

Autoradiolyse des molécules marquées au carbone 14

Sophie de Suzzoni-Déizard* ingénieur, Louis Pichat** directeur de recherche

Summary : Self-radiolysis of carbon-14 labelled compounds

Self radiolysis is the result of the degradation of a radioactive labelled compound under its own radiation. This phenomenon is observed during the storage of these labelled compounds. In the case of carbon-14 labelled compounds, some characteristic examples are given from literature to illustrate the three ways of degradation of the radioactive labelled compounds.

Mots clés : Autoradiolyse, molécules marquées, carbone 14.

Key-words : Self radiolysis, labelled compounds, carbon-14.

L' autoradiolyse des molécules marquées a déjà fait l'objet de revues [1, 2, 3]. Elle est mentionnée brièvement dans une revue concernant les molécules marquées [3 bis]. Le présent article est le résumé d'un mémoire bibliographique [4]. Il se propose de rappeler les mécanismes de l'autoradiolyse et d'en illustrer les différentes étapes par quelques exemples représentatifs. Quelques recommandations pour le stockage des molécules marquées en vue de diminuer la vitesse d'autoradiolyse sont présentées.

Définitions

La radiolyse est la rupture de liaisons chimiques sous l'effet d'un rayonnement. Ce rayonnement peut être de diverses natures : α , β , γ ... Lorsque la source de rayonnement est extérieure à l'échantillon, on parle de chimie sous irradiation. Les molécules marquées aux isotopes radioactifs constituent à la fois la source et la cible du rayonnement. C'est pourquoi on parle d'autoradiolyse.

Quelques rappels de physique

Un radioélément se caractérise par quelques grandeurs physiques : sa période radioactive ($1/2$ vie), la nature du rayonnement émis, l'énergie de ce rayonnement. Le tableau 1 donne les caractéristiques physiques des isotopes radioactifs les plus couramment utilisés pour le marquage des molécules organiques. Un rappel de définition des unités de radioactivité est également inclus.

Le cas du carbone 14 est simple puisque sa période est de 5 730 années et qu'il n'émet qu'une particule par noyau : un électron appelé rayonnement β^- . L'énergie de cet électron est de 0,155 MeV, son parcours dans l'eau est de 33 μm .

Les résultats d'autoradiolyse sont mesurés par analyse chromatographique de pureté radiochimique du produit marqué et exprimés en pourcentage. Dans le but de caractériser la sensibilité de différents composés à l'autoradiolyse, certains auteurs ont tenté d'établir une corrélation entre ces résultats expérimentaux et le nombre d'espèces (ions, atomes, radicaux, molécules) transformées ou produites par 100 eV d'énergie absorbée ; ce sont les valeurs $G(-M)$.

$$d = f.E.s.(5,3.10^{-9}).G(-M)$$

où

d = pourcentage initial de décomposition par jour,

f = fraction de radiation absorbée par le système,

s = activité spécifique du composé (mCi/mmol),

E = énergie moyenne de la particule (eV),

$G(-M)$ = nombre de molécules transformées pour 100 eV absorbés.

Dans le cas du carbone 14, f est considéré comme étant égal à l'unité. Connaissant l'énergie moyenne de l'électron émis par un atome de carbone 14 (50 keV), on peut écrire la formule simplifiée suivante :

$$G(-M) = d.(3,77.10^3).s^{-1}$$

Pour $G(-M) = 10$ et $s = 10$ mCi/mmol, la perte de pureté est de l'ordre de 10 % par an. Pour $G(-M) = 1\ 000$, les effets sont considérables en quelques jours [2, 5].

* Service des Molécules marquées (SMM), département de biologie cellulaire et moléculaire, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette. Tél : 01.69.08.25.23. Fax : 01.69.08.79.91. E-mail : Dezard@dsvidf.cea.fr

** CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette. Tél. : 01.69.08.24.03. Fax : 01.69.08.79.91

Tableau I - Isotopes radioactifs les plus couramment utilisés pour le marquage des molécules organiques

	Période (1/2 vie)	Émetteur	Énergie maximale émise (MeV)	Activité spécifique maximale théorique (TBq.mmole ⁻¹) (Ci.mmole ⁻¹)	
¹¹ C	20,3 min	β ⁺	0,99	3,42.10 ⁵	9,62.10 ⁶
¹⁴ C	5 730 ans	β ⁻	0,155	2,31.10 ⁻³	62,4.10 ⁻³
³⁵ S	88 jours	β ⁻	0,167	55,5	1 500
³ H	12 ans	β ⁻	0,017	1,07	29

Unité de radioactivité (SI) : 1 Becquerel (Bq) = 1 désintégration par seconde.
Ancienne unité : 1 curie (Ci) = 3,7.10¹⁰ Bq = 37 GBq

Mécanisme de la radiolyse

Dès 1960, Bayly et Weigel [6] ont proposé une classification des modes de décomposition des molécules marquées. Ce sont en fait les trois étapes du même phénomène physique : la décroissance radioactive du noyau et ses conséquences sur le milieu environnant.

Seul le cas du carbone 14 est envisagé ici mais ce mécanisme est général et a été appliqué à d'autres radioéléments [1, 2] en tenant compte de leurs caractéristiques physiques.

Les trois modes de décomposition des molécules marquées aux isotopes radioactifs induisent une dégradation de la molécule qui est observée par des contrôles de pureté au cours du stockage de celles-ci (tableau II).

Décomposition due à la transformation du noyau de carbone 14 en azote 14 : effet primaire interne

Les ruptures de liaisons covalentes qui ont été observées [7, 8] sont dues à l'énergie de recul [9] qui est communiquée au noyau lors de l'émission de l'électron. Ce mode de décomposition est surtout important pour les éléments à vie courte, ce qui n'est pas le cas du carbone 14 pour lequel il ne représente que 0,01 % de produits de décomposition par an. Un exemple est donné dans la figure 1.

Effets dus au rayonnement

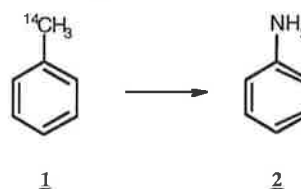
L'énergie moyenne de l'électron émis par le noyau de carbone 14 est de 50 keV. Il y a possibilité de rupture des liaisons covalentes faisant intervenir le carbone et tout autre élément. Ces liaisons peuvent être celles de la molécule marquée (effet direct) ou celles du solvant de stockage (effet indirect).

Tableau II - Modes de décomposition des molécules marquées radioactives.

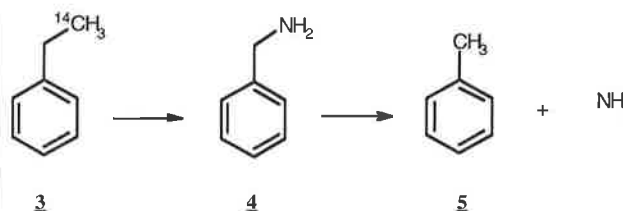
Mode d'autodécomposition	Cause	Moyen de ralentir la décomposition
Primaire (interne)	Décroissance isotopique	Aucun (pour une activité spécifique donnée)
Primaire (externe)	Interaction directe de l'émission (α,β,γ) avec les molécules du composé	Dispersion des molécules marquées
Secondaire	Interaction d'espèces excitées avec les molécules du composé	Dispersion des molécules Refroidissement Capteurs de radicaux
Chimique et microbiologique	Instabilité thermodynamique Microorganismes présents	Refroidissement Stérilisation

La conséquence de ces interactions est la formation d'entités réactives : molécules excitées et radicaux.

Manning et Monk [8] ont observé la formation d'aniline 2 à partir du [¹⁴CH₃] toluène 1 :



Dans le cas du [1-¹⁴C-éthyl] benzène 3, ces auteurs observent, comme Wolfgang *et al.* [7], la rupture de la liaison C-N de la benzylamine 4 pour former le toluène 5 et l'ammoniac.

**Figure 1** - Décroissance du [¹⁴CH₃] toluène et du [1-¹⁴C-éthyl] benzène.

Effet direct

La décomposition n'est pas un effet linéaire du temps [2]. Elle se fait selon un processus en chaîne [10] (figure 2). La sensibilité aux réactions radicalaires des molécules éthyléniques a été soulignée par Parker [11] (figure 3). Ceci a une conséquence pratique.

Dans un projet de synthèse de molécule marquée au carbone 14 qui comporterait une étape mettant en œuvre un monomère éthylénique, il conviendra d'éviter le marquage de ce monomère et de préférer le marquage d'une entité moins sensible aux réactions radicalaires.

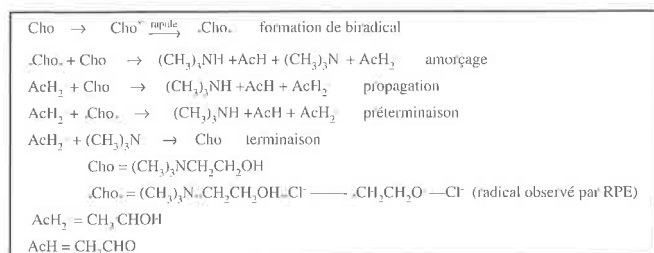
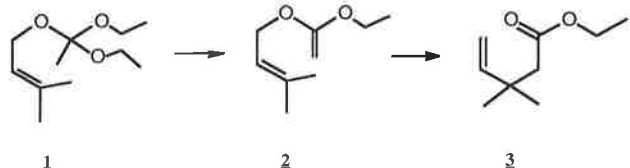
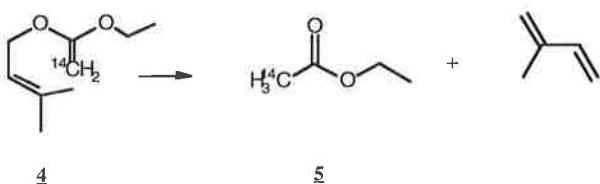


Figure 2 - Radiolyse du chlorhydrate de choline (Cho).

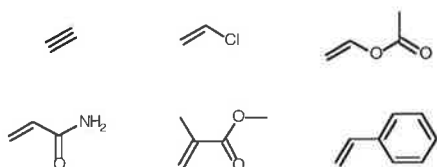
Un exemple « catastrophique » d'une synthèse de molécule marquée au ^{14}C ne conduisant pas aux mêmes produits de réaction que dans la synthèse non radioactive a été décrit par Parker [11]. Un projet de synthèse de pyréthroïde marqué au carbone 14 consistait en l'utilisation du réarrangement de Claisen où le 1-(1,1-diéthoxy-éthoxy)-3-méthylbut-2-ène **1** donne le 1-(1-éthoxy-vinyl)-3-méthylbut-2-ène **2** pour obtenir l'ester éthylique de l'acide 3,3-diméthylpent-4-énoïque **3**, mis au point en synthèse « froide ».



L'application de cette réaction au 1-(1-éthoxy- [$1\text{-}^{14}\text{C}$ -vinyl]) 3-méthylbut-2-ène **4** a donné non pas l'ester éthylique de l'acide [2- ^{14}C] 3,3-diméthylpent-4-énoïque, mais le [2- ^{14}C] acétate d'éthyle **5** via une ène réaction :



Lorsque Parker [11] a tenté le marquage au carbone 14 des monomères suivants, même à de faibles activités spécifiques, il s'est heurté au problème de leur polymérisation « spontanée » dans presque tous les cas :



Parker propose l'hypothèse suivante : « Si au cours d'une synthèse radioactive, une réaction chimique peut procéder par plusieurs mécanismes et qu'à l'un d'eux correspond la participation de radicaux, alors ce mécanisme sera préférentiellement suivi ».

Figure 3 - Exemples de « déviation » de réactions dans le cas de molécules marquées au ^{14}C .

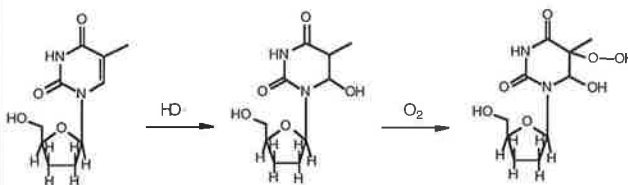
Effet indirect

En solution diluée, le solvant sera la source principale de la plupart des ions initiaux et molécules excitées. La radiolyse d'un solvant usuel, l'eau, forme des entités radicalaires qui sont réductrices ($\text{H}\cdot$, $\text{e}^{\cdot\text{aq}}$) ou oxydantes ($\text{HO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$) avec le résultat schématique global brut :

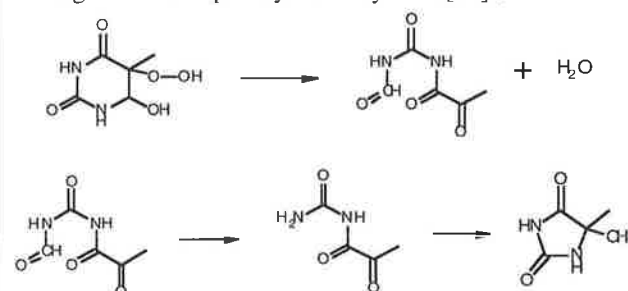


Ces entités sont à l'origine de la décomposition de certaines molécules marquées [12, 13]. L'oxygène se fixe sur les doubles liaisons éthyléniques [13, 14, 15]. La radiolyse de la thymidine a été particulièrement étudiée (figure 4).

Obtention du peroxyde de thymidine par radiolyse en milieu aéré et aqueux [12] :



Dégradation du peroxyde de thymine [13] :



Dans ces exemples, le marquage au carbone 14 n'est pas une source d'irradiation mais un « traceur », outil d'étude de réaction lente sous irradiation.

Figure 4 - Radiolyse de la thymidine et de la thymine.

Des réactions d'oxydation, de réduction, de décarboxylation, de rupture de liaison carbone-azote ont été observées lors de l'autoradiolyse de la carnitine [^{14}C -méthyle] (figure 5) [16].

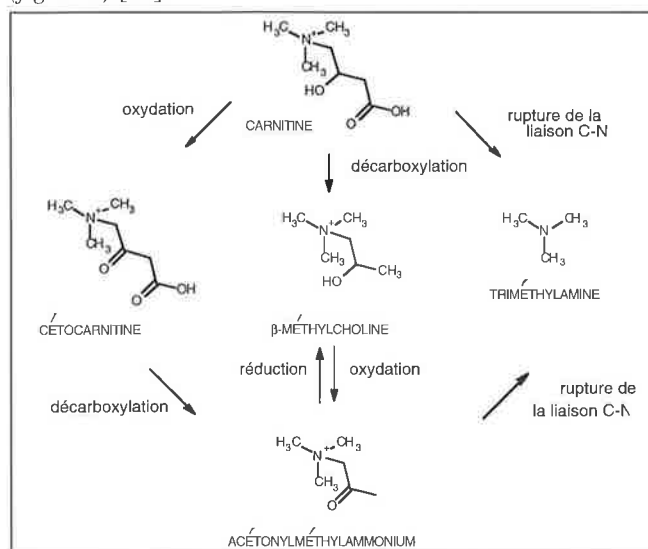


Figure 5 - Autoradiolyse de la [$^{14}\text{CH}_3$] carnitine.

Une attention particulière a été portée à la radiolyse des acides aminés dans le but d'observer que celle-ci pouvait être énantiométrique [17, 18, 19].

La chromatographie sur couche mince des produits de décomposition de la thymine [^{14}C] par autoradiolyse, sous rayonnement ultraviolet à 266 nm (4,88 eV) et sous rayonnement γ donne trois chromatogrammes qui ont sensiblement la même allure [21]. Un schéma des différents états excités de la thymine a été proposé [21].

Méthodes permettant de limiter l'autoradiolyse

Les effets dus à la décroissance du carbone 14 sont négligeables et ne peuvent pas être limités.

Les effets directs liés au rayonnement peuvent être réduits par la dispersion de la molécule. Cette dispersion peut se faire par dilution isotopique (réduction de l'activité spécifique), par dissolution dans un solvant, par étalement en film, par dispersion sur papier [1, 2]. Ces derniers procédés ont une certaine efficacité mais ne sont guère pratiques.

Les effets indirects secondaires (évolution des entités réactives formées sous rayonnement) peuvent être limités par l'utilisation de solvants appropriés et d'inhibiteurs radicalaires. Le solvant ne doit pas former d'entités réactives avec la molécule à conserver. Ses caractéristiques physiques (point de fusion par exemple) doivent être compatibles avec la température de stockage [1]. On évitera une congélation lente afin d'obtenir des solutions solides homogènes. Les inhibiteurs radicalaires, alcools et thiols, ont une certaine efficacité [2]. Le plus utilisé est l'éthanol en solution aqueuse ou organique à quelques pour cent. Les hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène) sont d'excellents solvants de conservation des molécules marquées car ils sont eux-mêmes très sensibles à la radiolyse [20]. Au cours du stockage de molécules marquées, l'absence totale d'eau et d'oxygène, l'utilisation de basses températures, une surface de verre neutre et parfaitement propre (flacons), l'absence de lumière sont des conditions qui aident à diminuer les vitesses d'autoradiolyse. La présence d'impuretés chimiques non radioactives aggrave généralement l'autoradiolyse sauf s'il s'agit d'inhibiteurs radicalaires.

Conclusions

Comme l'a dit si justement J.R. Catch dès 1961 [5], l'autoradiolyse des molécules marquées radioactives reste un ennui à la fois pour celui qui les prépare et celui qui les utilise. Bien que « autoradiolyse, stabilité et problèmes de stockage des molécules marquées » soit un des thèmes du « *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* » depuis son origine (1965), on remarque que le nombre d'auteurs qui publient leurs observations sur

ce thème est extrêmement réduit. Malgré ce handicap, les molécules marquées au carbone 14 restent un outil irremplaçable dans les sciences du vivant.

On ne saurait trop recommander aux utilisateurs des molécules marquées de contrôler la pureté radiochimique avant leur utilisation afin d'éviter l'obtention de résultats erronés.

Les méthodes de contrôle de pureté radiochimique ont bénéficié ces dix dernières années de progrès techniques considérables qui les ont rendues rapides, sensibles et à haut pouvoir de résolution. Par exemple, les techniques de chromatographie en couches minces associées à des lecteurs équipés de détecteurs Charpack sont extrêmement efficaces. Les techniques de chromatographie liquide à haute performance se sont développées sur de nombreux supports. Les utilisateurs peuvent donc disposer de moyens de contrôle puissants et rapides pour déterminer la pureté radiochimique des molécules marquées.

L'adaptation de ces techniques à des fins préparatives permet la repurification des molécules marquées radiolysées.

Références

- [1] Evans E.A., Review n°16, Amersham International, 1976.
- [2] Sheppard G., *Atomic Energy Review*, **1972**, 10, p. 3-66.
- [3] Rochelin P., *Chem. Reviews*, **1965**, 65, p. 685-696.
- [3 bis] Pichat L., *Isotopes, rayonnement et biologie*, collection CEA, série Synthèses, Éd. Eyrolles, Paris, **1984**, p. 11-14.
- [4] de Suzzoni S., *Mémoire bibliographique de chimie organique en vue des applications*, Cnam Paris, **1991**.
- [5] Catch J.R., *Carbon 14 compounds*, Butterworth, London, **1961**.
- [6] Bayly R.J., Weigel H., *Nature*, **1960**, 188, p. 384-387.
- [7] Wolfgang R.L., Anderson R.C., Dodson R.D., *J. Chem. Phys.*, **1956**, 24, 1, p. 16-23.
- [8] Manning P.G., Monk C.B., *J. Chem. Soc.*, **1962**, p. 2573-2576.
- [9] Stöcklin G., *Chimie des atomes chauds*, édition française Masson et Cie, **1972**.
- [10] Lindblom R.O., Lemmon R.M., Calvin M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, p. 2484-2489.
- [11] Parker D.G., *Proceed. Sec. Int. Symp., September, Kansas City*, Elsevier, Amsterdam, **1985**, p. 491-496.
- [12] Bourne E.J., Hutson D.H., Weigel H., *J. Chem. Soc.*, **1960**, p. 5153-5159.
- [13] Teoule R., Cadet J., Ulrich J., *C.R. Acad. Sc. Paris, Série C*, **1970**, t 270, p. 362-364.
- [14] Cadet J., Teoule R., *Tet. Lett.*, **1972**, 31, p. 3225-3228.
- [15] Kopoldova J., Dedkova V., *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1975**, 11, 4, p. 501-513.
- [16] Löster H., Seim H., Strack E., *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1983**, 20, 9, p. 1035-1045.
- [17] Merwitz O., *Rad. and Environm. Biophys.*, **1976**, 13, p. 63-69.
- [18] Bonner W.A., Lemmon R.M., Noyes H.P., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 3, p. 522-524.
- [19] Tockay R.K., Norden B., Liljenzin J.O., Andersson S., *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, **1986**, 104, 6, p. 337-348.
- [20] Ekstrom A., Garnett J.L., *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1967**, 3, 3, p. 167-183.
- [21] Rubin L.B., Menshonkova T.N., Simukova N.A., Budowsky E.I., *Photochem. Photobiol.*, **1981**, 34, p. 339-344.