD et P. FROMAGEOT

Service de Biochimie — Département de Biologie — Centre d'Etudes
Nucléaires de Saclay — B. P. N° 2 — Gif-sur-Yvette — S. et O. — France.

(Manuscrit reçu le 5 octobre 1965).

SUMMARY

Actinomycine-D has been tritiated by exposure to tritium gas. Among the various conditions tested the use of a catalyst made of palladium deposited on alumina, and of an amount of tritium gas corresponding to a gas pressure of 20 torrs and to a radioactivity of 2 Ci for 5 mg of actinomycine results in the highest specific radioactivity of about 200 mCi/mM. The activation of the tritium gas by a high frequency electric discharge increases the specific radioactivity only in the absence of the catalyst. The purification of the labelled actinomycine is achieved by formation of a complex with DNA. This complex carries a labelled by-product which is subsequently separated by thin layer chromatography.

RÉSUMÉ

Parmi diverses conditions de tritiation de l'actinomycine-D, on obtient les activités spécifiques les plus élevées (environ 200 mCi/mM) sur un support constitué de palladium sur alumine, avec une pression de gaz tritium de 20 torrs environ et une quantité de 2 Ci de gaz pour 5 mg d'actinomycine. Un apport d'énergie sous forme d'une décharge électrique de haute fréquence exerce un effet positif important seulement en absence de catalyseur. L'extraction et la purification de la fraction non dégradée peut être réalisée en une seule étape par formation d'un complexe avec l'acide désoxyribonucléique. Une seule impureté radioactive facile à séparer par chromatographie sur couche mince est entraînée dans ce complexe.

INTRODUCTION.

La préparation de molécules tritiées par exposition simple au gaz tritium ⁽¹⁾ ou l'une des variantes avec une source d'énergie extérieure ^(2, 3, 4, 5), se heurte toujours à deux difficultés majeures :

- 1° Les activités spécifiques obtenues sont faibles,
- 2° La purification doit être très poussée pour garantir une pureté radiochimique acceptable.

De nombreux essais ont été faits pour accroître l'activité spécifique, soit en divisant la substance à l'état solide ^(6, 7), soit en utilisant un catalyseur ⁽⁸⁾. Néanmoins l'expérience montre que les meilleurs résultats ne peuvent être obtenus que par une étude préliminaire de quelques conditions de tritiation, les paramètres qui contrôlent ce type de réaction d'échange étant trop nombreux et trop peu connus pour qu'on puisse définir a priori les conditions optimales de réaction.

De plus, la tritiation de substances complexes pour lesquelles la méthode proposée reste seule applicable, nécessite toujours de très longues opérations de purification ⁽¹⁰⁾ pendant lesquelles la substance peut subir des dégradations supplémentaires si elle est fragile. Dans le cas de molécules douées d'activité biologique, on se heurte à une complication supplémentaire : compte tenu de la faible proportion de molécules effectivement marquées ¹ et de l'imprécision des mesures d'activité biologique il est pratiquement impossible d'assurer que les molécules contenant le traceur ont conservé l'activité biologique. On peut, en effet, imaginer que ces molécules complexes ont perdu l'activité biologique du fait de la tritiation tout en conservant celles des propriétés physico-chimiques utilisées pour leur purification. De tels procédés de purification reviennent donc à collecter ensemble deux types de molécules, les unes biologiquement actives mais non marquées, les autres radioactives mais sans activité biologique. Ceci pourrait conduire à de sérieuses erreurs d'interprétation si toutes les précautions nécessaires ne sont pas prises au cours de l'expérience avec de telles substances.

Dans certains cas ⁽¹¹⁾ il est possible d'utiliser le comportement spécifique dont dépendent les propriétés biologiques, comme technique de purification. Dans le présent travail de préparation de l'actinomycine D-³H, cette méthode simplifie considérablement les opérations de purification et fournit un produit pur, de radioactivité spécifique suffisante.

PARTIE EXPERIMENTALE.

Préparation des échantillons. — Dans chaque branche du tube à tritiation ⁽⁹⁾ (tube en Y), sont déposés le support étudié, puis 2,5 mg d'actinomycine-D

¹ Pour une substance de poids moléculaire 100.000 marquée à l'activité spécifique de 10 μ Ci/mg, la proportion de molécules effectivement marquées est 1/35.

(AM-D) (produit Rhône Poulenc) en solution dans 0,5 ml d'acétone. Après 30 minutes, le solvant est évaporé sous pression réduite. Les tubes sont adaptés à une rampe d'introduction du gaz tritium et l'ensemble est évacué jusqu'à pression résiduelle inférieure à $5 \cdot 10^{-4}$ torr.

Le tritium (CEA-96 %) est introduit en quantités variables selon les échantillons et soumis à une décharge de haute fréquence pendant des temps divers selon le plan d'expérimentation donné dans le tableau I. Les conditions de référence sont : soit absence de support, soit absence de décharge de haute fréquence. L'un des tubes (n° 14) contient de l'actinomycine X₂.

L'opération terminée, le tritium est repris à la pompe Toeppler jusqu'à pression résiduelle constante de 10^{-2} torr.

Extraction des ³H labiles. — Pour la série 1 à 6, chaque échantillon du tube en Y est traité 6 fois de suite par 1 ml de méthanol à 25 % avec enlèvement du solvant par cryosublimation entre chaque apport. Pour la deuxième série (échantillon 7 à 14), chaque échantillon est traité par du méthanol à 25 % (1 fois 1 ml; 3 fois 0,5 ml) par de l'eau distillée (3 fois 1 ml) puis une fois encore par 1 ml de méthanol à 25 %.

Extraction de l'actinomycine et purification. — Chaque tube est extrait par quatre fois 1 ml d'acétone (jusqu'à extraction quasi totale de l'AM). Le solvant est évaporé et l'AM remise en solution dans 1 ml d'eau est extraite par six fois 1 ml de benzène. Le benzène est évaporé par cryosublimation et l'AM mise en solution dans une solution de NaCl 0,3 M.

A ce stade la fixation spécifique ⁽¹²⁾ de l'AM sur l'acide desoxyribonucléique de thymus de veau (ADN) est utilisée comme méthode de purification pour séparer l'actinomycine des produits secondaires fortement marqués.

A cet effet, l'AM en solution saline est ajoutée à 4 ml d'une solution d'ADN à 1 mg/ml dans NaCl 0,3 M. Le complexe ADN—AM formé est précipité par addition de 8 ml de dioxane pur et sec ⁽¹³⁾. Le précipité fibreux est lavé sur une micro colonne par passage d'un mélange dioxane-éthanol (1 : 1) puis redissout dans l'eau et l'AM extraite par le benzène (trois fois 1 ml). Le solvant est éliminé par cryosublimation.

Contrôle de pureté radiochimique. — La pureté du produit ainsi obtenu est vérifiée par chromatographie sur couche mince de silicagel ⁽¹⁴⁾. Ces plaques sont préparées avec du gel de silice en suspension dans l'acétone, séchées à l'air puis activées 30 minutes à 100° et conservées jusqu'à l'emploi en récipient fermé garni de chlorure de calcium anhydre. Le solvant de développement ⁽¹⁵⁾ est : isopropanol, acétate d'éthyle, eau (2 : 5 : 1). La distribution de la radioactivité sur les chromatogrammes est enregistrée par un lecteur de radioactivité à compteur à circulation donnant des radiochromatogrammes tels que ceux des figures 2 et 3.

L'activité spécifique est calculée à partir d'une détermination spectrophotométrique à 2400 Å et d'une mesure de radioactivité¹ d'une solution dans le méthanol.

Contrôle de l'activité biologique. — L'activité biologique du lot ainsi traité a été vérifié par comparaison des activités inhibitrice du lot tritié et d'un lot d'AM intact vis-à-vis de l'ARN polymérase de *E. Coli*.

Pour cela, on a mesuré⁽¹⁶⁾ la quantité d'AMP ¹⁴C incorporée dans l'ARN synthétisé d'une part dans un milieu témoin sans AM-D, d'autre part dans un milieu contenant des quantités croissantes d'AM-D et d'AM-D-³H. L'activité inhibitrice pour chacun de ces tests est le pourcentage d'activité AMP-¹⁴C incorporé en présence d'AM-D par rapport à l'activité incorporée par le témoin sans AM. La réaction est faite dans le milieu suivant et composé dans l'ordre :

eau (quantité suffisante pour un volume total de 150 µl), ADN (48 mµ moles P dans 20 µl), AM-D ou AM-D-³H, solution préparée extemporanément (phosphoénolpyruvate 0,325 M; MnCl₂ 0,0125 M; MgCl₂ 0,05 M; β Mercaptoéthanol 0,15 M; tris 0,7 M) 20 µl, solution des nucléotides (ATP 0,004 M; GTP 0,005 M; CTP 0,005 M; UTP 0,005 M; ATP-¹⁴C 57.000 Ipm/10 µl; tris 0,05 M) 10 µl; phosphoénolpyruvate kinase (Boehringer et Soehne GmbH, Mannheim) 5 µl (50 µg); ARN polymérase de *E. Coli* 20 µl (environ 0,5 unité).

Après incubation de 25 minutes à 37° C, le milieu est refroidi rapidement à 0° et additionné de 20 µl d'ATP 0,02 M et 200 µl d'une solution d'ARN

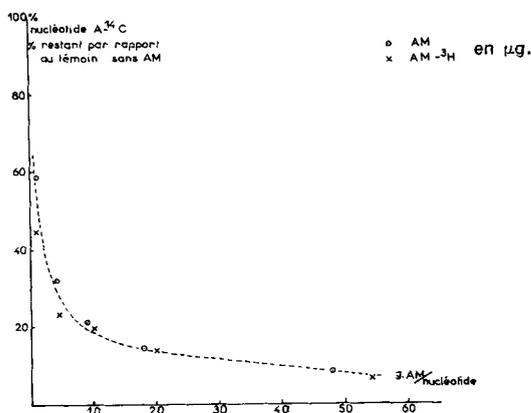


FIG. 1. — En ordonnée, mesure de l'activité inhibitrice de l'actinomycine-D, vis-à-vis de l'ARN-polymérase exprimée en % d'incorporation par rapport à la radioactivité incorporée (ATP-¹⁴C) par le témoin sans actinomycine. En abscisse, AM/nucléotide en µg/µM.

¹ Appareil Packard 314 Ex. Compteur à scintillateur liquide, rendement 28 % pour un échantillon de 0,1 ml de méthanol dans 14 ml de solution scintillante; composition de la solution scintillante PPO : 4g/l; POPOP : 0,1 g/l dans le toluène.

de levure (20 mg/ml). L'ARN formé et l'entraîneur sont précipités par 2.5 ml d'acide trichloracétique à 5 % glacé, puis séparés par centrifugation 3 minutes à 2000 g. Le précipité est lavé trois fois encore avec la même quantité d'acide trichloracétique puis avec un mélange éthanol-éther 3 : 1. Après centrifugation, le précipité est remis en solution dans 0,5 ml d'acide formique, déposé sur coupelle et compté au compteur Geiger Müller.

La figure 1 montre que le lot tritié possède la même activité inhibitrice vis-à-vis de l'ARN polymérase. Ceci traduit le fait que l'échantillon dans son ensemble n'a pas subi d'importantes dégradations, mais ne renseigne pas sur la pureté radiochimique du produit obtenu. Ce point sera examiné dans la discussion.

RESULTATS ET DISCUSSION.

1° *Influence des conditions de tritiation.* — Deux séries de tests ont été faites successivement. Dans la série 1 à 6 (tableau I), des conditions variées ont donné une première indication sur les conditions optimales autres que pression et quantité de gaz tritium.

— L'activité spécifique obtenue sur support « inerte » : quartz (n° 2-2'), Norite (n° 3-3') diffère peu de celle qu'on peut obtenir en l'absence de support, le quartz étant peut-être un peu plus efficace en dépit d'une surface spécifique probablement très inférieure.

— Le palladium se montre très bon catalyseur lorsqu'il est sur alumine, mais est sensiblement moins efficace sur charbon. L'effet inhibiteur du charbon vis-à-vis de certaines réactions a déjà été observé ⁽⁹⁾ et se trouve confirmé ici.

Dans la deuxième série, le même support a été employé en faisant varier la pression et la quantité de gaz tritium d'une part, le temps d'excitation du gaz d'autre part.

— L'activité spécifique maxima est obtenue pour une quantité de gaz tritium de 2 Ci correspondant à une pression de 20 torrs. On remarquera que cette pression est sensiblement plus faible que celles qui sont couramment réalisées pour ce type de marquage.

— La quantité de tritium adsorbé varie dans le même sens que la pression de gaz admis dans le tube de réaction, et il est intéressant de noter également qu'il n'y a pas de proportionnalité directe entre la quantité adsorbée sur le support, donc à priori proche de la substance, et l'activité spécifique obtenue.

— L'activité spécifique passe par un maximum pour un temps d'excitation de 20 minutes avec des variations peu sensibles. L'excitation du gaz donne un effet positif important lorsque le support est inerte ou inhibiteur (échantillon sur norite) et pratiquement nul lorsque le support est un catalyseur efficace.

TABLEAU I. Conditions de tritiation et activités spécifiques

No Echantillon*	Support***	³ H		Activa- tion**** (temps min.)	Activités spécifiques † mCi/mM			H labile** mCi
		P. torrs	³ HCl		(AM) ¹	(AM) ₂ ¹	(AM) ₂ ²	
1	—	8,4	0,9	20	5,62	6,53	—	
1'	—				4,57	—	4,97	
2	Qu	8,4	0,9	20	9,84	10,17	—	
2'	Qu				6,26	—	8,83	
3	No	8,4	0,9	20	6,48	6,37	—	
3'	No				4,70	—	4,76	
4	Pd/al	8,4	0,9	20	71,54	77,86	—	
4'	Pd/al				94,36	—	93,60	
5	Pd/ch	8,4	0,9	20	22,54	34,09	—	
5'	Pd/ch				24,62	—	24,67	
6	No	8,4	0,9	— (100 ^b)	1,76	1,60	—	
6'	No				0,87	—	0,60	
7	Pd/al	8,0	0,5	20	95,0			154
7'	Pd/al				110			
8	Pd/al	12,0	1,0	20	174			332
8'	Pd/al				160			
9	Pd/al	20,0	2,0	20	224			(399)
9'	Pd/al				212			
10	Pd/al	35,0	5,0	20	158			881
10'	Pd/al				136			
11	Pd/al	12,0	1,0	5	115			325
11'	Pd/al				—			
12	Pd/al	12,0	1,0	60	160			324
12'	Pd/al				165			
13	Pd/al	12,0	1,0	— (2 ^h)	172			355
13'	Pd/al				188			
14	Pd/al	12,0	1,0	20	159			315
14'	Pd/al				158			

* chaque branche du tube est traitée séparément sauf pour l'enlèvement des hydrogènes labiles.

** voir texte.

*** fibre de quartz purifiée (Qu); Norite (No); Palladium 10 % sur alumine (produit Engelhardt) (Pd/al); Palladium 5 % sur charbon (Produit Engelhardt) (Pd/ch).

**** les tubes 6-6' et 13-13' n'ont pas été activés. Pour les autres, excitation du gaz par décharge de haute fréquence.

† (AM)¹ activité spécifique mesurée après formation d'un seul complexe.

(AM)₂¹ activité spécifique d'une deuxième fraction purifiée dans des conditions identiques à (AM)¹.

(AM)₂² activité spécifique d'une deuxième fraction après formation de deux complexes successifs.

Il semble que cette conjonction des activités spécifiques obtenues par deux techniques différentes indique l'existence d'un équilibre pour des conditions de pression données.

2° *Evaluation du procédé de purification.* — La tritiation par ce procédé non spécifique forme toujours de nombreux produits secondaires très fortement marqués. Les purifications par des méthodes classiques (extraction par divers solvants) donnent un mélange très complexe selon les chromatographies sur couche mince (Fig. 2a). Après formation du complexe ADN-AM on ne retrouve plus que le pic de radioactivité correspondant à l'actinomycine et sur certaines préparations un deuxième pic qui peut être très important (échantillon 4-4') (Fig. 2b). Ce second pic de radioactivité migre plus vite que l'actinomycine avec le solvant utilisé. Après élution de la zone correspondante à l'AM et chromatographie dans le même solvant ou un solvant différent¹, on ne trouve plus qu'un seul pic radioactif centré sur la tache d'AM.

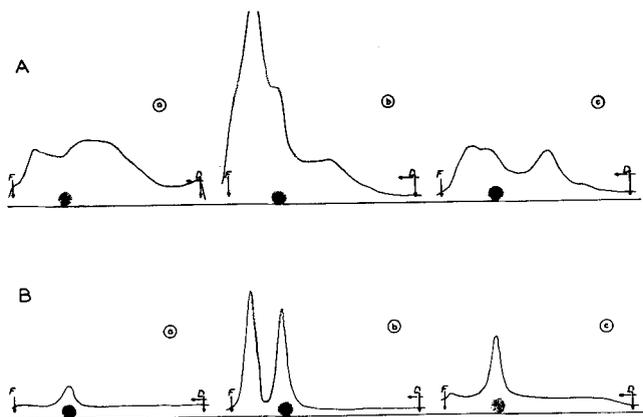


FIG. 2. — Radiochromatogrammes de contrôle de pureté radiochimique de l'AM-D-³H
A : Actinomycine brute avant purification — B : Actinomycine purifiée par formation d'un complexe sur ADN : Complexe (AM)¹.

a) échantillon tritié sans support — b) échantillon tritié sur Pd. Al₂O₃ — c) échantillon tritié sur Pd-charbon.

En grisé position de l'actinomycine sur le chromatogramme.

La stabilité du produit formé a été éprouvée de façon complémentaire par l'expérience suivante :

L'ADN est fixé sur DEAE-cellulose (produit Serva) en suspension dans une solution de NaCl 0,05 M, et le tout placé sur une colonne de poudre de cellulose de 10 mm de hauteur servant de filtre support. 20 μg de AM-³H (acti-

¹ Butanol-1, méthanol, eau (10 : 1 : 3, v/v) ⁽¹⁵⁾.

tivité spécifique 139,7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) dans 1 ml de solution de NaCl 0,05 M sont alors passés sur la colonne qui est ensuite lavée avec la même solution saline. L'AM est alors extraite par l'acétone, le solvant d'extraction est cryosublimé et le résidu sec est remis en solution dans le méthanol pour détermination de radioactivité spécifique. La valeur trouvée est de 132,2 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. La différence est de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales, ce qui confirme que le produit préparé a une radioactivité stable.

Les chromatographies indiquent que l'AM n'est pas la seule substance fixée de façon spécifique sur l'ADN. Le pic de radioactivité trouvé sur le front de développement se retrouve sur les chromatographies faites avec une fraction complexée deux fois de suite sur l'ADN (Fig. 3). La quantité relative de cette substance secondaire tritiée varie avec les traitements subis par la substance initiale mais également d'un lot d'AM à l'autre¹. En outre, si on soumet à la tritiation de l'AM- X_2 , on observe la présence d'une radioactivité beaucoup plus importante au niveau de cette substance secondaire. S'il s'agit d'un produit de tritiation néoformé (produit secondaire), il doit se trouver en quantités extrêmement faibles et avoir une radioactivité spécifique très élevée, ce qui semble être le cas. Cette substance pourrait être un produit de réduction de l'AM- X_2 (par exemple, réduction au niveau de la cétopropiline) qui se trouverait comme impureté dans le premier lot d'AM-D.

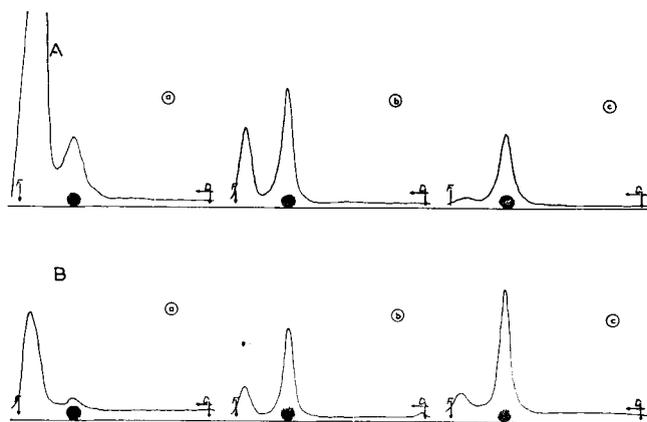


FIG. 3. — Fixation sur l'ADN d'un produit secondaire de tritiation. Radiochromatogrammes de contrôle.

A : Actinomycine après formation d'un seul complexe avec l'ADN : $(\text{AM})_1^1$ (voir texte).

B : Actinomycine après formation successive de deux complexes avec l'ADN $(\text{AM})_2^2$.
a) échantillon tritié sur Norite. b) échantillon tritié sur Pd Al_2O_3 . c) échantillon tritié sur Pd-charbon.

En grisé position de l'actinomycine sur les chromatogrammes.

¹ Les échantillons 1 à 6 ont été préparés à partir d'un lot différent de celui utilisé pour 7 à 13.

La purification par adsorption sur l'ADN pourrait mettre en évidence des phénomènes de fixation non spécifiques ainsi qu'il a déjà été observé ⁽¹¹⁾. S'il en était ainsi, on devrait avoir une diminution de la radioactivité spécifique obtenue par la formation successive de complexes sur l'ADN, éliminant progressivement les produits tritiés fixés de façon non spécifique après formation d'un complexe (AM)¹ par rapport à celle qu'on obtient après deux complexes successifs (AM)₂². Il n'apparaît généralement pas de différence supérieure aux fluctuations normales dues aux erreurs expérimentales. Ce système montre donc une remarquable absence de fixation non spécifique.

En conclusion, la méthode étudiée conduit à un produit d'activité spécifique convenable pour de nombreuses études. Cifferi *et al* ⁽¹⁷⁾ ont décrit une préparation biosynthétique dans laquelle des acides aminés marqués sont incorporés au milieu de culture de *Streptomyces* V 187. Ce procédé fournit un produit marqué sur les positions correspondant aux précurseurs avec une activité spécifique de l'ordre de 17 à 20 mci/mM. La méthode proposée ici apparaît donc comme complémentaire en fournissant des activités spécifiques plus élevées.

Nous remercions la Firme Rhône-Poulenc pour plusieurs dons d'actinomycine D, le D^r E. Reich, Institut Rockefeller, New-York, qui nous a fourni un échantillon d'actinomycine X₂, et le D^r A. Sentenac qui a réalisé le contrôle de l'activité biologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. WILZBACH, K. E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **79** : 1013 (1957).
2. WILZBACH, K. E. and DORFMAN, L. M. — *J. Phys. Chem.*, **63** : 799.
3. JACKSON, F. L., KITTINGER, G. W. and DRAUSE, F. P. — *Nucleonics*, **18** : 102 (1960).
4. SATO, Y., MESHI, T., TAKAHASHI, T. and SUGIMOTO, M. — *Japanese J. Pharm. and Chem.*, **32** : 317 (1960).
5. WESTERMARK, T., LINDROTH, H. and ENANDER, B. — *Intern. J. Applied Rad. Isotopes*, **7** : 331 (1960).
6. ROSENBLUM, C. and MERIWETHER, H. T. — Proc. of the Symp. on Adv. in the Tracer Applications of Tritium (1958).
7. WENZEL, M., WOLLENBERG, H. and SCHULZE, P. E. — Symp. on the Detection and Uses of Tritium in the Physical and Biological Science, IAEA, Vienne (1961).
8. MESHI, T. and TAKAHASHI, T. — *Bull. Chem. Soc. Japan*, **35**, **9** : 1510 (1962).
9. CARDINAUD, R. and BOUHET, J. C. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **834** (1965).
10. du VIGNEAUD, V., SCHNEIDER, C. H., STAUFFER, J. E., MURTI, V. V. S., ANOSKAR, J. P. and WINESTOCK, G. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, **3** : 409' (1962).
11. CARDINAUD, R., TAKASHIMA, K., DAUSSET, J. and FROMAGEOT, P. — *Int. J. Applied Rad. Isotopes*, **15** : 1 (1964).
12. KERSTEN, W. — *Biochim. Biophys. Acta*, **47** : 610 (1961).
13. FIESER, L. F. — Experiments on Organic Chemistry, DC Heath Co, Boston (1955), 3^e éd., p. 285.
14. MULLER, K. H. and HONERLAGEN. — *Arch. Pharmac.*, **293**, Mitt. S. 202 (1960).
15. CASSANI, G., ALBERTINI, A. and CIFFERI, O. — *J. Chromatogr.*, **13** : 238 (1964).
16. CHAMBERLIN, M. and BERG, P. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **48** : 81 (1962).
17. CIFFERI, O., FRACCARO, M., ALBERTINI, A., CASSANI, G., MANNINI, A. and TIEPOLO, L. — Int. Symp. on the Preparation and Biomedical Applications of Labeled Molecules, Venice (1964).