

## NOTE

### SYNTHÈSE DE FORMALDÉHYDE TRITIÉ À HAUTE ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE EN VUE DU MARQUAGE DES PROTÉINES

M. COPPO, B. ROUSSEAU, J.P. BEAUCOURT  
Service des Molécules Marquées  
CEN-SACLAY

91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX  
FRANCE

#### Summary :

In order to label proteins with tritium in high specific activity, we synthesized  $^3\text{H}$ -formaldehyde with a specific activity of about 15 Ci/mmol (555 GBq/mmol). The method is suitable for the synthesis of about 100 mCi (3.7 GBq) of tritiated formaldehyde directly used for the reductive methylation of proteins.

KEY WORDS : tritiated formaldehyde ; reductive methylation ; tritiated proteins.

Les protéines marquées par des radioisotopes sont des outils expérimentaux importants en particulier pour les dosages radioimmunologiques ou l'étude des récepteurs. L'iode 125 est un isotope de choix par sa radioactivité spécifique élevée. Cependant, il présente certains inconvénients : autoradiolyse rapide due aux effets des rayonnements primaires, taille de l'atome d'iode pouvant modifier la conformation de la protéine iodée et son activité biologique.

Pour le marquage des protéines, le tritium est donc une alternative intéressante, à condition d'obtenir une activité spécifique suffisante, facteur essentiel à la sensibilité de la méthode. En effet, l'autoradiolyse est moins importante et la conformation ainsi que l'activité biologique de la protéine marquée sont conservées.

Parmi les méthodes de marquage par le tritium, la méthylation réductrice des groupements amine des résidus lysyles de la protéine par le formol ou le cyanoborohydrure tritiés (1) est intéressante. En effet, elle ne modifie pas la charge portée par la chaîne de la lysine, ce qui est important compte tenu de l'influence des interactions ioniques sur la stabilité de la conformation des protéines.

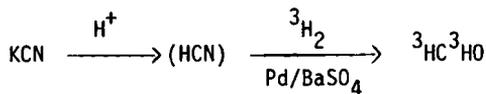
Cependant, l'activité spécifique des protéines marquées obtenues reste faible : quelques mCi (MBq) par position marquée à partir de formol tritié, 1 à 2 Ci (30 à 70 GBq) par position marquée à partir de cyanoborohydrure marqué. L'utilisation du formol tritié à haute activité spécifique permettrait d'augmenter sensiblement l'activité spécifique des protéines marquées au tritium.

A notre connaissance, les méthodes actuelles d'obtention du formol tritié (échange par l'eau tritiée ou carbonylation d'hydroxyde de calcium tritié (2)) conduisent à des activités spécifiques ne dépassant pas 50 à 70 mCi/mMol. (1,8 à 2,6 GBq/mMol).

### Résultats :

Nous avons utilisé une méthode déjà décrite (3) pour la préparation de formaldéhyde  $^{14}\text{C}$  ou  $^{13}\text{H}$  par réduction catalytique de cyanure de sodium en milieu acide (Schéma 1). Cette méthode simple et rapide permet d'obtenir des quantités importantes de formaldéhyde tritié, de l'ordre de plusieurs centaines de millicuries avec une forte activité spécifique voisine de 15 Ci/mMol (555 GBq/mMol) et une pureté suffisante pour une utilisation ultérieure (environ 90%).

### Schéma 1



A l'aide d'une pompe Toepler, le cyanure en solution aqueuse est réduit par du palladium sur sulfate de baryum préalablement saturé par le tritium gaz. La solution obtenue est ensuite filtrée sur une résine échangeuse d'ions Dowex 50 WX8 et 1X8 puis le formol tritié est transféré sous vide.

La quantité de formol tritié obtenu est maximale au bout de 2 heures puis décroît rapidement pour devenir nulle au bout de 20 heures (tableau 1).

Tableau 1 : variation du rendement en formol-<sup>3</sup>H avec le temps de réaction.

Temps de réaction	2h	3h30	5h	6h	20h
Quantité de formol <sup>3</sup> H	300 mCi (11 GBq)	120 mCi (4,4 GBq)	110 mCi (4 GBq)	110 mCi (4 GBq)	0 mCi

Pour des raisons de simplicité, nous avons préféré contrôler le formol tritié en le faisant réagir sur une amine dans les conditions habituelles de méthylation réductrice. Nous avons choisi la naphtylamine qui, traitée par le formol tritié en présence de borohydrure de sodium, conduit à un mélange contenant de la mono-et de la di-méthyl-naphtylamine. Ces produits de réactions sont purifiés et caractérisés.

Leur analyse en spectrométrie de masse (impact électronique) permet de déterminer l'activité spécifique du formol de départ, activité qui est voisine de 15 Ci/mMol (555 GBq/mMol) pour tous les essais. Nous n'avons pas observé de variation de l'activité spécifique en fonction des conditions expérimentales utilisées.

Par contre, nous avons constaté que la pureté du formol tritié influence fortement sur le rendement de la méthylation réductrice (Tableau 2). Nous avons tenté deux types de purifications :

1) filtration de la solution aqueuse de formol tritié sur résine mixte échangeuse d'ions du type AG 50WX8 et AG 1X8.

Ce traitement ne permet pas d'augmenter le rendement en naphtylamine méthyliée ; il subsiste environ 40% d'impuretés tritiées très polaires.

2) filtration de la solution aqueuse obtenue précédemment, suivie d'un transfert sous vide du formol tritié.

Dans ces conditions, le pourcentage de récupération du formol est voisin de 100% et l'obtention de naphtylamine tritiée devient pratiquement quantitative (10% seulement d'impuretés radioactives polaires).

Tableau 2 : influence de la pureté du formol tritié sur le rendement en méthyl-<sup>3</sup>H naphtylamine

FORMOL <sup>3</sup> H	Méthyle- <sup>3</sup> H naphtylamine	Impuretés polaires
Brut	60%	40%
Après passage sur colonne Dowex	60%	40%
Après passage sur colonne Dowex et transfert sous vide	90%	10%

#### PARTIE EXPERIMENTALE :

##### a) Synthèse et purification du formol tritié.

La réduction est effectuée à l'aide d'une pompe Toepler. Dans un ballon de 5 ml muni d'un septum, on place :

- 10 ml de Pd/BaSO<sub>4</sub> à 5%
- 0,9 ml d'eau
- 0,1 ml de méthanol

Après avoir réalisé le vide dans l'installation, on introduit 50 Ci (1850 GBq) de tritium gaz. Le catalyseur est saturé sous vive agitation pendant 20 mn puis on introduit par le septum 0,4 ml d'HCl 0,06N.

Après avoir gelé la solution, on introduit par le septum 0,3 ml d'une solution chlorhydrique (pH = 1,7) contenant 13 mg de KCN. Le vide est ensuite réalisé dans le ballon afin d'éliminer les traces d'oxygène dues aux différentes introductions. Puis la solution est agitée pendant 2 heures sous atmosphère de tritium gaz.

Après filtration de la solution sur un filtre 0,5 µm, cette dernière est passée sur une microcolonne (0,5 ml) de résine Dowex AG 1X8 et AG 50 WX8. On recueille environ 1 ml de solution qui est transférée sous vide statique pour donner 1 ml de solution aqueuse contenant entre 80 et 120 mCi de formol tritié (2,9 et 4,4 GBq).

b) Détermination de l'activité spécifique du formol tritié

Une partie aliquote (0,2 ml) de la solution aqueuse de formol tritié est ajoutée à 0,13 ml d'une solution 3N d'acide sulfurique. On ajoute ensuite 14 mg de naphtylamine dans 0,6 ml de THF.

Après 1 mn d'agitation, on introduit 0,6 ml d'une solution de THF contenant 14 mg de NaBH<sub>4</sub> et on poursuit l'agitation pendant 10 mn à 0°C.

Après addition de 40 mg de soude, la solution aqueuse est extraite par du dichlorométhane.

Les phases organiques sont rassemblées puis portées à sec. Le mélange est repris 2 fois par 5 ml d'éthanol puis évaporé afin d'éliminer les atomes de tritium labiles.

Le mélange obtenu est purifié par chromatographie préparative sur couche mince. Après extraction des produits par de l'éthanol, l'activité spécifique de la monométhyl-naphtylamine est déterminée par spectrométrie de masse, celle de la diméthyl-naphtylamine étant mesurée par dosage U.V. et comptage par scintillation liquide.

L'activité spécifique, par ces deux techniques et sur différentes préparations de formol tritié, a toujours été comprise entre 13 et 15 Ci/mMol (480 et 555 GBq/mMol).

---

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) G.E. MEANS, R.E. FEENEY, *Biochemistry*, 7, 2192 (1968)
- (2) A.C. LANE, A. Mc COUBREY, P. PEAKER  
*J. of Labelled Compounds*, 2, 284, (1966)
- (3) A.S. SERIANNI, E.L. CLARK, R. BARKER,  
*Carbohydrate Research*, 72, 79 (1979)